



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

TESIS:

Para obtener el Título de Cirujano Dentista

PRESENTA:

Ernesto Manrique Islas.

Directora de Tesis:

Dra. Cynthia Georgina Trejo Iriarte

Dr. José Francisco Gómez Clavel.

Esp. Nancy Monroy Pérez.

Esp. Rogelio Reyes Sánchez.

C.D. Adriana León Zamudio.

**“Regeneración comparativa de la mucosa palatina en un modelo experimental en rata utilizando un tratamiento a base de Omega 3 y Aspirina”**

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM IA201814 y al Proyecto CONACYT CB2014-01/235984.

Los Reyes Iztacala. Edo. de México, 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Contenido

LISTA DE ABREVIATURAS.....	3
MARCO TEÓRICO.....	5
LA MUCOSA ORAL .....	5
ESTRUCTURA Y FUNCIONES DE LA MUCOSA ORAL ORTOTÍPICA. ....	6
HISTOLOGÍA DE LA MUCOSA ORAL .....	7
CICATRIZACIÓN DE HERIDAS: .....	14
PROCESOS FISIOLÓGICOS DE CICATRIZACIÓN DE UNA HERIDA. ....	15
LOS ÁCIDOS GRASOS. ....	18
OMEGA 3.....	18
ASPIRINA. ....	25
TERAPIA DE MODULACIÓN DE RESPUESTA DEL HUÉSPED.....	28
JUSTIFICACIÓN .....	31
HIPÓTESIS: .....	32
OBJETIVO GENERAL: .....	32
OBJETIVOS PARTICULARES: .....	32
MATERIAL Y MÉTODOS.....	33
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	34
METODOLOGÍA PARA DIETA DE OMEGA 3.....	34
METODOLOGÍA DE LA PRE-MEDICACIÓN CON ASS. ....	35
DISEÑO Y PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO .....	38
PROCEDIMIENTO PRE-QUIRÚRGICO.....	38
PARÁMETROS DE EVALUACIÓN CLÍNICA.....	39
PROCEDIMIENTO POSTQUIRÚRGICO.....	39
OBTENCIÓN DE LOS CORTES SERIADOS HISTOLÓGICOS.....	40
EVALUACIÓN HISTOPATOLÓGICA.....	43
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS .....	44
RESULTADOS.....	45
RESULTADOS CLÍNICOS.....	45
RESULTADOS HISTOLÓGICOS.....	47

ANALISIS HISTOMORFOMÉTRICO.....	59
DISCUSIÓN .....	67
CONCLUSIONES.....	71
PERSPECTIVAS.....	72
BIBLIOGRAFÍA .....	73

## LISTA DE ABREVIATURAS.

15epiLPX = 15-epi-lipoxina.

AA = ácido araquidónico.

AS = ácido salicílico.

ASS = Aspirina.

COL-I y COL-III = Colágeno I y III colágeno.

Col-IV= Colágeno IV.

Col-VII = colágeno VII.

DFDBA = Aloinjerto de hueso liofilizado.

DHA =el ácido docosahexaenoico.

EPA = ácido eicosapentaenoico.

GM-CSF = Factor estimulante de colonias de granulocitos, macrófagos y monocitos.

ICAM-1= Moléculas de adhesión como la molécula de adhesión intercelular 1.

IL1 = Interleucina 1.

IL-10 = interleucina-1 $\beta$  e interleucina-10.

LPXs = lipoxinas.

LT = Leucotrienos.

MMP-8 = Metaloproteinasas 8.

MMP-13 = Metaloproteinasas 13.

MMP-14 = Metaloproteinasas 14.

O3 = Omega 3.

O6 = Omega 6.

PG = prostaglandinas.

PgE-1 y PgE-2 = Prostaglandinas E1 y E2.

RANKL = Receptor Activador del Factor Nuclear Kappa Beta.

TGF $\beta$ = Factor de crecimiento Transformante  $\beta$ .

TIMP-1 = Inhibidor de Metaloproteinasas 1.

TNF= Factor receptor de necrosis tumoral.

TX = Tromboxanos.

## MARCO TEÓRICO.

### LA MUCOSA ORAL

La cavidad oral esta tapizada por una membrana de mucosa húmeda que forma la barrera estructural entre el cuerpo y el medio externo, denominada mucosa oral.

La mucosa de acuerdo a su localización se clasifica topográficamente como se observa en la figura 1:

Mucosa de revestimiento.

Su principal función es proteger del medio externo, es epitelio no queratinizado, con un corion laxo o semi-laxo y una sub-mucosa (tejido conectivo) bien definida, que es distensible, las crestas epiteliales y las papilas coriales son escasas. Se encuentra en: mejillas, labios, cara interna del labio, paladar blando, cara ventral de la lengua y piso de boca.

Mucosa masticatoria.

Está sometida a fuerzas intensas de fricción y presión originadas por el impacto masticatorio, se caracteriza por estar fija al hueso y no experimenta estiramiento, es epitelio queratinizado o paraqueratinizado con numerosas crestas y un corion semi-denso o denso, en la parte lateral del paladar duro carece de sub-mucosa y en lugar de esta, hay tejido adiposo y glandular. Se encuentra en la encía y en el paladar duro.

Mucosa especializada.

Su función es el sentido del gusto, es epitelio especializado que aloja a los corpúsculos gustativos intra-epiteliales y se localiza en el epitelio de la cara dorsal de la lengua, donde encontramos las papilas foliadas, filiformes, fungiformes y caliciformes.



Figura 1.- Esquema que muestra las diferencias entre los epitelios planos queratinizados y su localización más frecuente. Figura modificada de: [medicinethefinalfrontier.blogspot](http://medicinethefinalfrontier.blogspot).

### ESTRUCTURA Y FUNCIONES DE LA MUCOSA ORAL ORTOTÍPICA.

Está integrada por dos capas conectadas por una membrana basal, de tejidos estructural y embriológicamente diferentes, como se muestra en la figura 2:

- a) Tejido epitelial, de origen ectodérmico.
- b) Tejido conectivo de origen mesenquimal.

El tejido conectivo emite prolongaciones hacia el epitelio denominadas papilas coriales, que son invaginaciones, mientras que el epitelio emite proyecciones hacia la lámina propia, en forma de evaginaciones que reciben el nombre de crestas epiteliales, esta disposición en papilas y crestas facilita la nutrición del epitelio avascular a partir del tejido conectivo que es de carácter vascular (Garzón, 2009).



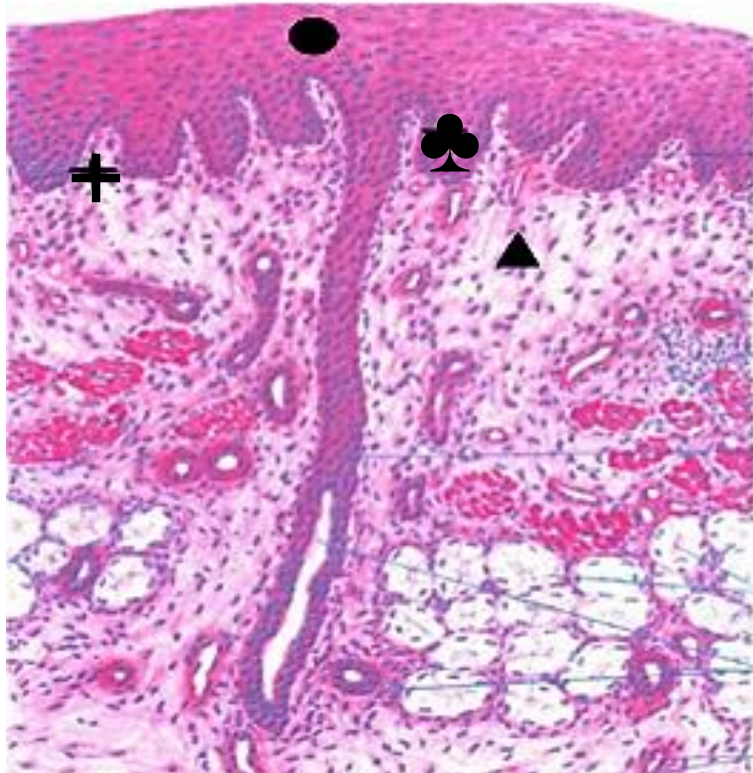


Figura 2: Relación del tejido epitelial ● con el tejido conectivo ♣ por medio de la membrana basal, podemos apreciar las papilas coriales + y las crestas epiteliales ▲. Figura modificada de <http://cryztaldoll.com>.

## HISTOLOGÍA DE LA MUCOSA ORAL.

En el epitelio de la mucosa bucal las células epiteliales están unidas entre sí para formar una barrera funcional de protección entre el medio bucal y el tejido conectivo subyacente, y está constituido por dos poblaciones celulares.

