



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DIRECCIÓN DE POSTGRADO
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA ORAL**



**ESTUDIO MORFOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO DEL EFECTO DEL
PLASMA RICO EN PLAQUETAS SOBRE LA ANGIOGÉNESIS DE LA
MUCOSA ORAL LESIONADA EN CONEJOS**

Davide Antonio Mobili Rocaro

Julio, 2022



ACTA DE VEREDICTO DE TRABAJO DE GRADO

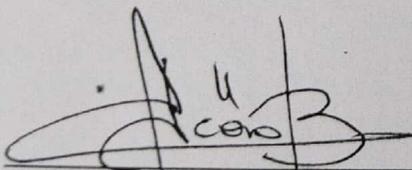
En atención a lo dispuesto a los Artículos 139 y 140 del Reglamento de Estudios de Postgrado de la Universidad de Carabobo, quienes suscribimos como jurados designados por el Consejo de Postgrado de la Facultad de odontología, de acuerdo a lo previsto en el Artículo 136 del citado Reglamento, para evaluar el Trabajo de Grado titulado:

ESTUDIO MORFOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO DEL EFECTO DEL PLASMA RICO EN PLAQUETAS SOBRE LA ANGIOGÉNESIS DE LA MUCOSA BUCAL LESIONADA EN CONEJOS"

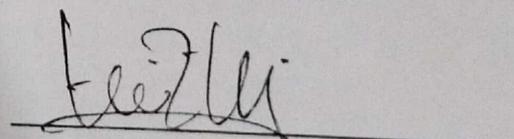
Presentada para optar el grado de Magister en Biología Oral, por el aspirante **DAVIDE ANTONIO MOBILI ROCARO**, titular de la cedula de identidad N° **20.383.904**, realizado bajo la tutoría de la Profa. Junedy Marcano titular de la cedula de identidad N° **8.503.107**, habiendo examinado el trabajo presentado, se dice que el mismo está **APROBADO**.

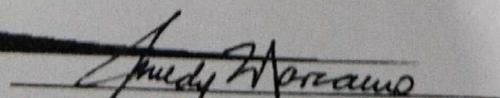
En Bárbula a los 14 días del mes de Julio del 2022.

Jurado Evaluador:


Dra. Carmen Ucero
CI: 9.661.661




Mg. Luisel Rodríguez
CI: 17.778.660


Mg. Junedy Marcano
CI: 8.503.107



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DIRECCIÓN DE POSTGRADO
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA ORAL**



**ESTUDIO MORFOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO DEL EFECTO DEL
PLASMA RICO EN PLAQUETAS SOBRE LA ANGIOGÉNESIS DE LA
MUCOSA ORAL LESIONADA EN CONEJOS**

Davide Antonio Mobili Rocaro
Marzo 2021

RESUMEN

La angiogénesis es un proceso fundamental en la reparación y regeneración tisular, existen numerosas terapias que buscan estimular este mecanismo, el Plasma Rico en Plaquetas (PRP) se ha considerado una de las alternativas más sencilla, económica y segura. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto del plasma rico en plaquetas sobre la angiogénesis de la mucosa oral lesionada de conejos mediante técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas, para ello se contó con 6 conejos macho Nueva Zelanda divididos en 2 grupos, a todos se les realizó una incisión en la mucosa oral, el grupo experimental fue tratado con PRP mientras que el grupo control sin tratamiento, ambos fueron evaluados a los 7, 14 y 21 días, utilizando las coloraciones histológicas Hematoxilina/Eosina, Tricrómico Masson y la Inmuntinción CD31. Se obtuvo como resultado un aumento en la densidad vascular (DV) en ambos grupos y al compararlos se evidenció que la DV en los conejos que recibieron PRP fue estadísticamente mayores a los reportados en los conejos no tratados. Concluyéndose que existe una estimulación del proceso de angiogénesis debido a la incorporación de inmunomoduladores a través del PRP infiltrado en la zona lesionada, pudiendo utilizarse como terapéutica regeneradora de la mucosa oral.

Palabras Clave: Plasma Rico en Plaquetas, Angiogénesis, Mucosa oral, Histoquímica.



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DIRECCIÓN DE POSTGRADO
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA ORAL**



**MORPHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF THE
EFFECT OF PLATELET-RICH PLASMA ON THE ANGIOGENESIS OF
INJURED ORAL MUCOSA IN RABBITS**

Davide Antonio Mobili Rocaro
Marzo 2021

ABSTRACT

Angiogenesis is a fundamental process in tissue repair and regeneration, there are numerous therapies that seek to stimulate this mechanism, but Platelet Rich Plasma (PRP) has been considered one of the simplest, cheapest and safest alternatives. The present investigation had the general objective of evaluating the effect of platelet-rich plasma on the angiogenesis of the injured oral mucosa of rabbits by means of histochemical and immunohistochemical techniques, for that purpose there were six male New Zealand rabbits divided into 2 groups with an incision made in the oral mucosa, the experimental group was treated with (PRP) while the control group did not receive any treatment, both were evaluated after 7, 14 and 21 days, using the histological stains Hematoxylin / Eosin, Trichrome Masson and CD31 immunostaining. As a result, an increase in vascular density (VD) was obtained in both groups and when comparing them it was evidenced that the VD in the rabbits that received PRP was statistically higher than that reported in the untreated rabbits. Concluding that there is a stimulation of the angiogenesis process due to the incorporation of immunomodulators through the PRP infiltrated in the injured area.

Key words: Platelet Rich Plasma, Angiogenesis, Oral Mucosa

ÍNDICE GENERAL	Pg.
Primera portada	1
Segunda portada	2
Acta de Veredicto	3
Constancia de Culminación de Tutor	4
Dedicatoria	5
Agradecimientos	6
Resumen	7
Abstract	8
Índice General	9
Índice de Tablas	11
Índice de Figuras	12
CAPITULO I. EL PROBLEMA	
Planteamiento del Problema	13
Objetivos de la Investigación	17
Justificación de la Investigación	18
CAPITULO II. MARCO TEÓRICO	
Antecedentes	20
Bases Teóricas	24
Cuadro de Operacionalización de Variables	38

CAPITULO III. MARCO METODOLÓGICO

Diseño y tipo de investigación	39
Población y Muestra	39
Procedimiento	40
Método y Técnica de Recolección de Datos	45
Técnica de análisis e interpretación de los resultados	46

CAPÍTULO IV. PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS

Análisis e interpretación de los resultados	47
Discusión	58

CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones	62
Recomendaciones	63
REFERENCIAS	64

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	DESCRIPCIÓN	Pg.
1	Densidad vascular de los conejos control, evaluados mediante histología convencional	48
2	Densidad vascular de los conejos control, evaluados mediante Tricrómico de Masson	49
3	Densidad vascular de los conejos control, evaluados mediante Inmunohistoquímica CD31	51
4	Densidad vascular de los conejos experimentales, evaluados mediante histología convencional	53
5	Densidad vascular de los conejos experimentales, evaluados mediante Tricrómico de Masson	54
6	Densidad vascular de los conejos experimentales, evaluados mediante Inmunohistoquímica CD31	55
7	Comparación de la densidad vascular en mucosa oral de conejos tratados y no tratados con plasma rico en plaquetas	55
8	Densidad vascular de los conejos experimentales, evaluados mediante Inmunohistoquímica CD31	56
9	Comparación de la densidad vascular obtenida a través de la prueba U de Mann-Whitney	56

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	DESCRIPCIÓN	Pg.
1	Microfotografía mucosa oral de Conejo control 1. Coloración HE. Objetivo 40X. Puntos de mira negros: vasos sanguíneos	48
2	Microfotografía mucosa oral de Conejo control 3. Coloración Tricrómico de Masson. Objetivo 40X.	49
3	Microfotografía mucosa oral de Conejo control 3. Inmunohistoquímica CD31. Objetivo 40X	50
4	Microfotografía mucosa oral de Conejo experimental 1. Coloración HE. Objetivo 40X. Puntos de mira negros: vasos sanguíneos.	52
5	Microfotografía mucosa oral de Conejo experimental 3. Coloración Tricrómico de Masson. Objetivo 40X	53
6	Microfotografía mucosa oral de Conejo experimental 3. Inmunohistoquímica CD31. Objetivo 40X.	54

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del problema

La mucosa oral es un tejido que puede sufrir diversos daños en su integridad tisular, entre los factores que pueden afectarla se encuentran las enfermedades infecciosas, traumatismos, agentes físicos, agentes químicos o las heridas ocasionadas por las intervenciones quirúrgicas inherentes a la práctica odontológica.¹

Cabe destacar, que la mucosa oral tiene un alto nivel de regeneración y la mayoría de las veces logra repararse sin ocasionar problemas significativos. Sin embargo, la magnitud del daño, así como algunas condiciones propias del individuo, como lo son las enfermedades sistémicas y la higiene oral, juegan un papel fundamental en la reparación y regeneración tisular interactuando con el componente biológico e inmunológico del individuo.¹

Por esta razón, cuando el daño supera los mecanismos de restablecimiento de la integridad del tejido, la herida podría tardar en reparar el daño tisular, lo que ocasiona pérdida de la función e incluso infecciones oportunistas, lo que agrava los cuadros infecciosos y supone una condición más difícil de abordar desde el punto de vista clínico.^{1, 2}

En este sentido, son muchas las moléculas y células que participan en la regeneración de los tejidos bucales, la angiogénesis es un mecanismo ampliamente estudiado que contribuye a la reparación y regeneración aportando nuevos vasos sanguíneos que proporcionarán nutrientes y oxígeno al tejido que se está formando.²

Por esta razón, se han empleado en los últimos años técnicas de regeneración de tejidos que estimulan la reparación aportando factores de crecimiento y sustancias moduladoras del proceso regenerativo, entre las terapias más eficaces se encuentra el Plasma Rico en Plaquetas (PRP). Este tratamiento consiste en la aplicación de Plasma autólogo rico en factores de crecimiento y plaquetas que se integrarán al mecanismo de regeneración y la angiogénesis para brindar mejores resultados en el tratamiento de numerosas condiciones, tanto bucales como en otros tejidos.^{1,2}

Por consiguiente, en varios países se han realizado avances en cuanto a la regeneración tisular empleando factores de crecimiento autólogos aportados por plasma sanguíneo. Por ejemplo, en Estados Unidos, Europa y latinoamérica se han descrito los múltiples usos y beneficios que presenta el uso del PRP en diferentes procedimientos de cirugía maxilofacial, así como en el área de periodoncia, implantología e incluso en la cicatrización de heridas de donantes de injerto de piel.^{3,4,5}

En Argentina se ha estudiado el papel del Plasma rico en Factores de Crecimiento en la neovascularización de colgajos cutáneos, en donde se ha

demostrado mediante ensayos con biomodelos animales la eficacia de este tipo de tratamiento en la angiogénesis cutánea.⁶

Por otra parte, en Ecuador se han descrito los resultados postexodoncia de terceros molares con y sin aplicación de plasma rico en plaquetas, evidenciándose las ventajas que tiene la aplicación de esta técnica como terapia regeneradora de los tejidos bucales.⁷

De igual forma, a nivel periodontal se ha estudiado el uso del plasma rico en fibrina como tratamiento en el recubrimiento de recesiones gingivales, en donde se ha descrito la eficiencia de este procedimiento en el área de periodoncia, lo que ha llevado aún más a su empleo en las diversas especialidades odontológicas.⁸

A nivel nacional se han realizado investigaciones sobre el uso del plasma rico en plaquetas en la regeneración ósea de alvéolos postextracción, donde se obtuvo resultados igual de favorables que los que se han descrito a nivel internacional.⁹ Por su parte, se ha estudiado el análisis comparativo de la regeneración ósea obtenida con quitosano y Plasma Rico en Fibrina que demostró que este último produce una regeneración ósea guiada más rápida que el quitosano.¹⁰

La cicatrización y reparación de los tejidos bucales sigue siendo un factor de suma importancia en la recuperación del paciente debido a las complicaciones que pueden surgir si estos procesos no ocurren de forma adecuada o en el tiempo correcto. En Carabobo también se ha estudiado el empleo de plasma rico en plaquetas como regenerador tisular de la mucosa

periimplantar, concluyendo que su empleo acelera la regeneración ósea y la cicatrización de los tejidos involucrados en la colocación de implantes dentales.¹¹

En este orden de ideas, se debe considerar el empleo de terapias regenerativas que ayuden a acelerar los procesos de cicatrización y reparación tisular, debido a que una deficiencia en alguno de estos mecanismos puede ocasionar infecciones oportunistas, sobre todo en pacientes inmunosuprimidos o con alteraciones sistémicas, de igual manera se han descrito casos de alveolitis postextracción, osteonecrosis y complicaciones aún más severas que pueden llevar a verdaderas emergencias médicas, por lo que el empleo de PRP es una terapia muchas veces eficiente para prevenir estas complicaciones.^{7,9,11}

Una regeneración tisular interrumpida por factores internos o externos, puede ocasionar heridas expuestas al medio bucal y por consiguiente a numerosos microorganismos oportunistas. El elevado costo de los fármacos, así como de algunas terapias de regeneración tisular, han llevado al uso de alternativas más económicas como el plasma rico en plaquetas, ya que emplea plasma sanguíneo del propio paciente.^{9,11}

Por lo anteriormente expuesto surge la siguiente interrogante. ¿Cuál es el efecto del plasma rico en plaquetas sobre la angiogénesis de la mucosa oral lesionada de conejos?

Objetivo general

- Evaluar el efecto del Plasma Rico en Plaquetas sobre la angiogénesis de la mucosa oral lesionada de conejos mediante técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas

Objetivos específicos

- Identificar el estado de la angiogénesis de la mucosa oral lesionada de conejos mediante el conteo de vasos sanguíneos y determinación de la densidad vascular por técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas
- Determinar el estado de angiogénesis en la mucosa oral lesionada de conejos tratados con Plasma Rico en Plaquetas mediante el conteo de vasos y determinación de la densidad vascular sanguíneos por técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas
- Comparar el grado de angiogénesis en la mucosa oral lesionada de conejos tratados con Plasma Rico en Plaquetas y conejos no tratados, mediante el conteo de vasos sanguíneos por técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas

Justificación

La presente investigación sirvió para brindar aportes teóricos y experimentales en referencia a la aplicación del plasma rico en plaquetas y su efecto sobre el proceso de angiogénesis en tejidos bucales, para así dar a conocer la relación que existe entre este tratamiento y la formación de nuevos vasos sanguíneos que contribuyen en la regeneración de los tejidos, ya que la mayoría de los aportes que se han realizado se centran en estudios clínicos *in vivo* basados en evaluar la eficacia del tratamiento, más no se había profundizado sobre los mecanismos tisulares y moleculares involucrados en estudios experimentales y en consecuencia existe escasa información sobre la cantidad de vasos sanguíneos que pueden formarse una vez es estimulada la mucosa oral con el PRP.

De igual forma, se emplearon técnicas histológicas e inmunohistoquímica, lo cual aportó desde el punto de vista práctico conocimientos en relación a este tipo de pruebas y su aplicación en tejidos bucales.

Resultó factible ya que el protocolo a seguir permite la obtención de PRP de forma segura, eliminando las posibilidades de contaminación y reacciones alérgicas. Además, el costo de este procedimiento es bajo, fácil de realizar y replicable.

De igual forma, las técnicas inmunohistoquímicas empleadas permitieron conocer a mayor profundidad la relación existente entre el tratamiento con PRP y el proceso de angiogénesis, el cual no se había estudiado a profundidad de forma cuantitativa, ni tampoco en relación al tiempo de

aplicación, por lo que se dió a conocer de esta manera el número de vasos sanguíneos que se forman en la mucosa oral lesionada una vez que es tratada con PRP.

Por último, la investigación servirá de referencia para futuros investigadores que deseen trabajar con estas variables, aportando conceptos y teorías sobre el abordaje de esta temática.

Hipótesis de la investigación

El Plasma Rico en Plaquetas estimula la angiogénesis en la mucosa oral lesionada de conejos de Nueva Zelanda.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Antecedentes de la Investigación

A continuación, se presentan algunos estudios como referencia a la presente investigación.

En Alemania, se publicó en 2019 el secretoma de fibrina rico en plaquetas induce la activación angiogénica de tres dimensiones *in vitro*. Este estudio fue realizado en cultivo celular y los resultados mostraron un efecto mediado por Plasma Rico en Fibrina (PRF) sobre la inducción de angiogénesis en las Células Endoteliales (CE). Se promovió la formación de estructuras similares a microvasos cuando las CE se combinaron con PRF de bajo Fuerza de Centrifugación Relativa (FCR) en comparación con el grupo de control o PRF de FCR alto. El porcentaje del área de la luz vascular fue significativamente mayor en el PRF bajo en FCR, especialmente en el día 7, que coincidió con un factor de crecimiento estadísticamente significativamente mayor [factor endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento transformante β 1 (TGF- β 1) y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)] concentración medida en PRF de bajo RCF en comparación con PRF de alto RCF o grupo de control. En conclusión, la reducción de la RCF de acuerdo con el concepto de centrifugación a baja velocidad (LSCC) dio como resultado una mayor

liberación del factor de crecimiento y la formación de estructuras angiogénicas con monocultivo EC, lo que sugiere que la PRF puede ser una herramienta terapéutica altamente beneficiosa para aplicaciones de ingeniería de tejidos.¹²

En Ecuador, en el 2016 se realizó un estudio titulado efecto del Plasma Rico en Factores de Crecimiento en la cicatrización de heridas gingivales. Estudio experimental en cobayos. Su objetivo fue analizar el efecto del plasma rico en factores de crecimiento en la cicatrización de heridas gingivales realizadas en cobayos, a partir de un análisis histopatológico en función del tiempo. Enfocado a determinar el grado de resolución de la inflamación y la reepitelización a los 7 y 14 días, después de provocar las heridas gingivales. Los resultados no evidenciaron diferencias estadísticas significativas en la resolución de la inflamación a los 7 días y 14 días ($p=1$), y en la reepitelización a los 7 días ($p=1$) y 14 días ($p=1$); entre el grupo experimental y el grupo de control. Finalmente, se concluyó que, el plasma rico en factores de crecimiento no produjo ningún efecto en la cicatrización de heridas gingivales.¹³

Esta investigación sirve de aporte en relación al estudio histológico de muestras gingivales y sobre la aplicación de plasma rico en plaquetas como tratamiento regenerador de la mucosa oral.

De igual forma, se realizó en Perú un estudio experimental titulado Eficacia del plasma rico en plaquetas (PRP) en la cicatrización de heridas por quemaduras en ratas Holtzman, en el que contó con 23 animales de experimentación divididos en 3 grupos, 2 experimentales al que se le aplicó PRP y 1 grupo control. Se realizó el análisis histopatológico de cada herida de ambos grupos para evaluar la neovascularización, reepitelización, fibroplasia y los leucocitos después del sacrificio de los animales, obteniéndose como resultado diferencias significativas entre los factores evaluados en los 3 grupos. Concluyendo que el Plasma rico en plaquetas (PRP) es eficaz en la cicatrización de heridas por quemaduras en ratas Holtzman.¹⁴

Este trabajo sirve de aporte para la presente investigación ya que se tomó la conceptualización de las variables, así como la metodología de trabajo en cuanto a la manipulación, tratamiento y posterior análisis de los animales de experimentación.

Por otro lado, en Ecuador se investigó el plasma rico en factores de crecimiento en la neovascularización de colgajo cutáneos, donde se empleó como biomodelos a conejos albinos neozalandeses, obteniéndose como resultado que los valores medios obtenidos para vasos sanguíneos cuando se usa PRFC en los colgajos cutáneos demostró cifras promedio significativamente mayores ($p < 0,05$) que los controles desde el día 7.⁶

Este trabajo sirve como sustento a la presente investigación por el abordaje de la variable angiogénesis, su conceptualización y su medición en biomodelos animales.