- a) Población intrínseca o propia del epitelio. Formada por queratinocitos (alrededor del 90% de la población celular total) que son células de origen ectodérmico, que liberan poca matriz extracelular, por lo que sus membranas suelen estar muy próximas y unidas mediante desmosomas para mantener la cohesión e integridad de la mucosa oral.

Los queratinocitos se renuevan constantemente, migran desde las capas más profundas del epitelio hasta la superficie del mismo. Producida la mitosis, pueden permanecer en la capa basal y migrar hacia el exterior, siendo así células especializadas, hasta convertirse en la capa

queratinizada (anucleada), que más tarde se descama (aprox. 14 días). Se disponen en cuatro capas o estratos (figura 3):

- Basal.
- Espinoso.
- Granuloso.
- Corneo.

Estrato basal. Los queratinocitos y los fibroblastos del corion forman la lámina basal que une al epitelio y al corion. Los queratinocitos tiene forma cubica con núcleo redondo y basófilo, lo que indica su intensa actividad sintetizadora de proteínas, en esta capa se localizan las células troncales que dan lugar al proceso de renovación epitelial. Los queratinocitos, en esta capa, producen: Interleucina 1 (IL1), Factor de crecimiento Transformante  $\beta$ (TGF $\beta$ ), factor receptor de necrosis tumoral (TNF) y moléculas de adhesión como la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), que son moléculas que participan en la migración celular, contribuyendo a la organización espacial de los epitelios en desarrollo y la reparación de heridas (Garzón, 2009).

Estrato espinoso. Está formado por varias hileras de queratinocitos, que tienen una forma poligonal y núcleo pequeño y redondo, de cromatina laxa con citoplasma ligeramente basófilo con abundantes desmosomas.

Estrato granuloso. Contiene 2 o 3 capas de queratinocitos con un pequeño núcleo de cromatina densa, con desmosomas abundantes y ricos en citoqueratinas fosforiladas, y poseen más puentes de di-sulfuro que en los estratos basal y espinoso, en este estrato se encuentran queratinosomas, que son organoides de las células granulosas que se encuentran más profundas, aunque también pueden hallarse en el estrato espinoso. Estos queratinosomas no se encuentran en epitelios no queratinizados, por lo que cumplen un papel importante en el proceso de queratinización. Los queratinocitos del estrato granuloso, sintetizan proteínas, lípidos, y receptores de antígenos relacionados con la queratinización, para posteriormente, (un periodo de 5 a 6 horas) convertirse en el estrato corneo.

Estrato corneo. Está constituido por células planas sin núcleos evidentes, son denominadas corneocitos y no presentan gránulos de querato-hialina. Ultra estructuralmente, carecen de organoides y están compuestas de filamentos agrupados de forma compacta, que se forman a partir de los tonos filamentos de citoqueratina, la célula queratinizada toma apariencia de una escama compacta y deshidratada, que está íntimamente adosada a las escamas adyacentes. Su membrana plasmática es más gruesa, sus uniones intercelulares se modifican,

facilitando la descamación celular, los desmosomas han desaparecido y las células entran en contacto unas con otras mediante interdigitaciones:

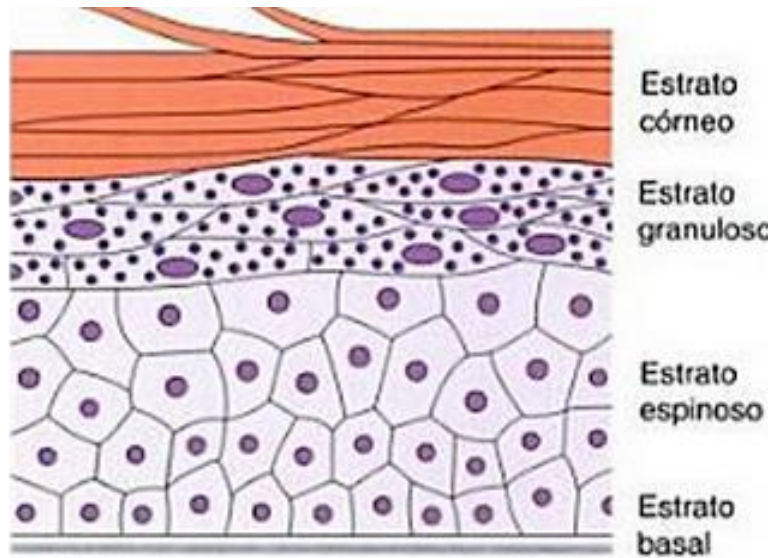


Figura 3: Los estratos del epitelio de la cavidad oral en los cuales se disponen los queratinocitos (Welsch, 2008).

Los queratinocitos se han clasificado en 5 patrones relacionados a su grado de diferenciación:

- Patrón celular tipo I: se caracteriza por la presencia de microvellosidades como marcador de diferenciación superficial.
- Patrón celular tipo II: se caracteriza por la presencia de crestas superficiales originadas por pliegues de membrana de longitud variable y de curso rectilíneo, llamadas micróplicas.
- Patrón celular tipo III: se caracteriza por presentar micróplicas curvas, con un patrón curvilíneo en los extremos terminales.
- Patrón celular tipo IV: denominado también patrón reticular, presenta micróplicas circulares, ramificadas y confluentes.
- Patrón celular tipo V: presenta un patrón poroso en su superficie, con oquedades claramente definidas y delimitadas por una moderada sobre-elevación marginal.

Los queratinocitos más indiferenciados, que se localizan en los estratos basal y espinoso, presentan en su superficie abundantes micro-vellosidades (patrón I). A medida que los queratinocitos se diferencian, aparecen micróplicas en su superficie (patrones II, III y IV). El patrón poroso (patrón V) se observa en la superficie al final del proceso de diferenciación. Estas estructuras superficiales de

los queratinocitos poseen dos funciones básicas: canalizar el flujo de las secreciones en la superficie celular y favorecer la cohesión intercelular una vez que desaparecen los desmosomas.

b) Población extrínseca: esta población es de origen ajeno al epitelio, está formada por células permanentes y células transitorias:

❖ Población extrínseca permanente: representa el 9 % de la población celular, como se aprecia en la figura 4, está constituida por tres tipos de células.

1.- Melanocitos: son células claras, de núcleo pequeño, de aspecto dendrítico, con abundantes gránulos precursores de melanina denominados melanosomas, que son transferidos a los queratinocitos, haciendo posible la pigmentación homogénea del epitelio. Cada melanocito tiene queratinocitos asociados a los que suministra melanina, por lo que a este conjunto de células se le conoce como: “unida epitelial de la melanina”. Los Melanocitos en estadios tempranos se denominan premelanosomas y carecen de melanina.

2.- Células de Merkel: se encuentran entre las células de la capa basal del epitelio, se diferencian de los Melanocitos porque carecen de prolongaciones de tipo dendrítico. Son células sensoriales para la percepción de la presión.

3.- Células de Langerhans: estas células son las presentadoras de los antígenos a los linfocitos T, de manera que son las iniciadoras de la respuesta inmunológica innata; en la mayoría de los casos aparecen en el estrato espinoso del epitelio. Las células de Langerhans poseen prolongaciones de morfología dendrítica y en su interior poseen gránulos de Birbeck, derivan del mesénquima y pertenecen al sistema mono-nuclear fagocítico. Las células de Langerhans secretan moléculas ICAM-1 y óxido nítrico cuando son estimuladas por lo queratinocitos activados que secretan de forma parácrina el factor estimulante de colonias de granulocitos, macrófagos y monocitos (GM-CSF).

❖ Población extrínseca transitoria: representa el 1% de las células del epitelio y está constituida por: granulocitos, linfocitos y monocitos sanguíneos que pueden infiltrarse ocasionalmente en el epitelio bucal.

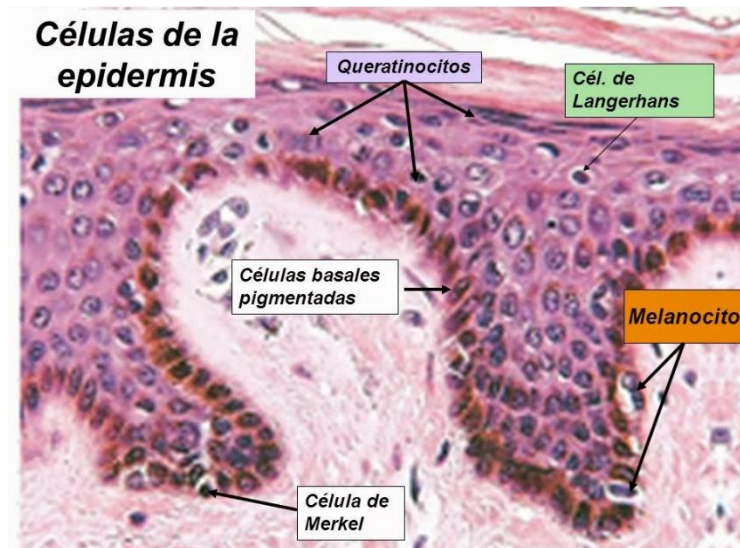


Figura 4. Imagen del epitelio con tinción H&E, se observan las células de la población extrínseca permanente: Melanocitos, células de Merkel y células de Langerhans. Figura tomada de: <https://www.emaze.com>.