Por último, en Venezuela un grupo de investigadores realizaron un estudio titulado Efectos tisulares del plasma rico en plaquetas en la mucosa periimplantar de un grupo de individuos sanos “*in vivo*”, con un tipo de investigación experimental, en la que concluyeron que el uso de PRP pareciera acelerar el proceso de cicatrización en el tejido conjuntivo periimplantar, evidenciado por la localización celular en la totalidad del epitelio de la mayoría de las mucosas tratadas con PRP ($p=0.04$) mediante la expresión del anticuerpo de Proliferación Celular (PCNA).¹¹

El aporte de esta investigación se centra en la aplicación de la metodología empleada para el abordaje de las variables, que emplearon pruebas de inmunohistoquímica para medir factores de crecimiento endoteliales a nivel tisular.

Bases teóricas

Plasma rico en plaquetas (PRP)

El plasma rico en plaquetas (PRP) se puede definir como la fracción de plasma autólogo que posee una concentración plaquetaria por encima de los valores basales (150.000-350.000/ μ L).^{15,16}

Éste se compone de suero con abundantes plaquetas y factores de crecimiento, estos elementos en conjunto son capaces favorecer la cicatrización, renovación y reparación del tejido.

Anudado a esto, el plasma rico en plaquetas posee elementos que inducen a varios procesos, entre ellos la angiogénesis, así mismo, puede que éste sea el factor más importante en la reparación o regeneración de la mucosa bucal. Para ello, se obtiene una muestra sanguínea utilizando el anticoagulante adecuado (citrato de sodio), la misma se somete a centrifugación y se obtiene el plasma sanguíneo. Una porción de éste es el que se emplea en diferentes terapéuticas regenerativas.¹⁵⁻¹⁸

En el año 1997 se describe el primer uso de un concentrado autólogo de plaquetas para la inducción del proceso de cicatrización tisular. Posterior a esto, diferentes estudios emplearon pegamento de fibrina autólogo para reconstrucciones maxilofaciales, y se concluyó que esta red de fibrina además de poseer propiedades osteoinductoras, contenían una gran variedad de factores de crecimiento, los cuales podían suponer una herramienta terapéutica interesante para promover los procesos de cicatrización y renovación tisular.¹⁵⁻¹⁸

La concentración de plaquetas que se encuentra en el PRP es aproximadamente de 2 a 4 veces superior a la concentración sérica normal de plaquetas. Del mismo modo, las plaquetas son fragmentos citoplasmáticos derivados de megacariocitos de médula ósea que son capaces de producir diversos factores de crecimiento e inmunomoduladores

que estimulan los procesos de cicatrización y regeneración tisular.

El PRP se utiliza como terapéutica regenerativa debido a su capacidad de aumentar la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis), estimulando la síntesis y diferenciación de células precursoras y liberando factores que estimulan la reproducción celular (fibroblastos y células endoteliales).^{19,20}

Mecanismo de acción del PRP

Las plaquetas tienen un rol fundamental en los procesos de regeneración tisular ya que son portadoras de factores de crecimiento y de otras proteínas contenidas en sus gránulos alfa. Estas sustancias serán aplicadas en los tejidos para contribuir con su reparación.

Del mismo modo, en este proceso existen moléculas encontradas en el plasma sanguíneo y las plaquetas que regulan activamente la migración (quimiotaxis), proliferación y diferenciación de las células que forman vasos sanguíneos, éstas incluyen factor de crecimiento de origen plaquetario (PDGF), transformación-beta (TGF-beta), fibroblástico (FGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y el más importante el factor estimulante del endotelio vascular (VEGF), factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF), factores de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I), factor de crecimiento epidérmico (EGF).^{18,19,20}

Obtención de Plasma Rico en Plaquetas

Existen diversas metodologías para la obtención de PRP, se han descrito las ventajas y desventajas de cada técnica.

Una vez obtenida la sangre se recolecta en tubos de ensayo con citrato de sodio al 3.8% y se centrifuga de acuerdo al protocolo escogido. El plasma obtenido se divide en 2 porciones, $\frac{3}{4}$ partes corresponden al Plasma Pobre en Plaquetas, mientras que $\frac{1}{4}$ parte representa el Plasma Rico en Plaquetas ubicado adyacente al paquete globular.^{16,18}

Fisiología plaquetaria

Las plaquetas, también llamado trombocitos, son fragmentos citoplasmáticos delimitados por una membrana además de anucleados. Es importante mencionar que derivan de los megacariocitos de la médula ósea, su función más conocida es la de formación del coágulo (hemostasia primaria), pero lo más importante es que tiene un papel en la inflamación, inmunidad, la progresión tumoral y la trombosis.

Éstas, estructuralmente se dividen en cuatro zonas, la zona periférica, que consiste en la membrana celular cubierta por una capa gruesa de glucocáliz. Luego la zona estructural, compuesta por el citoesqueleto que le da forma de disco a la plaqueta. Por otro lado, la zona membranosa que sirve como sitio de almacenamiento de iones de calcio.¹⁷⁻²⁰

Tienen un diámetro de 2 a 4 μm , su concentración normal en sangre oscila entre 150.000 y 350.000 unidades por microlitro. La vida media útil de

las plaquetas en humana es de 8 a 12 días, una vez pasado este tiempo, son eliminadas por el sistema de macrófagos tisulares.¹⁷⁻²¹

Angiogénesis

El término angiogénesis se refiere al proceso que conduce a la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura pre-existente. Este proceso involucra la migración y proliferación de células endoteliales, la formación y organización de células en estructuras tubulares que se unirán, para finalmente madurar en vasos sanguíneos estables.²²

Actualmente, se conocen los mecanismos moleculares involucrados en este proceso, el cual está mediado por una serie de factores de crecimientos que conducen a formación y proliferación celular para así formar los nuevos vasos sanguíneos. Este proceso puede ocurrir en situaciones fisiológicas como la reparación tisular, así como en procesos patológicos como el cáncer, el cual se vale del mismo para el crecimiento tumoral y la metástasis a distancia.^{22,23}

En este sentido, la angiogénesis es un proceso que se desarrolla durante toda la vida, que se evidencia en los procesos de remodelación, regeneración y reparación de tejidos, así como la maduración folicular, ovulación, ciclo menstrual, entre otros. Se identifican tres etapas que coexisten superpuestas.^{22,23}

-Primero ocurre la producción por parte de las células epiteliales del parénquima tisular de factores pro-angiogénicos.

-Posteriormente, los factores constituyentes de la matriz extracelular se encargan de inducir y regular el crecimiento vascular

-Luego, se determina la estructura definitiva remodelada del lecho vascular.

Seguido a esto, se finiquita el proceso angiogénico gracias a factores inhibidores de tal forma que, en la homeostasis vascular en condiciones normales, debe existir un equilibrio entre factores estimuladores y factores inhibidores.^{22,23}

Por el contrario, la arteriogénesis se define como la formación de arterias maduras y funcionales a través de la remodelación funcional de arteriolas interconectadas preexistentes y poco profundidas después de una oclusión de arterias de conductancia grande. A diferencia de la angiogénesis, ésta es principalmente estimulada por factores hemodinámicos, a pesar de ello, se ha comprobado que la angiogénesis inducida por el suministro de factores de crecimiento como el VEGF promueve el agrandamiento de las arterias colaterales. La capacidad de la expansión microvascular mediante la administración del factor de crecimiento para impulsar la arteriogénesis a nivel cardíaco se ha demostrado claramente en modelos animales.^{22,23}

CD31 como marcador de vasos sanguíneos

A nivel molecular, los vasos sanguíneos expresan diversos antígenos que permiten su reconocimiento inmunohistoquímico, uno de ellos, el más estudiado es el CD31. La molécula de adhesión de plaquetas / células endoteliales-1 (PECAM-1) se describió originalmente a mediados de la

década de 1980 como el antígeno de diferenciación CD31 expresado en la superficie de los granulocitos, monocitos y plaquetas humanos. Al mismo tiempo, varios otros autores informaron de forma independiente la presencia de un antígeno de la superficie de las células endoteliales, conocido como glucoproteína (GP) IIa [5], GPIIa', antígeno hec7 y EndoCAM. El cribado de una biblioteca de expresión de ADNc de células endoteliales con un anticuerpo específico para proteínas de membrana integral de plaquetas condujo a la clonación de una proteína de 130 kDa que tiene homología con miembros de molécula de adhesión celular clonada recientemente de la superfamilia del gen de inmunoglobulina (Ig), y la proteína se denominó plaqueta / molécula de adhesión celular endotelial-1 (PECAM-1) para denotar sus orígenes de clonación, su pertenencia a la familia y su función probable. La caracterización inmunoquímica y bioquímica, junto con su posterior clonación de dos bibliotecas de leucocitos diferentes establecieron que la proteína de unión de células endoteliales, el antígeno de diferenciación hematopoyética CD31 y el PECAM-1 de plaquetas eran entidades idénticas, lo que facilitaba la investigación del papel que esto desempeñaba. La adhesión celular y la molécula de señalización juegan en la biología de la sangre y las células vasculares.^{20,24,25}

Mucosa oral

La cavidad oral se encuentra tapizada por una mucosa masticatoria, una mucosa de revestimiento y una mucosa especializada. Las células

epiteliales están unidas entre sí para formar una barrera de protección entre el medio bucal y el tejido conectivo subyacente. Este epitelio es plano estratificado en líneas generales, pero puede encontrarse no queratinizado, queratinizado o paraqueratinizado de acuerdo al sitio donde se ubique.²⁶

De acuerdo a esto, el epitelio de la mucosa oral está constituido fundamentalmente por dos poblaciones celulares:

A.- Población intrínseca o propia del epitelio. Este grupo de células se denominan queratinocitos y representan el 90% del total de células presentes en el epitelio, su nombre se debe a la capacidad que tienen de queratinizarse, éstas sufren una migración desde el estrato basal hasta la superficie del epitelio, incluso en ocasiones se convierten en escamas constituidas por células queratinizadas y anucleadas.²⁶

B.- Población extrínseca: Esta población celular está constituida por células que no son propias del epitelio y que se pueden clasificar en permanentes y transitorias.²¹

Población extrínseca permanente: Representada por cerca del 9% de la población celular del epitelio y constituida por:

1. Melanocitos: Microscópicamente son células claras, de núcleo pequeño, con prolongaciones alargadas de aspecto cilíndrico, el cuerpo de la célula se encuentra en el estrato basal. poseen abundantes gránulos precursores de melanina.²¹

2. Células de Merkel: Estas células tienen función sensorial, a diferencia de los melanocitos carecen de prolongaciones de tipo dendrítico y se encuentran entre las células de la capa basal del epitelio.
3. Células de Langerhans: Son células presentadoras de antígeno, frecuentemente aparecen en el estrato espinoso del epitelio. Poseen prolongaciones de morfología dendrítica, y en su interior poseen gránulos de Birbeck.²⁶

Población extrínseca transitoria: Representa cerca del 1% de las células del epitelio, se encuentra constituida por células sanguíneas, como granulocitos, linfocitos y monocitos que pueden infiltrarse ocasionalmente en el epitelio bucal especialmente en procesos inflamatorios.²⁶

Clasificación histológica de la mucosa oral

De acuerdo a la región de la cavidad oral y al grado de queratinización de las células epiteliales se pueden diferenciar tres tipos diferentes de epitelio:

A.- Epitelio plano estratificado queratinizado u ortoqueratinizado, en el que se diferencian cuatro estratos: basal, espinoso, granuloso y córneo, este último está constituido por células queratinizadas y anucleadas.²⁶

B.- Epitelio plano estratificado paraqueratinizado, con características similares en los estratos basal y espinoso, mientras que el estrato granuloso se encuentra poco desarrollado y el estrato córneo presenta células

superficiales que conservan sus núcleos.²⁶

C.- Epitelio plano estratificado no queratinizado, en el que se diferencian tres estratos, el estrato basal, intermedio y superficial, no posee estrato córneo.²⁶

Membrana basal de la mucosa oral

La membrana basal separa el epitelio del corion, posee dos regiones: la lámina basal, sintetizada por las células del epitelio y la lámina reticular, sintetizada por las células del tejido conectivo.²⁶

- Lámina basal: Constituida por una doble lámina rectilínea de distinta densidad, la lámina densa rica en colágeno IV y heparán, y la lámina lúcida que contiene laminina y entactina.
- Lámina reticular: Constituida por fibras en una matriz de glucosaminoglucanos, las cuales son:

- Fibras de anclaje: Son fibras de colágeno VII que finalizan en la lámina densa y forman bucles en las placas de anclaje.

- Fibras reticulares: Se encuentran compuestas por reticulina (colágeno tipo I y III). Se encuentran distribuidas paralelamente al epitelio entre las fibras de anclaje, mientras que la fibronectina ayuda a fijar la lámina reticular a la lámina basal.²¹

Lámina propia o corion de la mucosa oral

Se encuentra constituida por tejido conectivo laxo (areolar) que brinda sostén y nutrición al epitelio, promovido por la presencia de papilas que llevan vasos

sanguíneos y nervios hacia el epitelio. Este tejido conectivo puede ser denso, semidenso o laxo de acuerdo a la región de la cavidad oral.²⁶

En la lámina propia se encuentran fibroblastos, linfocitos, macrófagos, células cebadas y células plasmáticas, además de fibras y sustancia fundamental.²⁶

Vasos sanguíneos de la lámina propia

En esta zona se encuentran vasos sanguíneos de origen arterial que se distribuyen en una serie de redes capilares próximos al epitelio, la red subpapilar y las asas capilares primarias, secundarias y terciarias distribuidas en el eje de las papilas. Estas redes son de suma importancia ya que permiten la nutrición del epitelio aportando oxígeno, glucosa y otras sustancias necesarias para el metabolismo celular.²⁶

Clasificación topográfica

La estructura histológica de la mucosa oral varía por la adaptación funcional en las diferentes regiones de la cavidad oral, por lo que se diferencian tres tipos:

A.- Mucosa de masticatoria: presente en las encías y paladar duro. Posee un epitelio plano estratificado queratinizado y en algunas regiones paraqueratinizado.

B.- Mucosa especializada: encontrada en los labios, carrillos, superficie de la mucosa alveolar, piso de boca, cara ventral de la lengua y paladar blando. Posee un epitelio plano estratificado no queratinizado.

C.- Mucosa especializada: asociada a la sensación del gusto, se encuentra en la cara dorsal de la lengua. Contiene papilas y corpúsculos gustativos.²⁶

Reparación de heridas en la mucosa oral

Una vez que la mucosa oral sufre una lesión ésta comienza un proceso reparativo de forma inmediata con la finalidad de restaurar la integridad del tejido. Sin embargo, esto dependerá del tipo, tamaño y profundidad de la lesión. En este sentido la cicatrización se puede clasificar en:

- Cicatrización primaria (por primera intención)
- Cicatrización secundaria (por segunda intención).^{27,28}

Proceso de reparación de heridas

Hemostasia: En primer lugar, ocurre la vasoconstricción con la finalidad de disminuir la luz de los vasos sanguíneos y de esta manera reducir la pérdida sanguínea, posterior a esto las plaquetas se adhieren y se agregan para formar el tapón hemostático primario, de igual forma, una serie de proteínas se activarán con la finalidad de transformar el fibrinógeno en fibrina y de esta manera establecer el coagulo sanguíneo. A su vez se liberan citoquinas y factores de crecimiento que estimulan la migración celular al lecho de la lesión para la constitución del tejido nuevo.^{27,28}

Inflamación: El proceso inflamatorio involucra una serie de moléculas y células, los primeros eventos de la hemostasia estimulan la liberación de

prostaglandinas, histamina y otras sustancias con función vasoactiva, por lo que ocurre una vasodilatación local y un aumento en la permeabilidad capilar. Aunado a esto, los polimorfonucleares migran hacia el sitio de la lesión con la finalidad de fagocitar las bacterias y los restos de tejido dañado. De igual forma, los monocitos se diferencian en macrófagos de acuerdo al tejido donde actuarán, incrementan el proceso de fagocitosis e inician el recambio del coágulo previamente formado.^{27,28}

Proliferación tisular: Este proceso comienza alrededor del tercer día y puede tener una duración de dos a cuatro semanas. En este proceso ocurre la migración de fibroblastos estimulados por factores de crecimiento como TGF- α y PDGF, de igual forma, ocurre la deposición de la matriz extracelular y la formación de tejido conjuntivo altamente vascularizado (tejido de granulación).

En esta etapa se presenta una angiogénesis como un proceso independiente a partir de vasos sanguíneos preexistentes estimulada por factores de crecimiento tales como activada por Factor Estimulante del Endotelio Vascular (VEGF) y el Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF- β). Mientras que la epitelización de la herida ocurre en la etapa final de esta fase.^{27,28}

Remodelación: El proceso de remodelación se da lugar en el transcurso de varias semanas, para ello, se sintetiza y remodela la matriz extracelular conjuntamente con la formación del tejido de granulación y continúa durante

un periodo prolongado, y alcanza un estado estacionario a los 21 días posteriores a la lesión.^{28,28}

Cabe resaltar, que la contracción de la herida está influenciada por el TGF- β , Factor Derivado de las Plaquetas y el Factor de Crecimiento Básico de los Fibroblastos, por lo que se produce las interacciones entre los fibroblastos y la matriz extracelular circundante. El colágeno es degradado por metaloproteinasas producidas por los fibroblastos y leucocitos que se encuentran en el sitio de la lesión, las fibrillas se reordenan y de esta manera disminuye la proporción de colágeno tipo III mientras que se incrementa el colágeno tipo I. Las fibras se organizan de forma desordenada, pero con el tiempo comienzan a formarse uniones interfibrillas, aumentándose el grosor.^{20,27,28}

Tipos de cicatrización

Cicatrización primaria: Este proceso ocurre luego de la interrupción de la continuidad de la membrana basal y del tejido conectivo subyacente. En este sentido, se produce un equilibrio entre la proliferación celular, síntesis de colágeno y metabolismo enzimático. Por consiguiente, algún mecanismo mecánico como la sutura aproxima los bordes de la herida y de esta manera la herida cierra.²⁷

Cicatrización secundaria: En este caso la pérdida de tejido blando es extensa, y por esta razón la regeneración no puede ocurrir por sí sola y es necesario el crecimiento de un tejido de granulación en los bordes de la

herida, aunado a una acumulación de matriz extracelular con la fijación de colágeno. Por este proceso ocurre una contracción de la herida y posteriormente la epitelialización.²⁷

Tratamientos de los defectos en mucosa oral

Las lesiones de los tejidos blandos son tratados con autoinjertos, este proceso presenta limitaciones a pesar de que no se produzca rechazo. En este sentido, en casos donde sea necesario la obtención de gran cantidad de tejido puede haber limitaciones en cuanto a la cicatrización secundaria en el donante o a la disponibilidad de tejido lo cual puede llevar a tomar tejido de otras zonas del cuerpo.²⁹

Cuadro de Operacionalización de Variables

Efecto del PRP sobre la angiogénesis de la mucosa oral lesionada de conejos de Nueva Zelanda			
VARIABLE	DIMENSIONES	INDICADORES	INSTRUMENTO
PRP	Tiempo de Acción	Tratados No tratados 7 días 14 días 21 días	Ficha de Registro
Angiogénesis de la mucosa oral	Densidad Vascular	Vasos sanguíneos /mm ² Vasos sanguíneos /mm ² marcador CD31 Vasos sanguíneos /mm ² HQ	Ficha de Registro

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo y diseño de investigación

La presente investigación se enmarcó en un enfoque cuantitativo, de tipo experimental. Se define como cuantitativa ya que utiliza la recolección de datos para probar hipótesis con base en la medición numérica y el análisis estadístico y explicativo, ya que responde a las causas de los eventos físicos.

También se considera experimental, ya que hubo manipulación directa de las variables, donde se analizó el efecto del plasma rico en plaquetas sobre la angiogénesis de la mucosa oral.³⁰

Población y muestra

Se utilizaron 06 conejos Nueva Zelanda, machos con 3 meses de edad, con pesos comprendidos entre 1 a 1,2 Kg. Los animales se alojaron en la Universidad Arturo Michelena, en jaulas individuales con comida y agua a voluntad. Cada conejo fue evaluado una sola vez para evitar alteraciones en los resultados y el sufrimiento del animal.