#### **MEMBRANA BASAL DE LA MUCOSA ORAL.**

La separación entre el epitelio y el corion del tejido conectivo, se establece mediante la membrana basal, como se aprecia en la figura 5, y posee dos regiones: la lámina basal, sintetizada por las células del epitelio, y la lámina reticular sintetizada por las células del conectivo.

- Lamina basal: esta estructura, que solo se puede observar al microscopio electrónico de transmisión, es una doble lamina rectilínea de distinta densidad, que contiene: la lámina densa rica en colágeno tipo IV (Col-IV) y heparán; y la lámina lúcida que posee laminina y entactina.
- Lamina reticular: esta lámina está constituida por una matriz de glucosaminoglucanos. Su espesor varía de acuerdo al grado de fricción con el epitelio subyacente, siendo más gruesa en los epitelios queratinizados, sus fibras son:

- 1.- fibras de anclaje: son fibras colágeno VII (Col-VII) que finaliza en la lámina densa y forman bucles en pequeñas zonas de anclaje con COL-IV, denominadas placas de anclaje.
- 2.- fibras reticulares: compuestas por reticulina, del colágeno I y III (COL-I y COL-III) que están distribuidas paralelamente al epitelio entre las fibras de anclaje. La fibronectina colabora a fijar la lámina reticular a la lámina basal.

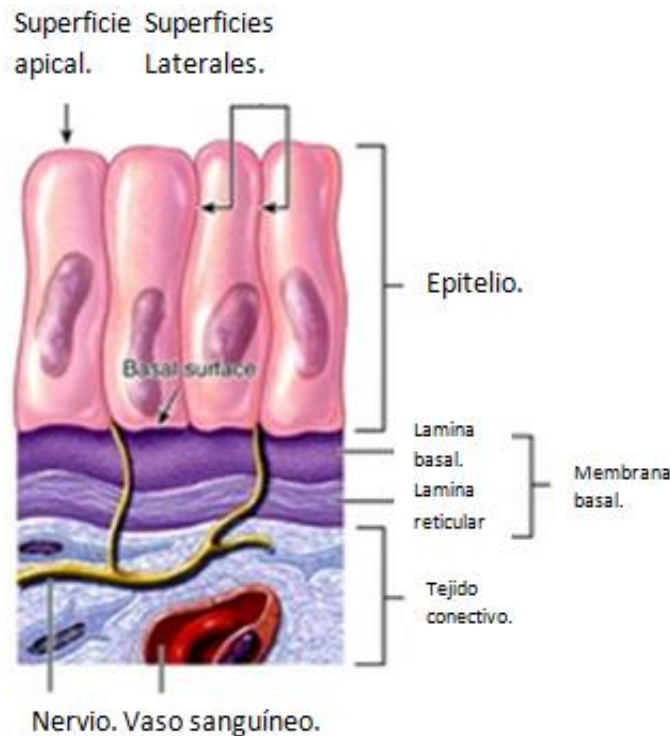


Figura 5. Esquema de la membrana basal integrada por la lámina basal, perteneciente del epitelio y la lámina reticular del tejido conectivo. Figura modificada de: <https://www.studyblue.com>.

La membrana basal posee varias funciones: fijación entre el epitelio y el conectivo, es un filtro físico y químico, sirve de guía para la migración celular en el proceso de reepitelización de heridas y como barrera defensiva.

Es importante mencionar, que la membrana basal de la cavidad bucal es más gruesa en los epitelios no queratinizados, y que su espesor disminuye progresivamente con la edad.



### *LÁMINA PROPIA O CORION DE LA MUCOSA ORAL (TEJIDO CONECTIVO).*

Es una lámina de tejido conectivo de espesor variable que confiere sostén y nutrición al epitelio, presenta papilas que llevan vasos y nervios al epitelio y que varían de longitud y anchura de acuerdo a la zona anatómica, obsérvese la figura 6. Las células que podemos encontrar en esta lámina del tejido conectivo son: fibroblastos, macrófagos, linfocitos, células cebadas y células plasmáticas. Existe una estrecha relación entre el fibroblasto y el queratinocito, ya que los queratinocitos activados secretan IL-1 que promueve la proliferación y actividad de los fibroblastos, que a su vez, son encargados de la secreción de prostaglandinas que estimulan la proliferación y diferenciación de los queratinocitos.

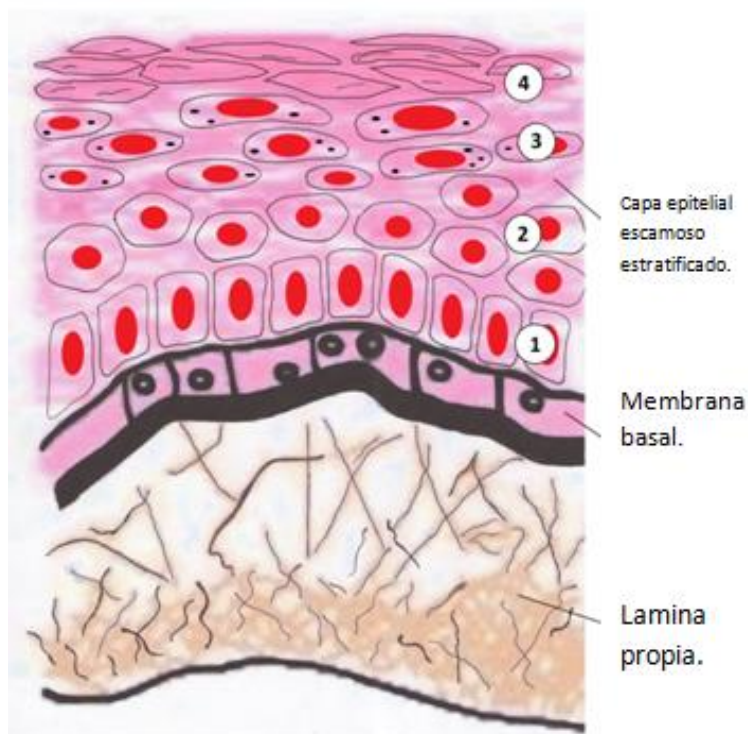


Figura 6.- Esquema que representa a la lámina propia de la mucosa bucal, que es tejido conectivo laxo denso o semi denso, se encarga de dar sostén y nutrición al epitelio. Figura modificada de <http://www.wikiwand.com/en/Oral>.

La lámina propia es especialmente rica en tres tipos de fibras:

- Fibras colágenas: resisten fuerzas de tracción y evitan deformaciones de la mucosa.
- Fibras elásticas: devuelven al tejido la normalidad después de la tensión.
- Fibras reticulares: refuerzan las paredes de los vasos sanguíneos.

En la zona de la mucosa masticatoria del paladar, la lámina propia se adhiere directamente al periostio, pero en otras zonas como en la mucosa alveolar existe una rica inervación con terminaciones nerviosas sensoriales que recogen información sobre la percepción del dolor, la temperatura, el tacto y la presión.

### *SUBMUCOSA.*

Está formada por tejido conectivo laxo, destinado a unir la mucosa en los sitios más profundos, el espesor es variable y en esta capa se encuentran glándulas salivales, vasos, nervios y tejido adiposo.

### *CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA DE LA MUCOSA ORAL.*

Esta clasificación depende del grado de queratinización, ya que la totalidad de la mucosa bucal es un epitelio plano estratificado:

- A) Epitelio plano estratificado ortoqueratinizado, contiene las capas: basal, espinosa, granulosa y cornea.
- B) Epitelio plano estratificado paraqueratinizado, contiene células del estrato corneo que conservan sus núcleos y algunos organelos, lo que indica que un escaso metabolismo celular, además, este tipo de epitelio presenta gran cantidad de tono-filamentos.
- C) Epitelio plano estratificado no queratinizado. Que no tiene capa cornea superficial ni estrato granuloso, por lo que solo tiene tres capas: basal, intermedia y superficial.