Los conejos se distribuyeron de la siguiente manera:

Grupo control (Sin PRP)	Grupo experimental (Con PRP)
C1: Evaluado a los 7 días *	E1: Evaluado a los 7 días*
C2: Evaluado a los 14 días*	E2: Evaluado a los 14 días*
C3: Evaluado a los 21 días*	E3: Evaluado a los 21 días*

* De haberse realizado la injuria

Consideraciones bioéticas

Los conejos fueron aportadas por la Dirección de Investigación y Producción Intelectual de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Carabobo a través de su Bioterio Central, con aprobación del Comité de Bioética de dicha Dirección, en concordancia con la Ley para la Protección de la Fauna Doméstica Libre y en Cautiverio de la República Bolivariana de Venezuela³¹, al igual que la normativa internacional que rige la amteria³²⁻³⁵ y apegado a lo establecido en el Código de Ética para la Vida³⁶, los animales fueron sometidos al mínimo sufrimiento y su manipulación estuvo supervisada por la Dra. Silvia Guidotti Directora del Bioterio Central.

Procedimientos

- **Lesión en la mucosa oral**

Los conejos fueron sometidos a una incisión quirúrgica en la mucosa oral con la finalidad de ocasionar una lesión con una extensión de 1 mm tomando como referencia la encía del incisivo inferior izquierdo, para lo cual se empleó una hoja de bisturí número 15 con su respectivo mango.³⁷

- **Obtención y aplicación de Plasma Rico en Plaquetas**

Se anestesió cada conejo del grupo experimental con *Valium* y *Ketamina* ambas al 10% (1cc/Kg) vía intramuscular, se esperó 10 a 15 minutos. A continuación se procedió a la obtención de muestra sanguínea vía intracardíaca, palpando el cartílago xifoides e introduciendo una inyectora con aguja 21G x 25 mm, se obtuvo un volumen de sangre arterial de 5 mL, la cual se recolectó en tubos de ensayo con anticoagulante citrato de sodio al 3.8% en una proporción 9:1 y se centrifugaron por 10 minutos a 1800 rpm en dos ciclos.

Luego del centrifugado, se procedió a tomar con una inyectora con aguja de 30G el PRP que corresponde a la fase más próxima del paquete globular y que representa la $\frac{1}{4}$ parte del plasma total que corresponde a 1 mL. Seguidamente se inyectó el PRP en zonas adyacentes a la lesión, utilizando la misma inyectora con el bisel orientado a la mucosa, dosificando cantidades mínimas hasta observar una zona protuberante al menos de 1 mm de espesor.^{16,37}

Obtención de Tejidos de la Mucosa Oral

Después de transcurrido el tiempo estipulado (7, 14, 21 días) se procedió a tomar la muestra de tejido, para ello se anestesiaron los conejos según procedimiento descrito y se tomó el tejido del sitio donde se inyectó el PRP, las muestras de tejido obtenidas fueron colocadas en envases identificados con solución de formaldehído al 10% para su preservación por 24 horas

logrando así, la fijación del tejido, es decir, conservar las estructuras celulares como estuvieran *in vivo*.³⁸

- **Procesamiento histológico**

Para el procedimiento histológico, las muestras de tejido se colocaron en *cassettes* identificados, y se lavaron con abundante agua para retirar el formol, inmediatamente los *cassettes* se colocaron en un procesador automático, donde los tejidos se introdujeron en varias concentraciones de alcohol desde 80 al 100% para deshidratar, eliminando así el agua y sustituirla por parafina líquida. Luego se pasaron por dos baños de xilol, el cual sirve como intermediario entre el alcohol y la parafina ya que es miscible en ambas, y por último se procedió a la inclusión con parafina, cuya función es rellenar los espacios vacíos donde se encontraba xilol y endurecer el tejido.

Una vez obtenidos los bloques de tejidos en parafina, se procedió a realizar los cortes, en la cual se utilizó un micrótopo de rotación marca *Leica modelo RM 2125*, en el cual se realizaron cortes de 4 μ de espesor y se extendieron en el baño de flotación para luego montar en láminas portaobjetos silanizadas y llevarlas a la estufa *Quincy Lab In* a 60°C, por una hora.

Para la coloración con hematoxilina y eosina se desparafinó con xilol por 5 minutos, y baños de alcohol con concentraciones decrecientes, de 100%, 90% y 80% por tres 3 minutos cada uno, luego se terminó de hidratar

sumergiendo la gradilla repetidas veces en agua destilada, hasta no ver rastros de alcohol.

Inmediatamente, se colocó en eosina por cinco 5 minutos, al pasar este tiempo se llevó a agua destilada para la diferenciación del colorante, luego sumergidas en la hematoxilina. Posterior a ello, se colocó en alcohol con concentraciones crecientes de 80%, 90% y 100% por 3 minutos cada uno y 2 baños de xilol por 5 minutos cada uno. Finalmente se procedió al montaje y secado para la evaporación del xilol y se observaron con el microscopio óptico.³⁹

- **Histoquímica con Tricrómico de Masson**

Esta técnica es útil para observar las fibras de colágenos y el tejido conectivo en general, se utilizará el protocolo modificado por Serxio Fernández Fidalgo. En primero lugar se desparafina las muestras y se pasan 5 minutos en hematoxilina férrica de *Weigert*, posteriormente por agua corriente para diferenciación y 3 minutos por agua destilada.

Una vez realizado esto se procedió a sumergir por 5 minutos en fucsina-escarlata y luego 2 minutos en agua destilada. Al término de este paso se llevará 15 minutos en ácido fosfomolibdico al 5%. Posteriormente, se llevó 10 minutos con verde luz al 2% y unos segundos en agua destilada, para luego diferenciar con ácido acético al 1% y realizar un deshidratado rápido, en

etanol de graduación creciente: 80%, 96% y 100%. Por último, 2 baños de xilol, 10 minutos cada uno y se procedió al montaje de las láminas.⁴⁰

- **Inmunohistoquímica: Marcaje de CD31**

Las secciones fueron sometidas a recuperación antigénica en microondas con una solución tampón de citrato 10 mM, pH 6, luego fueron tratadas con peróxido de hidrógeno al 3 % en Tampón buffer salino (PBS durante 20 minutos. Posteriormente, se procedió al bloqueo de anticuerpos inespecíficos. Se incubó en cámara húmeda a 4 °C con el anticuerpo primario anti-CD31, diluido 1/100 y luego se empleó el anticuerpo secundario. El cromógeno diaminobencidina (*DAB Cell Marque, USA*) fue utilizado para revelar las proteínas inmunorreactivas. Finalmente, se contrastó con hematoxilina de *Mayer*.^{41,42}

- **Contaje de vasos sanguíneos**

Las láminas obtenidas fueron analizadas en microscopio óptico con cámara digital acoplada. Los vasos sanguíneos fueron contados haciendo uso del programa *ImageJ*, de dominio público, programado en Java y desarrollado en el *National Institutes of Health*, que sirve para el procesamiento de imágenes digitales en medicina y otras áreas. De esta manera se obtuvo la densidad vascular, es decir, la cantidad de vasos sanguíneos por superficie.

$$\text{Densidad vascular} = \frac{\text{Número de vasos sanguíneos}}{\text{Superficie de tejido}}$$

De esta forma se tomaron en cuenta los siguientes indicadores:

- Número de vasos sanguíneos por superficie (/mm²)
- Número de vasos sanguíneos marcados con CD31 por superficie (/mm²)

Método y Técnica de Recolección de Datos:

Se utilizó una ficha de registro, donde se asentaron las características de histológicas y el número de vasos sanguíneos marcados por inmunohistoquímica con la finalidad de evaluar la angiogénesis de la mucosa oral, la cual fue validada por juicio de expertos.

FICHA DE REGISTRO

1	2	3	4	5	6
CONEJO	PRP	TIEMPO	Vasos sanguíneos /mm²	Vasos sanguíneos /mm² HQ	Vasos sanguíneos /mm² marcador CD31
CONTROL 1	NO	7 DÍAS			
EXERIMENTAL 1	SÍ	7 DÍAS			
CONTROL 2	NO	14 DÍAS			
EXERIMENTAL 2	SÍ	14 DÍAS			
CONTROL 3	NO	21 DÍAS			
EXERIMENTAL 3	SÍ	21 DÍAS			

HQ: TÉCNICA HISTOQUÍMICA DE COLORACIÓN TRICRÓMICO DE MASSON

$$\text{Densidad vascular} = \frac{\text{Número de vasos sanguíneos}}{\text{Superficie de tejido}}$$

- **Técnica de análisis e interpretación de los resultados**

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante estadística descriptiva, distribución de frecuencias y medidas de tendencia central para cada las variables. Todos los datos obtenidos se compilaron en *Excel* y se procesaron mediante el programa estadístico *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versión 25. Se empleó la prueba de U de Mann-Whitney (también llamada de Mann-Whitney-Wilcoxon, prueba de suma de rangos Wilcoxon, o prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney) la cual es una prueba no paramétrica aplicada a dos muestras independientes. Es considerada la versión no paramétrica de la prueba "t" de Student. Se usa para comprobar la heterogeneidad de dos muestras ordinales.

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

A continuación, se presentan los resultados obtenidos posteriores a la fase experimental de la investigación. Para ello se realizó un estudio morfológico utilizando 3 técnicas, la coloración de rutina (Hematoxilina/Eosina), la coloración especial Tricrómico de Masson y por último el análisis inmunohistoquímico con el marcador CD31 específico para vasos sanguíneos.

1. ESTUDIO DE LA VASCULARIZACIÓN DE LA MUCOSA ORAL DE CONEJOS CONTROL

a. Histología convencional (Hematoxilina/Eosina)

En primer lugar, se puede apreciar en la **Figura 1** las características histológicas de la mucosa oral lesionada del conejo control 1, evaluado a los 7 días posteriores a la injuria realizada, en esta se señala la vasculatura propia de este tejido.

Figura 1. Microfotografía mucosa oral de Conejo control 1. Coloración HE. Objetivo 40X. Puntos de mira negros: vasos sanguíneos.