### *CICATRIZACIÓN DE HERIDAS:*

La cicatrización de las heridas quirúrgicas en la mucosa oral incluye una serie de procesos biológicos, que comienzan con la quimio-atracción de células y terminan con la formación y maduración de una nueva matriz extracelular.

Una lesión reactiva es aquella lesión provocada por un agente físico o químico, y las lesiones idiopáticas son aquellas en las que hay lesión pero no hay alguna causa aparente que las provoque.

Se ha clasificado a la cicatrización de las heridas en tres tipos: (Zavala, 2009)

- Cicatrización primaria o por primera intención: se presenta al afrontar los tejidos, en una herida quirúrgica (instrumentos estériles) estos cicatrizaran por unión primaria de los epitelios por medio de un agente externo que provoque su unión (sutura o grapas), y cumplen con las siguientes características: mínimo edema, sin secreción local, cicatrizan



en corto tiempo y hay una mínima formación de cicatriz. Este tipo de cicatrización se obtiene cuando hay un sangrado adecuado en una cirugía bucal convencional, en donde se afrontan los bordes correctamente.

- Cicatrización por segunda intención: es el proceso de cicatrización cuando los bordes no pudieron ser afrontados o la herida está sucia o existe un proceso infeccioso que impide la unión de los bordes del epitelio. Este proceso de cicatrización tiene un tiempo más prolongado para sanar, ya que se forma tejido de granulación que contiene miofibroblastos y la herida cierra por contracción.
- Cicatrización terciaria o por tercera intención: en este proceso la lesión está contaminada o los tejidos muy traumatizados, esta cicatrización es una combinación de las dos anteriores, ya que recién formada la herida quirúrgicamente se deja cicatrizar por segunda intención, pero se mantiene abierta para drenar los tejidos y hasta que la herida deja de estar infectada, se afrontan los tejidos con la finalidad de, ahora sí conseguir afrontar los bordes.

#### PROCESOS FISIOLÓGICOS DE CICATRIZACIÓN DE UNA HERIDA.

El proceso por el cual una herida sana comienza por la *hemostasia* que representa el cese fisiológico de la hemorragia, que se sub-divide en dos: la hemostasia primaria y la hemostasia secundaria (Martinez M. C., 2006)

En la *hemostasia primaria* las células endoteliales se encargan de la trombo-regulación, y las plaquetas forman el coagulo mediante los procesos de adhesión y agregación plaquetaria, deteniendo así la hemorragia. Cuando existe lesión de algún vaso sanguíneo se expone el COL-I del sub-endotelio y permite que las plaquetas se adhieran a las células endoteliales. La hemostasia primaria se divide en los siguientes mecanismos:

- 1.- Adhesión plaquetaria al sub-endotelio expuesto.
- 2.- Agregación plaquetaria primaria al activarse el complejo gluco-receptor IIb/IIIa y permitir la unión de las plaquetas.
- 3.- Liberación de compuestos intra-plaquetarios.
- 4.- Agregación secundaria de nuevas plaquetas al coagulo.
- 5.- Consolidación y retracción del coagulo.

6.- Formación del coagulo definitivo con la formación del polímero de la fibrina y el cese de la hemorragia.

En la *hemostasia secundaria* participan los factores de coagulación, que son proenzimas o zimógenos, que interaccionan sobre una superficie catalítica para formar una red de fibrina e integran el coagulo sanguíneo. Las células epiteliales, principalmente los queratinocitos, migran rápidamente desde los márgenes de la herida cubriendo el coágulo de fibrina en maduración, originando una barrera de protección que no difiere en su estructura de la del epitelio original. El tejido conectivo es el encargado de dar sostén a este epitelio, aportando células, vascularización, inervación y nutrición.

La cicatrización de las heridas se divide en tres etapas:

**ETAPA DE INFLAMACIÓN:** comienza inmediatamente después de que el tejido es lesionado y en ausencia de factores que la prolonguen, su duración es de 3 a 5 días aproximadamente. Existen dos fases en la inflamación: vascular y celular.

La **fase vascular** inicia con una vasoconstricción a fin de disminuir la pérdida de sangre en el área de la lesión y a su vez, promover la coagulación sanguínea. Pocos minutos después, la histamina y las prostaglandinas E1 y E2 (PgE-1 y PgE-2), elaboradas por los leucocitos causan vasodilatación y aumento de la permeabilidad endotelial, lo que permite el escape de plasma y la diapédesis de los leucocitos, facilitando la dilución de los contaminantes y generando edema. Los signos propios de la inflamación son: eritema, edema, dolor, calor (Celsius 30 a.C. - 38 d.C.) y pérdida de la función. El calor y el eritema son causados por la vasodilatación; el edema es producido por la trasudación de líquidos; el dolor y la pérdida de la función son causadas por liberación de histamina, quininas y prostaglandinas liberadas por los leucocitos, así como por la presión del edema.

La **fase celular** de la inflamación es disparada por la activación del sistema de complemento. Existen diversos tipos de enzimas pero las más importantes, son el C3 y C5 que hacen que los leucocitos polimorfo nucleares (neutrófilos) se dividan y se multipliquen en el lado de la lesión (marginación) y luego, migren a través de las paredes de las células endoteliales (diapédesis). De la misma manera, ayudan a la opsonización de las bacterias facilitando su fagocitosis y provocan su lisis al insertar perforinas formadoras de poros en las membranas de las bacterias y de células extrañas. Los neutrófilos cuando hacen contacto con el material extraño (por ejemplo, una bacteria) liberan el contenido de sus lisosomas (degranulación) que contienen proteasas y proteínas antimicrobianas llamadas defensinas, que actúan destruyendo bacterias, materiales extraños y digieren

tejido necrótico. Este proceso es también ayudado por los monocitos quienes desde la sangre penetran en los tejidos transformándose en macrófagos tisulares, que fagocitan cuerpos extraños y tejidos necróticos. Posteriormente, los linfocitos B y T se encargan de reconocer el material antigénico, producir anticuerpos e interactúan con el complemento para lisar células invasoras.

*ETAPA FIBROBLÁSTICA:* en esta continúa con el incremento y el aumento de nuevas células, principalmente los fibroblastos se originan localmente y a través de las células mesénquimales pluripotenciales y se encargan de sintetizar grandes cantidades de fibrina, tropocolágeno, polisacáridos, (que actúan como fijadores de las fibras de colágeno), fibrina (que forma una red que permite a los nuevos capilares atravesar la herida de un borde a otro), fibronectina (que ayuda a estabilizar la fibrina y permite el reconocimiento del material extraño que debe ser removido) y factores quimiotácticos (que ayudan a guiar a los macrófagos en su actividad a lo largo de la red de fibrina).

En esta etapa ocurre la fibrinólisis causada por la plasmina, que aparece en los nuevos capilares y remueve la red de fibrina. Inicialmente el colágeno es producido en exceso y puesto de una manera poco organizada. Esta abundancia de colágeno es necesaria para darle cierta fuerza al área de la herida, pero debido a su deficiente orientación, la herida no es capaz de resistir fuerzas de tensión durante esta fase, que dura de 2 a 3 semanas. Clínicamente al final de este período la herida se presenta dura, debido al exceso de colágeno y eritematosa por el alto grado de vascularización. La herida alcanza entre 70% y 80% de la resistencia a la tensión, respecto al tejido antes de ser lesionado.

*ETAPA DE REMODELACIÓN:* constituye la etapa final del proceso de cicatrización, es también conocida con el término de maduración de la herida. Durante esta fase muchas fibras de colágeno que fueron depositadas de manera desordenada son destruidas y remplazadas por nuevas fibras, las cuales se orientan de una manera más efectiva para soportar las fuerzas de tensión y resistencia en el área de la herida. La fuerza de la herida alcanza solo el 80-85% de la resistencia que el tejido tenía previamente a la lesión. Algunas fibras de colágeno son removidas para dar suavidad a la cicatriz. Como el metabolismo de la lesión se reduce, la vascularidad también disminuye y por ende el enrojecimiento de la herida. Por último, cerca del final de la etapa fibroblástica y al inicio de la remodelación la herida se contrae, disminuyendo su tamaño (Felzani, 2005).

## LOS ÁCIDOS GRASOS.

Los ácidos grasos son clasificados como lípidos simples, esenciales que se dividen en: ácidos grasos de cadena corta con 2 a 4 carbonos; ácidos grasos de cadena media con 6 a 10 carbonos; y ácidos grasos de cadena larga con 12 a 16 carbonos. Si no contienen ningún enlace doble en su molécula se denominan: ácidos grasos saturados (Moreno-Gavilanes, 2010). Cuando contienen enlaces dobles son denominados: ácidos grasos insaturados (De la calle-Peña, 2008), distinguiéndose de los mono o poli-insaturados.

Los ácidos grasos insaturados, pueden ser clasificados también, dependiendo de la posición del primer enlace doble contando desde el grupo metilo terminal, es decir, son de la serie n-3 (omega 3 [O3]) cuando el enlace doble se sitúa entre los carbonos tres y cuatro, y serie n-6 (omega 6 [O6]) cuando aquel se sitúa entre los carbonos seis y siete, y serie n-9 (omega 9 [O9]) (véase la figura 7) (Durán, 2014), (Moreno-Gavilanes, 2010).

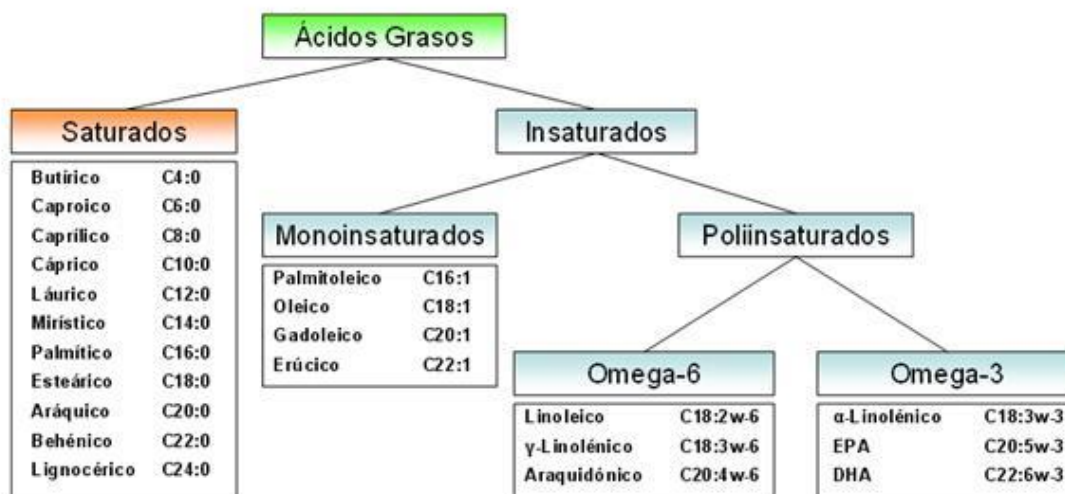


Figura 7. Clasificación de los ácidos grasos; saturados insaturados y poli insaturados. El omega 3 pertenece al grupo de los ácidos grasos poli insaturados da cadena larga. Figura tomada de (Durán, 2014)

### OMEGA 3.

Los **ácidos grasos Omega-3** son fundamentalmente dos: el ácido eicosapentaenoico (EPA), y el ácido docosahexaenoico (DHA) que tienen como función modular el sistema inmune y ejercer un efecto biológico en el organismo, por la inducción y formación de lipoxinas (LPXs), resolvinas y protectinas, que se encargan de la resolución rápida de los procesos inflamatorios (Medina, 2012).

Además del efecto antiinflamatorio de los eicosanoides, derivados del Omega-3, estos ácidos grasos presentan beneficios directos en las células del sistema inmune, ya que favorecen la señalización entre los neutrófilos y otorgan mayor fluidez a las membranas celulares de los neutrófilos y otras células inmunológicas, también mejoran la respuesta y el patrón de supervivencia de los linfocitos (Farias & Julieta, 2011), (Medina, 2012), (Oliart-Ros, 2001).

Los ácidos grasos O3 reemplazan a los lípidos de la membrana, por lo que disminuye el contenido de ácido araquidónico (AA) en ellas. Cabe destacar que los Eicosanoides sintetizados por los ácidos grasos O3 son más potentes que los producidos a partir de los ácidos grasos O6 (Oliart-Ros, 2001).

El DHA y EPA están involucrados en el control de la viscosidad de las bicapas lipídicas de las membranas de las células, de esta manera, pueden regular los procesos mediados por la membrana como son: la sensibilidad y afinidad de los receptores en el transporte de metabolitos, la actividad de las enzimas y de las bombas metabólicas así como, también los eventos de transducción de las señales a través de las membranas (Oliart-Ros, 2001), (De la calle-Peña, 2008) y (Moreno-Gavilanes, 2010). Además, son fuentes de energía, ya que estos pueden ser almacenados en forma de triglicéridos, que al ser hidrolizados por lipasas específicas vuelven a ser ácidos grasos libres utilizables en procesos oxidativos.

El EPA y el DHA son precursores de metabolitos activos (Moreno-Gavilanes, 2010), como los eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos, prostaciclina y leucotrienos) sintetizados por medio de las ciclooxigenasas y lipoxigenasas específicas (como se aprecian en la figura 8), existen 3 series de Eicosanoides específicos, la serie 1 que proviene del ácido di-homo y linoleico, la serie 2 que proviene del ácido araquidónico y la serie 3 que proviene del ácido eicosapentaenoico, que exhiben un amplio rango de acciones fisiológicas en sistemas como: el cardiovascular, respiratorio, gastrointestinal, renal, inmunológico, nervioso y hematológico (De la calle-Peña, 2008).

El EPA y DHA son inhibidores competitivos muy potentes de Eicosanoides pro-inflamatorios (Oliart-Ros, 2001), también tienen otras funciones como:

- Combustible metabólico, altamente energético, aproximadamente 9 calorías por gramo.
- Colaboran en la regulación de la temperatura corporal.
- Envuelven y protegen órganos vitales como el corazón y los riñones.
- Vehículo de las vitaminas liposolubles A, D, E y K.
- Impiden que las proteínas sean empleadas como fuente de energía.

Se ha demostrado que el EPA pueden disminuir los niveles del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y que es un potente mediador de la activación endotelial y respuesta inflamatoria (Moreno-Gavilanes, 2010).

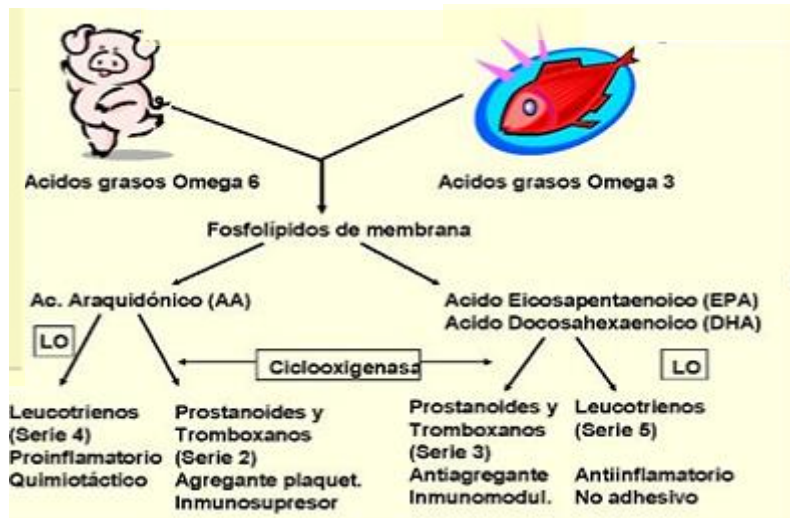


Figura 8.- Esquema que muestra la función de los Eicosanoides activos en la resolución de la inflamación producidos en una dieta a base de omega 3. Figura modificada de (Oliart-Ros, 2001)

El EPA inhibe la transcripción del gen de TNF- $\alpha$ , mediante la disminución de la activación del factor nuclear  $\kappa$ - $\beta$  (NF- $\kappa$  $\beta$ ), el cual se encuentra en el citoplasma de los linfocitos T y B, y debe ser traslocado al núcleo para activar al promotor del gen de TNF- $\alpha$ . Como consecuencia de una menor síntesis de TNF- $\alpha$ , se observa una respuesta inflamatoria endotelial y un efecto trombogénico menores (Farias & Julieta, 2011).

En la rutas metabólicas de los ácidos grasos se obtienen prostaglandinas (PG) leucotrienos (LT) tromboxanos (TX) resolvinas y LPX, en especial estas dos últimas se obtienen del DHA y EPA. Las resolvinas y LPX inhiben la generación de citocinas, la adhesión y diapédesis leucocitaria y la formación del exudado, con lo que la resolución del proceso inflamatorio es más rápido y con menos implicaciones para el organismo (De la calle-Peña, 2008), (Moreno-Gavilanes, 2010).

Las resolvinas estimulan la resolución de la inflamación a través de múltiples mecanismos, que incluyen la prevención de penetración de neutrófilos, inducen a la fagocitosis de los neutrófilos que sufren apoptosis y promueven la regeneración tisular.