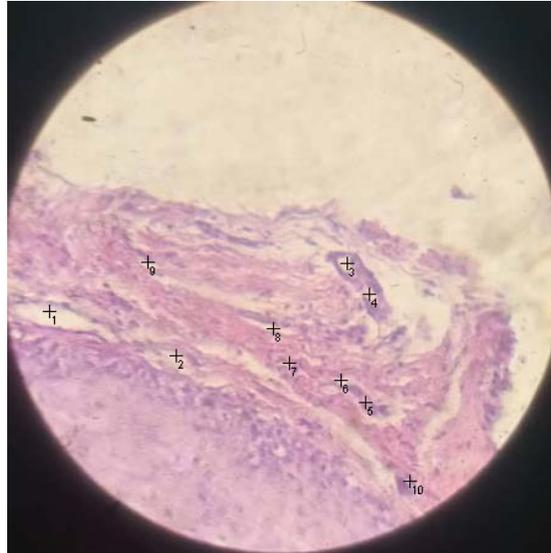


Tabla 1: Densidad vascular de los conejos control, evaluados mediante histología convencional

Conejo	Tiempo^a	Vasos sanguíneos /mm²
Control 1	7 días	20,8
Control 2	14 días	29,16
Control 3	21 días	39,58

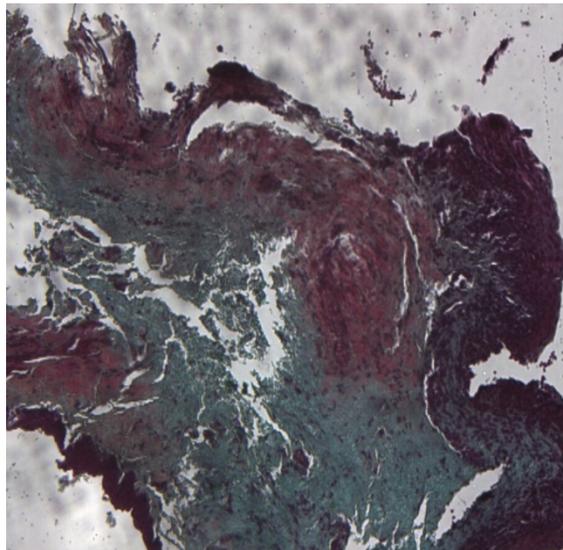
^aDe evaluación posterior a la injuria realizada

Se puede apreciar en la **Tabla 1** la evolución creciente del número de vasos sanguíneos a medida que transcurre el tiempo luego de realizada la lesión en la mucosa que ocasiona una serie de eventos histológicos y

bioquímicos que tienen como finalidad el restablecimiento de la integridad del tejido.

b. Tricrómico de Masson

Figura 2. Microfotografía mucosa oral de Conejo control 3. Coloración Tricrómico de Masson. Objetivo 40X.



En la **Figura 2** destaca la coloración especial de las fibras de colágeno pertenecientes al tejido conectivo, lo que permite una mejor evaluación y conteo de los vasos sanguíneos encontrados en esta zona de la mucosa.

Tabla 2: Densidad vascular de los conejos control, evaluados mediante Tricrómico de Masson

Conejo	Tiempo^a	Vasos sanguíneos /mm²
Control 1	7 días	25
Control 2	14 días	31,25
Control 3	21 días	45,83

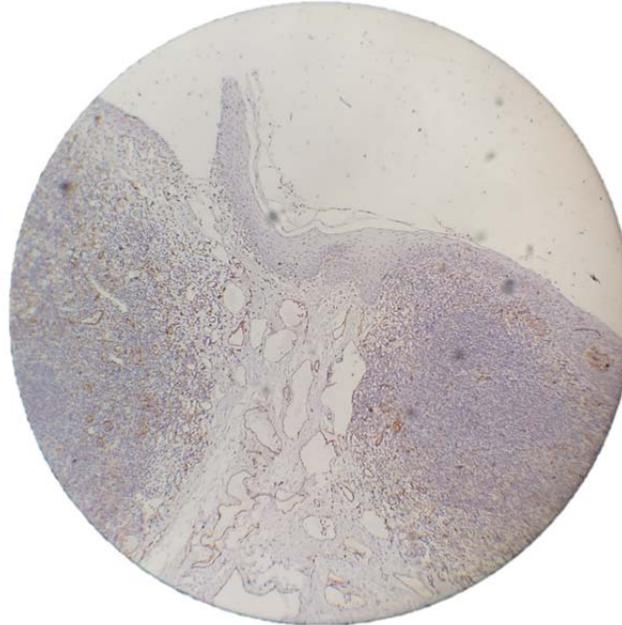
^aDe evaluación posterior a la injuria realizada

Como señala la **Tabla 2** el número de vasos sanguíneos aumenta progresivamente al paso del tiempo, al igual que lo analizado a través de la coloración de rutina, sin embargo, en la técnica de Tricrómico de Masson existe una ligera variación en la cantidad de vasos sanguíneos con respecto a la técnica convencional, esto debido a que resulta más fácil la evaluación por el contraste de colores que se obtienen de la aplicación de esta coloración especial.

c. Inmunohistoquímica CD31

De igual forma, se aplicó la inmunotinción con el marcador CD31, el cual es específico para la identificación de vasos sanguíneos, ya que localiza esta molécula que se expresa a nivel del endotelio vascular.

Figura 3. Microfotografía mucosa oral de Conejo control 3. Inmunohistoquímica CD31. Objetivo 40X.



En la imagen microscópica presentada en la **Figura 3** se observan las células endoteliales de color pardo, lo que permite una mejor identificación y conteo de las mismas, es por ello que es la mejor técnica para la determinación de la densidad vascular de las 3 empleadas en este estudio.

Tabla 3: Densidad vascular de los conejos control, evaluados mediante Inmunohistoquímica CD31

Conejo	Tiempo^a	Vasos sanguíneos /mm²
Control 1	7 días	31,25
Control 2	14 días	39,58
Control 3	21 días	50

^aDe evaluación posterior a la injuria realizada

El comportamiento de la angiogénesis a lo largo del tiempo se puede apreciar en la **Tabla 3**, donde se realizó contaje específicamente de las estructuras morfológicas marcadas con CD31, por lo que hay mayor especificidad en los resultados.

2. ESTUDIO DE LA VASCULARIZACIÓN DE LA MUCOSA ORAL DE CONEJOS EXPERIMENTALES

a. Histología convencional (Hematoxilina/Eosina)

El análisis de la densidad vascular en los conejos tratados con plasma rico en plaquetas mostró un aumento considerable en el número de vasos sanguíneos por superficie, lo que sugiere que este tratamiento estimula los mecanismos bioquímicos y morfológicos que conllevan a la angiogénesis en la mucosa oral.

Figura 4. Microfotografía mucosa oral de Conejo experimental 1. Coloración HE. Objetivo 40X. Puntos de mira negros: vasos sanguíneos.

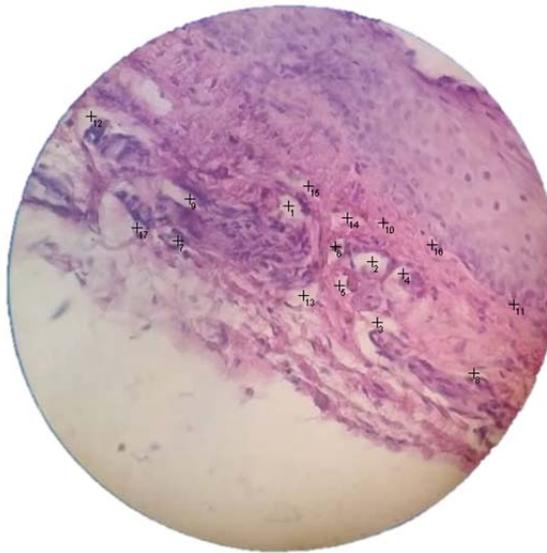


Tabla 4: Densidad vascular de los conejos experimentales, evaluados mediante histología convencional

Conejo	Tiempo ^a	Vasos sanguíneos /mm ²
Experimental 1	7 días	35,4
Experimental 2	14 días	50
Experimental 3	21 días	75

^aDe evaluación posterior a la injuria realizada

b. Tricrómico de Masson

Figura 5. Microfotografía mucosa oral de Conejo experimental 3. Coloración Tricrómico de Masson. Objetivo 40X.

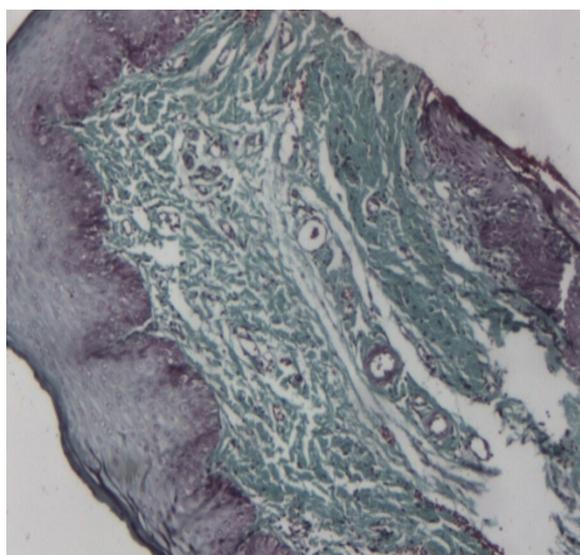


Tabla 5: Densidad vascular de los conejos experimentales, evaluados mediante Tricrómico de Masson

Conejo	Tiempo ^a	Vasos sanguíneos /mm ²
Experimental 1	7 días	37,5
Experimental 2	14 días	56,25
Experimental 3	21 días	79,16

^aDe evaluación posterior a la injuria realizada

c. Inmunohistoquímica CD31

Figura 6. Microfotografía mucosa oral de Conejo experimental 3. Inmunohistoquímica CD31. Objetivo 40X.