Cuando la inflamación se prolonga más allá de los tiempos biológicos (más de 4-5 días), se convierte en una limitante para la regeneración de los tejidos, en este caso, algunas moléculas como los ácidos grasos O3 pueden tener una participación activa, el O3 a través de la lipooxigenasas sintetiza LPXs y éstas estimulan la resolución de la inflamación en los tejidos. Las LPXs son generadas dentro del lumen vascular por interacciones plaqueta-leucocitarias y biosíntesis transcelular que se lleva a cabo, durante las respuestas multicelulares como: inflamación, arterosclerosis y trombosis, y tienen entre sus funciones activar señales potentes que detienen selectivamente a los neutrófilos y activan la infiltración de eosinófilos; estimulan el reclutamiento no específico de monocitos, la fagocitosis de microorganismos y células apoptóticas por medio de macrófagos; aumentan la salida de los fagocitos del sitio inflamado a través de los vasos linfáticos; y estimulan la expresión de moléculas implicadas en la defensa antimicrobiana de los tejidos (Serhan C. N., 2008), (Felzani, 2005), (Medina, 2012).

En los seres humanos, la oxigenación inicial del AA a través de LPX15 (también denominada lipoxina desencadenada de aspirina (aspirin-triggered lipoxins [ATL]) y LPX5 se ha observado en las mucosas, como el tracto respiratorio, tracto gastrointestinal y la cavidad oral, y que resulta de las interacciones entre células epiteliales y leucocitos; y ejercen una actividad protectora durante la inflamación para restaurar la homeostasis en las superficies mucosas que están continuamente expuestas a microorganismos (Serhan C. N., 2008), (Serhan C.N., 2014), (Petasis, 2005).

Algunos autores han reportado que cuando la aspirina (ASS) es ingerida simultáneamente con los ácidos grasos O3 se metabolizan ambos, en nuevas moléculas de resolución que son más estables y por lo tanto, de acción más prolongada (Serhan C. H., 2002) (Van Dyke, 2007) y se sugiere que parte de la acción de la ASS, que está da como resultado de la producción de LPX y resolvinas.

Algunos de los autores que han realizado estudios experimentales sobre el uso de O3 con en el objetivo de resolver la inflamación son: Campan y cols (Campan, 1997) quienes probaron sí los O3 procedentes de pescado mejoraban el regeneración periodontal en 37 pacientes voluntarios sanos, a los cuales evaluaron índices de placa dental, inserción gingival y sangrado de encías. Estos pacientes realizaron cepillado dental 3 veces al día con técnica de Bass durante 14 días, posterior a estas dos semanas, los pacientes se abstuvieron de realizar cepillado de los órganos dentarios durante 21 días, con un total de 35 días de estudio, en el día 28 los pacientes fueron separados en dos grupos

21

aleatoriamente, el grupo A (n=18) recibió suplemento de aceite de pescado Omega 3 (6 gramos, 1.3 gramos cada 8 horas por 8 días), y el grupo B (n=19) pacientes recibieron un placebo que contenía aceite de oliva Omega 3 (al 1%). El grupo A mostro los niveles significativamente más altos de EPA, DHA y DPA, y al mismo tiempo, los niveles de ácido araquidónico, prostaglandinas y leucotrienos disminuidos; concluyendo con ello, que la regeneración de las encías, la inserción gingival y el sangrado de encías tuvo una evidente mejoría en el grupo que consumió O3 de aceite de pescado.

Rosenstein y cols (Rosenstein, 2003), realizaron un estudio en 30 pacientes para evaluar el grado de mejoría de periodontitis en pacientes a los que se les dio un suplemento de O3 a su dieta. Solo 24 pacientes lograron terminar el estudio piloto; estos se dividieron en 4 grupos, que durante 12 semanas consumieron: el grupo 1 consumió 500 miligramos de EPA (en dos capsulas tres veces al día), el grupo dos consumió 500 miligramos aceite vegetal (en dos capsulas tres veces al día [de aceite de borraja]), el grupo tres consumió (la combinación de los dos anteriores, una capsula de cada uno tres veces al día), y el cuarto grupo consumió un placebo consistente en dos capsulas tres veces al día. En sus resultados no encontraron diferencias entre los grupos de estudio, sin embargo, ellos afirman que observaron una tendencia hacia la mejoría en los grupos de tratamiento activo y que recomiendan el empleo del aceite vegetal por encima del de aceite de pescado o la combinación de ambos.

Vardar-Sengul S. y cols en el 2004 (Vardar S, 2004) evaluaron los posibles efectos terapéuticos del uso de ácido grasos O3 sobre los niveles la prostaglandina E2 (PGE2), prostaglandina F2 alfa (PGF2 $\alpha$ ), factor activador de plaquetas (PAF), y leucotrieno B4 (LTB4) en tejido gingival con periodontitis inducida por endotoxina (LPS= lipopolisacárido de Escherichia coli) en 36 ratas que dividieron en cuatro grupos de estudio: 1) control de solución salina; 2) LPS; 3) O3 durante 15 días después (TO3); y 4) profiláctico y tratamiento O3 (P+TO3). Iniciaron los tratamientos 15 días antes y 15 después de la periodontitis inducida. En sus resultados, ni la administración profiláctica/terapéutica (grupo P+TO3) ni en el grupo TO3, el omega 3 fue eficaz en la prevención de la pérdida ósea alveolar inducida por endotoxina, sin embargo, en el Grupo TO3 observaron una disminución significativa en los niveles de PGE2, PGF2 $\alpha$ , LTB4, y PAF en comparación con el grupo control. Curiosamente, reportaron que los niveles de PGE2 y PGF2alfa en el grupo TO3 fueron similares a los del grupo de solución salina, mientras que los niveles de LTB4 y PAF fueron estadísticamente más altos que en el grupo de solución salina. Así, concluyeron que los O3 pueden reducir



significativamente los niveles de estos eicosanoides en los tejidos periodontales, para así poder tener mejoría en la resolución de la enfermedad periodontal.

Pérez y cols en 2011 (Perez, 2011), evaluaron el efecto del aceite de linaza que es rico en ácido linolénico O3, sobre la fluidez membranal de células de ratas espontáneamente hipertensas y diabéticas (inducida mediante estreptozotocina 75mg/kg) de diferentes edades (1, 3 y 6 meses). Realizaron 4 grupos de estudio: A) ratas hipertensas con dieta normal; B) ratas hipertensas con suplemento de aceite de linaza (125 mg/kg) 5 días por semana; C) ratas hipertensas y diabéticas con dieta normal; y D) ratas hipertensas y diabéticas con suplemento de aceite de linaza (125mg/kg de peso) 5 días por semana. Se realizó el seguimiento semanal de glucosa y de la presión arterial por método pletismográfico. El EPA y DHA, que provienen del aceite de linaza tuvieron efectos benéficos en la prevención y control de diabetes e hipertensión, la glicemia se mantuvo de 92–100 mg/dl y una presión de 126/90 mm/Hg en el grupo D. Concluyeron que teniendo en cuenta lo anterior, es indiscutible el valor del O3 para el control de enfermedades crónicas degenerativas y la resolución de la enfermedad.

Melo y cols en el 2014 (Melo, 2014) evaluaron los efectos antioxidantes y anti peroxidativos de mezclas de aceite de alta relación de Ácidos grasos Omega cuando son medicados cuatro días antes y tres días después de la extracción del primer molar mandibular en ratas (n=32). Para ello, dividieron sus grupos de estudio de la siguiente manera: G1: Sham-Suero salino; G2: Suero salino; G3: Isolípidos (ácido alfa-linolénico - ALA) que contiene ácidos grasos omega 6 y 3 (en un ratio de 8:1) y ácidos grasos omega 9 y 6 (en un ratio de 0:4); G4: recibieron mezclas de omega 6 y 3 (en un ratio de 4:1) y omega 9 y 6 (en un ratio de 4: 1) (ALA, DHA y EPA). En sus resultados encontraron una disminución significativa en las concentraciones de glutatión (GSH) y de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en el G4 con respecto al control. Por ello, concluyeron que administrar a las ratas la combinación de aceite de alta relación O9:O6 y baja relación O6:O3 después de la extracción induce una disminución significativa en la peroxidación de lípidos, lo que conlleva a la formación de eicosanoides bioactivos reparadores, y por tanto, se ve reflejado como una mejoría en la resolución de la inflamación y con ello, promueven la regeneración /reparación de los diferentes tejidos.

Elkhouli y cols en el 2011 (Elkhouli, 2011) demostraron que al inhibir competitivamente la producción de metabolitos del AA a través de las vías ciclooxigenasa y lipooxigenasas, se reduce la síntesis de metabolitos pro inflamatorios que son eicosanoides. Además, la eliminación de la inflamación dentro de la lesión por medio de los mediadores lipídicos (resolvinas y protectinas)

con acciones anti-inflamatorias e inmunorreguladoras, promueven la regeneración de tejido a través de la regulación del tráfico de células inflamatorias y del bloqueo en la producción de citoquinas pro inflamatorias.

Medina y cols (Medina, 2012) reportaron que la biodisponibilidad de los O3 cuando son ingeridos en la dieta es rápida, y a partir del segundo día de administración se ha observado que hay una disminución del nivel de citoquinas pro-inflamatorias como: COX1 y COX-2, y con ello un aumento en la producción de resolvinas y LPXs, en esta producción de eicosanoides bioactivos, la resolución de la inflamación en tiempos cortos y la inhibición de PGE2.

## ASPIRINA.

La Aspirina (ASS), es un fármaco de la familia de los salicilatos usado frecuentemente como antiinflamatorio, analgésico, antipirético y antiagregante plaquetario. Actúa como un inhibidor no selectivo de las isoformas de la ciclooxigenasa que son: la ciclooxigenasa-1 (COX-1) y la ciclooxigenasa-2 (COX-2), sin embargo cuando la ASS ya ha sido metabolizada su producto metabólico, el ácido salicílico (AS), es menos eficaz en la inhibición de ambas isoformas.

La inflamación se caracteriza por la producción de citoquinas pro-inflamatorias denominadas eicosanoides derivadas del AA (prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos), estos eicosanoides juegan un papel clave en la iniciación y patogénesis de la lesión inflamatoria. Las LPXs son producto de la lipoxigenasas y contribuyen activamente a la resolución de la inflamación. La resolvina E1 es una molécula que promueve la resolución de la inflamación, y es metabolizada por la COX-2, que a su vez puede ser modificada por la ASS, ya que está reduciendo sus niveles, lo que contribuirá a mejorar la resolución de la inflamación, que es necesaria para el retorno a un tejido sano (Medina, 2012).

A través de la vía de la COX-2, la ASS conduce a la producción de lipoxinas derivadas de la aspirina (ATL), y que la ASS a través de la acetilación actúa como un inhibidor selectivo de la COX-2. En cambio, la acetilación cambia la quiralidad de los productos de la enzima y genera ATL o AT mediadores lipídicos O3. Por lo tanto, la ASS tiene una capacidad única entre los anti-inflamatorios no esteroideos, de iniciar la resolución de la inflamación mediante la estimulación de la formación temprana de mediadores que normalmente se llevaría a cabo más tarde en el curso de una respuesta inflamatoria. Debido a estos nuevos mediadores derivados de lípidos, llamados resolvinas y protectinas, la ASS ayuda a controlar la duración y la magnitud de la inflamación en modelos animales, y la asignación de estos circuitos de resolución puede proporcionar nuevas formas de entender la base molecular de muchas enfermedades inflamatorias (Serhan C. N., 2008).

Los prostanoides son eicosanoides sintetizados por la vía de la COX. Pertenecen a este grupo las PG y el TX, por otro lado las LPX son compuestos que se generan a partir de AA por la vía de las lipooxigenasas, pero a diferencia de los TX y PG, las LPX son inhibidores de la inflamación.

Las principales acciones de las LPX son: inhibir el reclutamiento de los leucocitos y componentes celulares de la inflamación, inhiben la quimiotaxis de los neutrófilos y la adherencia al endotelio, se sugiere que son reguladoras negativas endógenas de los LT.

La ASS inhibe irreversiblemente a la COX-1 y modifica la actividad enzimática de la COX-2. Por lo general, la COX-2 produce prostanoideos, la mayoría de los cuales son pro-inflamatorios; al ser modificada o inhibida la COX-2 por la ASS se producen LPXs que tienden a ser antiinflamatorias (Pérez R. G., 2002).

Dos vías importantes están involucradas en la biosíntesis de Eicosanoides, la vía cíclica y la vía lineal. Las PG y los TX se sintetizan por la vía cíclica, los LT por la vía lineal, y hay una tercera vía, que es la de la biosíntesis las LPXs, que involucra a la PG H-II en células endoteliales y a la LPX-5 en leucocitos generando así, una nueva LPX denominada 15-epi-lipoxina (15epiLPX), y esta se forma cuando la PG H-II se acetila después del tratamiento con ASS como se aprecia en la figura 9. Esta 15epiLPX representa el efecto de la AAS sobre la función oxigenante de COX-2 (Medina, 2012), (Elkhouli, 2011).

Además de que la ASS inhibe mediadores lipídicos como a las PG, también posee “una habilidad única para inducir la formación de resolvinas y protectinas que actúan sobre las células endoteliales vasculares” (Medina, 2012), para la resolución pronta de la inflamación y del daño tisular. La administración de ASS, como sucede con la LPA, incrementa la estabilidad y permanencia de la actividad de las resolvinas y protectinas (Serhan & Chiang, 2008)

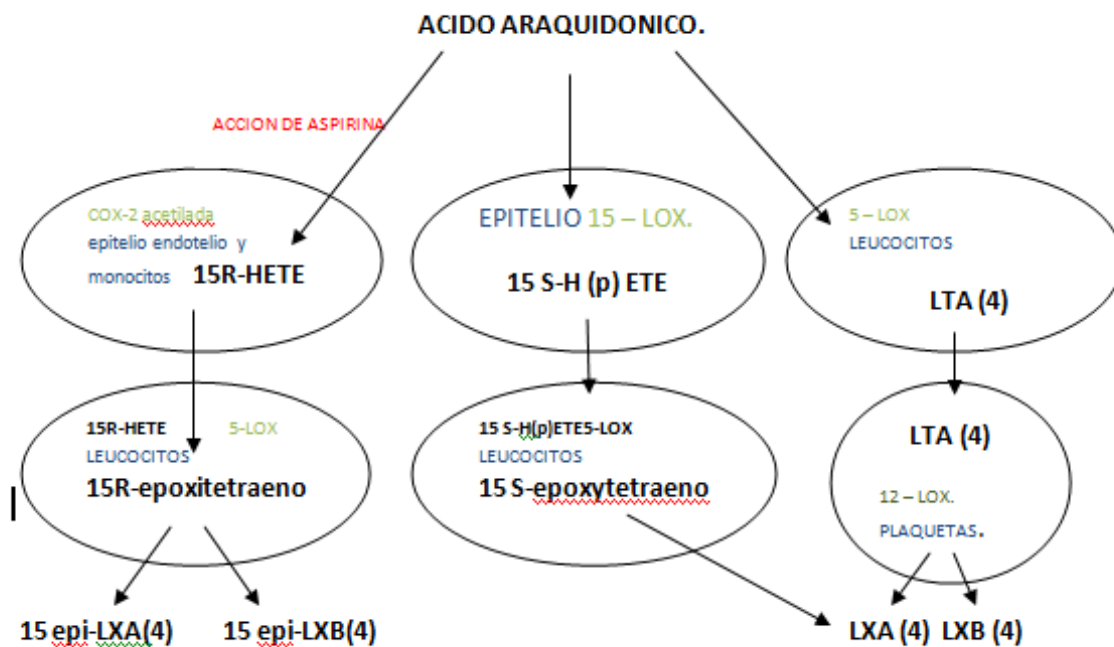


Figura 9.- Esquema que explica la Síntesis de 15-epi-LPX por la acción que ejerce la AAS cuando acetila a COX-2. Figura modificada de (González, 2008)

Lack y cols en el 2013 (Lack, 2013) evaluaron el efecto de la ASS en la cicatrización del hueso. En su estudio utilizaron 56 conejos, que dividieron en 5 grupos: 1) el grupo control (n=9), se les administro Indometacina (12,5 mg/kg al día); El grupo experimental (n=48) a los que se les administro diferentes dosis: 1) n=10 2,7 mg/kg al día, 2) n=9,10mg/kg al día, 3)n=10 50 mg/kg dos veces al día y 4) n=9 100 mg/kg tres veces al día. Cabe mencionar que 6 conejos fueron excluidos del estudio. En sus resultados reportaron que la ASS retraso la curación del hueso de una manera dosis dependiente en las pruebas radiográficas y mecánicas. Ellos concluyeron que este retraso fue observado cuando la dosis de ASS fue superior a un equivalente de 325 mg en humanos. Los hallazgos realizados por estos autores, nos ayudaron a determinar una dosis de estudio efectiva y representativa comparada con el humano, para observar en los tejidos de la mucosa oral la resolución de la inflamación.