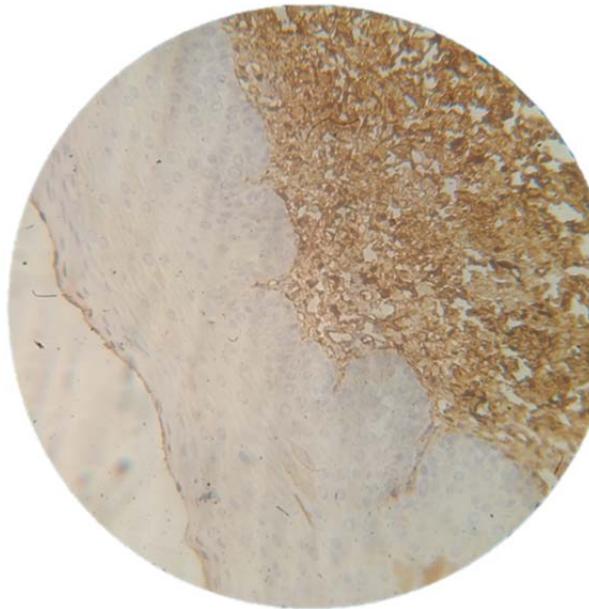


Tabla 6: Densidad vascular de los conejos experimentales, evaluados mediante Inmunohistoquímica CD31

Conejo	Tiempo^a	Vasos sanguíneos /mm²
Experimental 1	7 días	37,5
Experimental 2	14 días	60,41
Experimental 3	21 días	83,3

^aDe evaluación posterior a la injuria realizada

3. COMPARACIÓN DE LA DENSIDAD VASCULAR EN MUCOSA ORAL DE CONEJOS TRATADOS Y NO TRATADOS CON PLASMA RICO EN PLAQUETAS

Tabla 7: Comparación de la densidad vascular en mucosa oral de conejos tratados y no tratados con plasma rico en plaquetas

Conejo	Tiempo^a	Vasos sanguíneos /mm²
Experimental 1	7 días	37,5
Experimental 2	14 días	56,25
Experimental 3	21 días	79,16

^aDe evaluación posterior a la injuria realizada

Tabla 8: Densidad vascular de los conejos experimentales, evaluados mediante Inmunohistoquímica CD31

Conejo	PRP	Tiempo	Vasos sanguíneos /mm²	Vasos sanguíneos /mm² HQ	Vasos sanguíneos /mm² marcador CD31
Control 1	No	7 días	20,8	25	31,25
Experimental 1	Sí	7 días	35,4	37,5	37,5
Control 2	No	14 días	29,16	31,25	39,58
Experimental 2	Sí	14 días	50	56,25	60,41
Control 3	No	21 días	39,58	45,83	50
Experimental 3	Sí	21 días	75	79,16	83,3

Tabla 9: Comparación de la densidad vascular obtenida a través de la prueba U de Mann-Whitney

Tiempo	Z	p
7 días	1.993	0,046
14 días	1.993	0,046
21 días	1.964	0,050

Considerando un alfa= 0,05

De acuerdo a los resultados obtenidos en la prueba estadística de U de Mann-Whitney los valores correspondientes a la densidad vascular de los conejos experimentales evaluados a los 7, 14 y 21 días son estadísticamente mayores a los de sus respectivos controles.

Discusión

En la presente investigación se realizó el análisis del comportamiento de la mucosa oral lesionada al ser sometida a tratamiento con Plasma Rico en Plaquetas, estudiándose específicamente el fenómeno de angiogénesis, el cual es un evento fisiológico importante en la regeneración de los tejidos lesionados. Para esta investigación se contó con tres técnicas, la coloración de rutina con hematoxilina/eosina, la coloración especial Tricrómico de Masson y la técnica inmunohistoquímica con anticuerpos Anti-CD31.

En este sentido, la valoración de la densidad vascular entre las técnicas resultó diferente, obteniéndose ligera diferencia entre las 3. Al tomar como valor más preciso los obtenidos por inmunohistoquímica, donde se marcaron sólo células que expresaran esta proteína, siendo específico para identificar células endoteliales, se identificó que la técnica Tricrómico de Masson resultó con valores más cercanos a los obtenidos por inmunohistoquímica que la coloración de Hematoxilina/eosina.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Cáseres y colaboradores en su estudio titulado Utilidad de Tinción de Tricrómico de Masson en la Cuantificación de Densidad Media Vascular en Mucosa Oral Normal, Displasia Epitelial y Carcinoma Oral de Células Escamosas, donde encontraron que al comparar la Densidad Media Vascular de todos los

pacientes mediante la inmunohistoquímica CD31 y la tinción Tricrómico de Masson, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, obteniéndose un grado correlación moderado concluyendo que La tinción con TM podría representar hoy en día una alternativa viable y accesible para la evaluación de la DMV, siendo comparable a la inmunohistoquímica contra CD31.⁴³

Al evaluar la densidad vascular en la mucosa oral de los conejos control, se evidenció que esta variable aumentó conforme transcurrían los días, obteniéndose 20,8/mm² a los 7 días, 29,16/mm² a los 14 días y 39,58/mm² a los 21 días. Esto se explica debido a que una serie de mecanismos fisiológicos se ponen en marcha una vez que es lesionada la integridad tisular de la mucosa, uno de estos es la angiogénesis, proceso mediante el cual se generan nuevos vasos sanguíneos que aportarán nutrientes, células de defensa y otros elementos que contribuyen a la regeneración del tejido lesionado.

Lo anterior mencionado se relaciona con los resultados reportados por Aburto en su investigación titulada Eficacia del plasma rico en plaquetas (PRP) en la cicatrización de heridas por quemaduras en ratas Holtzman, en la que observaron un aumento en el conteo de vasos sanguíneos por campo en la piel lesionada de los animales conforme transcurría el tiempo.¹⁴

De igual manera, los resultados obtenidos de los conejos experimentales muestran un aumento en la densidad vascular al transcurrir el tiempo, observándose 35,4/mm² a los 7 días, 50/mm² a los 14 días y 75/mm² a los 21 días. Es decir, que al igual que el grupo control hubo un aumento en el número de vasos sanguíneos de forma progresiva desde el momento que se realizó la lesión en la mucosa oral.¹⁴

Esto concuerda con los resultados de la investigación llevada a cabo por Aburto y su grupo de trabajo, quienes encontraron un aumento en el número de vasos sanguíneos en ratas con quemaduras tratadas con PRP, concluyendo que El Plasma rico en plaquetas (PRP) es eficaz en la cicatrización de heridas por quemaduras en ratas Holtzman.¹⁴

Por último, al comparar la densidad vascular de la mucosa oral lesionada en los conejos tratados y no tratados con PRP se evidenció que los resultados obtenidos en los conejos que recibieron este tratamiento fueron estadísticamente mayores a los reportados en los conejos no tratados. De esta manera se demuestra que existe una estimulación del proceso de angiogénesis debido a la incorporación de factores de crecimiento y otros inmunomoduladores a través del PRP inyectado en la zona lesionada. Por lo que constituye un procedimiento eficaz en el manejo de heridas de la mucosa oral, a través de la angiogénesis como proceso clave en la incorporación de vasos sanguíneos nuevos que aportan nutrientes, células de defensa,

anticuerpos y sustancias necesarias para la correcta cicatrización, reparación y regeneración de los tejidos.

Lo anterior se relaciona con los resultados reportados por Aburto y colaboradores, los cuales encontraron diferencias significativas en la cantidad de vasos sanguíneos al comparar ratas tratadas y no tratadas con PRP.¹⁴ De igual forma, se relaciona con los hallazgos encontrados en Alemania, en la investigación titulada El secretoma de fibrina rico en plaquetas induce la activación angiogénica de tres dimensiones *in vitro*. Donde se concluyó que la liberación de factores de crecimiento y la formación de estructuras angiogénicas en monocultivo, sugieren que los tratamientos con plasma autólogo pueden ser una herramienta terapéutica altamente beneficiosa para aplicaciones de ingeniería de tejidos.¹²

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- La técnica de Tricrómico de Masson y la inmunohistoquímica CD31 son eficaces para el conteo de vasos sanguíneos y evaluación de la densidad vascular en la mucosa oral.
- El proceso de angiogénesis ocurre en la mucosa oral lesionada aumentando la densidad vascular del tejido conforme transcurre el tiempo.
- El proceso de angiogénesis se acelera si el tejido es tratado con PRP.
- La densidad vascular en la mucosa oral es estadísticamente mayor si el tejido es tratado con PRP.
- El PRP representa una alternativa para mejorar y acelerar los procesos de cicatrización, reparación y regeneración tisular.

Recomendaciones

Se recomienda a los profesionales de la odontología utilizar el tratamiento de Plasma Rico en Plaquetas como coadyuvante en los procesos de cicatrización, reparación y regeneración de la mucosa oral, aplicando los protocolos de obtención y aplicación empleados en esta investigación.

De igual forma, se recomienda realizar futuras investigaciones donde se estudien diferentes protocolos de obtención de PRP y distintas técnicas de aplicación.

De igual manera, se recomienda investigar otros marcadores inmunológicos como lo es el factor estimulante del endotelio vascular.

REFERENCIAS

1. Somacarrera Pérez M.L., López Sánchez A.F., Martín Carreras-Presas C., Díaz Rodríguez M.. Lesiones traumáticas en la mucosa oral de los adultos mayores. *Av Odontoestomatol* [Internet]. 2015 Jun [citado 2019 Oct 30] ; 31(3): 129-134. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0213-12852015000300003&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4321/S0213-12852015000300003>.
2. Rodríguez Flores Jordi, Palomar Gallego María Angustias, Torres García-Denche Jesús. Plasma rico en plaquetas: fundamentos biológicos y aplicaciones en cirugía maxilofacial y estética facial. *Rev Esp Cirug Oral y Maxilofac* [Internet]. 2012 Mar [citado 2019 Oct 30] ;34(1):8-17. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1130-05582012000100002&lng=es.
3. R. Hegde, "Effects of periodontal therapy on systemic markers in healthy patients," *Journal of Dentistry and Oral Biology*, vol. 2, no. 8, p. 1055, 2017.
4. Gómez, Adriana Paola Acosta, et al. "Evaluación del efecto del plasma rico en plaquetas en diferentes tiempos y concentraciones sobre la viabilidad de fibroblastos de ligamento periodontal y osteoblastos." *Universitas Odontológica* 36.76 (2017): 1-23.
5. Sánchez, Jose María García. Estudio sobre la cicatrización de la zona donante de injerto de piel parcial en pacientes quemados tras aplicación de plasma rico en plaquetas o plasma rico en factores de crecimiento frente a la forma terapéutica habitual. Diss. Universitat de València, 2019.
6. Patricia, Bertone Frattari, et al. El plasma rico en factores de crecimiento en la neovascularización de colgajos cutáneos. En *morfovvirtual2018*. 2018.
7. Solorzano, cercado; damian, Jostyn. Resultados post-Exodoncia de terceros molares con y sin aplicación de plasma rico en plaquetas. 2018. Tesis de Licenciatura. Universidad de Guayaquil, Facultad Piloto de Odontología.
8. Barbara, Manena. Uso del plasma rico en fibrina como tratamiento en el recubrimiento de recesiones gingivales. 2018. Tesis de Licenciatura. Universidad de Guayaquil. Facultad Piloto de Odontología.

9. Manoochehri, A., Vielma, M., & Castillo, L. (2014). Plasma rico en plaquetas (PRP) en la regeneración ósea de alvéolos post extracción. *Acta Bioclinica Volumen 4, N°7, Enero Junio*, 86.
10. Paredes, A. Ortega, O González, A Bustillos, L Velazco G. Análisis comparativo de la regeneración ósea obtenida con quitosano y plasma rico en fibrina. *Acta Odontológica Venezolana*. 2014; 52(2). Disponible en: <http://www.actaodontologica.com/ediciones/2014/2/art-2/>
11. Sosa R, Ravelo J, Lugo G, Correnti T, Arreaza A, Sosa I. Efectos tisulares del plasma rico en plaquetas en la mucosa periimplantar de un grupo de individuos sanos "in vivo". *Odous Científica*. 2017; 18(2): 19-27
12. Herrera-Vizcaíno, C., et al. "Platelet-rich fibrin secretome induces three dimensional angiogenic activation in vitro." *Eur Cell Mater* 37 (2019): 250-264.
13. Mier ortiz, María José. Efecto del plasma rico en factores de crecimiento en la cicatrización de heridas gingivales. Estudio experimental en cobayos. 2016. Tesis de Licenciatura. Quito: UCE.
14. Moreno, Aburto; Cristian, Marxzen. Eficacia del plasma rico en plaquetas (PRP) en la cicatrización de heridas por quemaduras en ratas holtzman. 2016.
15. Ramírez García Lázara Kenia, Ríos Rodríguez María Elena, Gómez Cabrera Clara Gisela, Rojas Rondón Irene, Gracia Arboleda Juan Carlos. Cutaneous biostimulation using platelet-rich plasma. *Rev Cubana Oftalmol [Internet]*. 2015 Mar [citado 2019 Nov 05] ; 28(1). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?Script=sci_arttext&pid=S086421762015000100011&lng=es.
16. Franco D, Franco T, Schettino AM, Filho JM, Vendramin FS. Protocol for obtaining platelet-rich plasma (PRP), platelet-poor plasma (PPP), and thrombin for autologous use. *Aesthetic Plast Surg*. 2012 Oct;36(5):1254-9.
17. Moya Rosa Enrique J., Moya Corrales Yadira. Facial biostimulation with platelet-rich plasma. *AMC [Internet]*. 2015 Abr [citado 2019 Nov 05] ; 19(2): 167-178. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?Script=sci_arttext&pid=S1025-02552015000200011&lng=es.
18. Ávila Oscar Rubini, Parizzi Natália Gomes, Souza Ana Paula Mayumi, Botini Dayane Silvestre, Alves João Ytimura, Almeida Silvio Henrique Maia. Histological response to platelet-rich plasma added to polypropylene mesh implemented in rabbits. *Int. Braz j urol. [Internet]*. 2016 Oct [cited 2019 Nov 05] ; 42(5): 993-998. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?Script=sci_arttext&pid=S1677-55382016000500993&lng=en. [Http://dx.doi.org/10.1590/S1677-5538.IBJU.2015.0319](http://dx.doi.org/10.1590/S1677-5538.IBJU.2015.0319).

19. Alcaraz-Rubio J, Oliver-Iguacel A, Sánchez-López JM. Plasma rico en factores de crecimiento plaquetario. Una nueva puerta a la Medicina regenerativa. *Rev Hematol Mex* 2015;16:128-142.
20. Arce González Manuel Antonio, Hernández Moreno Vicente José, Lugo González Armando Ornán. Factores de crecimiento derivados de plaquetas: ¿inductores de la regeneración desde la evidencia?. *Medicentro Electrónica* [Internet]. 2014 Dic [citado 2019 Nov 05] ; 18(4): 180-182. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?Script=sci_arttext&pid=S1029-30432014000400008&lng=es.
21. Fitzpatrick J, Bulsara MK, mccrory PR, Richardson MD, Zheng MH. Analysis of platelet-rich plasma extraction: variations in platelet and blood components between 4 common commercial kits. *Orthop J Sports Med.* 2017; 5: 2325967116675272. Doi:10.1177/2325967116675272
22. Rodríguez-Núñez Iván, Romero Fernando, González Marcelo, Campos Ruy R. Biología del Desarrollo Vascular: Mecanismos en Condiciones Fisiológicas y Estrés Flujo. *Int. J. Morphol.* [Internet]. 2015 Dic [citado 2019 Nov 05] ; 33(4): 1348-1354. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?Script=sci_arttext&pid=S0717-95022015000400026&lng=es. <Http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022015000400026>.
23. Marañón Cardonne Miriam, Pérez Font Lena, Font Santos Oneida. Modelos y ensayos para el estudio de la angiogénesis. *MEDISAN* [Internet]. 2016 Ene [citado 2019 Nov 05] ; 20(1): 100-108. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?Script=sci_arttext&pid=S1029-30192016000100015&lng=es.
24. Custodio-Chablé, S. J., R. A. Lezama, and E. Reyes-Maldonado. "Platelet activation as a trigger factor for inflammation and atherosclerosis." *Cirugia y cirujanos* 88.2 (2020): 233.
25. Syvannarath, V., et al. "P4618 Lack of CD31 results in microvascular plugging and increased infarction size in an experimental model of myocardial ischemia-reperfusion injury." *European Heart Journal* 40.Supplement_1 (2019): ehz745-1000.
26. Gómez de Ferraris M, Campos Muñoz A. (2009). *Histología, Embriología e Ingeniería Tisular Bucodental*. 3era Edición. España
27. Bates, D.O; Jones, R.O.P. The Role of Vascular Endotelial Growth Factor in Wound Healing. *Int. J. Low. Extrem. Wounds*. 2003; 2: 107 – 120.
28. Beldon, P. 2010. Basic science of wound healing Review Article *Surgery*. 28 (9): 409-412
29. Morales Navarro Denia. Regenerative Medicine applied in the treatment of bone defects craniofacial complex. *Rev Cubana Estomatol* [Internet]. 2015 Mar [citado 2019 Nov 05] ; 52(1).

Disponible

en:

http://scielo.sld.cu/scielo.php?Script=sci_arttext&pid=S0034-75072015000100008&Ing=es.

30. Hernández Sampieri, R., Fernández Collado, C. And Pilar Baptista Lucio, M. (2014). Metodología de la investigación. México: mcgraw-Hill.
31. Ley para la Protección de la Fauna Doméstica Libre y en Cautiverio. República Bolivariana de Venezuela: ASAMBLEA NACIONAL DE LA REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA; 2010.
32. National Research Council Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Press WNA, editor2011.
33. National Research Council (US) and Institute of Medicine (US) Committee on Use of Laboratory Animals in Biomedical and Behavioral Research. Use of Laboratory Animals in Biomedical and Behavioral Research. Washinton, D.C.: National Academy Press (US); 1998. Diponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK218262/>.
34. National Research Council. Institute of Laboratory Animal Resources. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th ed. Washinton, D.C.: National Academy Press; 2011.
35. Navarro-Hernández J, Ramírez ROA, Villagrán C. Manual de procedimientos recomendables para la investigación con animales. México D.C.: SAMSARA; 2012.
36. Código de Ética para la Vida. "Ministerio del Poder Popular para la Ciencia, Tecnología, Innovación e Industrias Intermedias. 2da."
37. González JC, López C, Carmona JU. Evaluación de un método manual para producir plasma rico en plaquetas-puro (P-PRP) en conejos: estudio hematológico Arch. med. Vet. 2013; vol.45 no.3.
38. Mena Marín Margarita, Alpízar Calvo Ted, Mena Umaña Fernando. Medidas de Bioseguridad en una sala de disección de anatomía patológica. Med. leg. Costa Rica [Internet]. 2010; 27: 35-39.
39. Edna B, Mills B, Hall J, Debra A, Melvin W, Achstetter A, et al. Métodos Histotecnológicos. Washington D.C, Estados Unidos de América. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los EUA
40. Suárez C, Montenegro E. Compendio de coloraciones histológicas. Caracas; Venezuela. Universidad Central de Venezuela; 2004
41. Martín-Lacave, Inés, and Tomás García-Caballero. Atlas de inmunohistoquímica: caracterización de células, tejidos y órganos normales. Ediciones Díaz de Santos, 2012.
42. de Dios Soler, Marcela. "Guía de inmunohistoquímica para técnicos/Marcela de Dios Soler; Gabriela Acosta Haab.--Ciudad

Autónoma de Buenos Aires: Instituto Nacional del Cáncer, 2018. Libro digital, PDF/A."

43. Cáceres Felipe, Herrera Gilberto, Fernández Alejandra, Fernández Javier, Martínez René, Carvajal Daniela et al . Utilidad de Tinción de Tricrómico de Masson en la Cuantificación de Densidad Media Vascular en Mucosa Oral Normal, Displasia Epitelial y Carcinoma Oral de Células Escamosas. *Int. J. Morphol.* [Internet]. 2017 Dic [citado 2021 Mar 12] ; 35(4): 1576-1581. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022017000401576&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022017000401576>.