Las LPX, resolvinas, y protectinas, se biosintetizan activamente en la fase de resolución de la inflamación aguda y son potentes agonistas que controlan la duración y magnitud de la inflamación. Las LPX activan la infiltración de células mononucleares, pero sin estimular su activación, evitando con ello que liberen citocinas pro inflamatorias, también estimulan y mejoran la captación de PMNs apoptóticos y los mecanismos de defensa antimicrobianos en las superficies mucosas (Serhan C. N., 2008).

## TERAPIA DE MODULACIÓN DE RESPUESTA DEL HUÉSPED.

La terapia de modulación de respuesta del huésped, consistente en el tratamiento a base de O3 más ASS en dosis bajas, es un término que empleo por primera vez Elkhoulí AM en el 2011 (Elkhoulí, 2011) quienes reportaron que el uso conjunto de ASS y O3 pueden ejercer un efecto modulador del huésped, ya que induce a la formación de resolvinas y protectinas en los sitios con inflamación, esta acción sugieren, se presenta a partir de EPA y DHA (provenientes de O3) y en presencia de ASS, ya que las células pueden producir una variedad de mediadores lipídicos de potente acción anti-inflamatoria como son las resolvinas. La ASS es crítica para la actividad mejorada de los estereoisómeros (18R- frente 18S-resolvinas) a través de sus acciones que modifican la actividad y la especificidad de la COX-2 (El-Sharkawy, 2010). El objetivo de esta terapia de modulación de respuesta del huésped sería el control de las reacciones inmuno-inflamatorias locales dentro de los sitios de curación, lo que podría mejorar los resultados regenerativos.

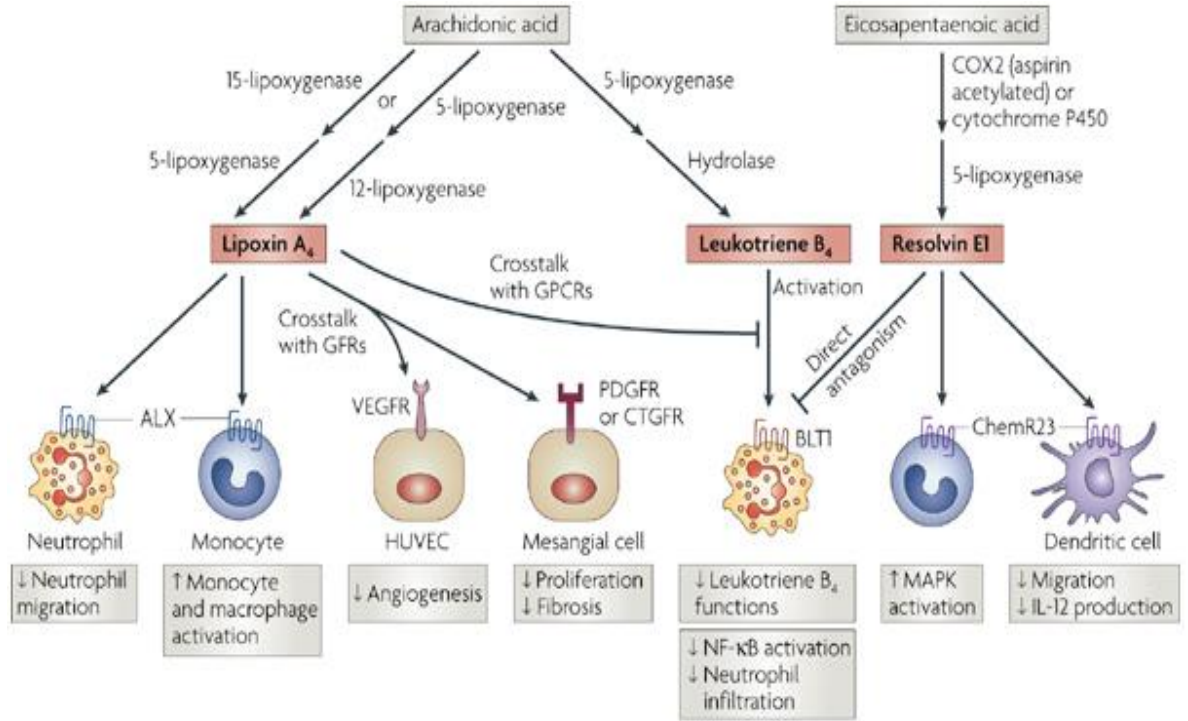
Vardar-Sengul y cols en el 2008, fueron los primeros en usar esta combinación de terapia (aunque no la llamaron así) en un modelo experimental de periodontitis y para ello emplearon 51 ratas, que dividieron en seis grupos de estudio: control de solución salina, LPS, LPS+celecoxib, LPS+omega-3 (TO3), profiláctico omega-3+LPS+omega-3 (P+TO3) y LPS+celecoxib+omega-3 grasos ácido; durante 14 días. En sus resultados obtuvieron que la pérdida de hueso alveolar fue significativamente mayor en todos los grupos de estudio en comparación con el grupo control de solución salina. La expresión de Metaloproteinasa 8 (MMP-8) fue significativamente mayor en el grupo LPS que en el grupo de solución salina (P = 0,001). Se encontró baja expresión de MMP-8 en el grupo Celecoxib, P + TO3, y grupos de combinación. TO3 aumentó la expresión del Inhibidor de Metaloproteinasas 1 (TIMP-1) significativamente en comparación con el grupo LPS. Los grupos con Celecoxib individual y con administración de P + TO3 aumentaron significativamente la expresión de Metaloproteinasa 14 (MMP-14) en comparación con el control de solución salina y el grupo LPS. Además de esto, no encontraron diferencias significativas en la expresión de Laminina  $\alpha$ -5 $\gamma$ 2 y de Metaloproteinasa 13 (MMP-13). Así, ellos concluyeron que el uso de celecoxib+P+TO3 pueden inhibir la expresión de MMP-8 en el tejido gingival. Además, la administración individual de O3 puede aumentar la expresión de TIMP-1 en el tejido gingival.

El-Sharkawy y cols en 2010 (El-Sharkawy, 2010), llevaron a cabo un estudio clínico en pacientes con periodontitis severa, en el que evaluaron la ganancia de inserción gingival tras el tratamiento periodontal de raspado y alisado radicular, y

la administración conjunta de O3. El estudio se dividió en 2 en grupos, el primer grupo (n=40) recibió una dieta placebo con aceite de germen de trigo y el segundo grupo (n=40) recibió una dieta de aceite de germen de trigo más un suplemento alimenticio de aceite de pescado en una dosis de 900 mg de EPA y DHA al día y bajas dosis de Aspirina (81 mg al día), después de 6 meses de terapia. Obtuvieron muestras de saliva a los 3 y 6 meses para evaluar los niveles de MMP-8, además de las evaluaciones clínicas. En sus resultados observaron que los pacientes tratados con el O3 experimentaron una ganancia de inserción significativamente mayor que los pacientes del grupo control, además encontraron que los niveles salivales de RANKL (Receptor Activador del Factor Nuclear  $\kappa$ - $\beta$ ) y de la MMP-8, que son mediadores con función de resorción ósea, se observaron disminuidos en el grupo experimental con respecto al control. Los resultados de este estudio clínico preliminar sugieren que la suplementación dietética con O3 y 81 mg de ASS pueden mejorar la terapia periodontal a un bajo costo.

Elkhouli y cols (Elkhouli, 2011) evaluaron la regeneración de los tejidos de la furca dental en pacientes con enfermedad periodontal a los que les administraron O3+ASS en bajas dosis utilizando aloinjerto de hueso liofilizado (DFDBA). Para ello, emplearon 40 pacientes que padecían periodontitis severa, con al menos un grado II de defecto de furca, de acuerdo a la clasificación de Glickman, se dividieron en dos grupos: el grupo uno recibió el DFDBA más capsulas de O3 (300 miligramos de DHA y 150 miligramos de EPA) tres veces al día y ASS 75 miligramos diarios durante 6 meses. En sus resultados a los seis meses, el grupo experimental exhibió una mayor ganancia de inserción y una mayor reducción de la profundidad de sondaje, así como una reducción de los marcadores inflamatorios: IL-1 $\beta$  e IL-10 con respecto al control, por lo que el tratamiento de O3+ASS mostró ser eficaz para la mejora de lesiones que involucran a la mucosa oral.

Es por esto, que los ácidos grasos O3 y la ASS pueden interactuar en conjunto para promover la resolución de la inflamación (véase figura 10), promovida en este caso, por una herida en la mucosa masticatoria palatina.



Nature Reviews | Immunology

Figura 10.- Esquema sobre la producción de resolvin E1 mediante el uso y aplicación de EPA y ASS mediante la 5-lipoxygenasa para la resolución de la inflamación. Figura tomada de (Serhan C. N., 2008)



## JUSTIFICACIÓN.

En la práctica odontológica las lesiones de la mucosa masticatoria son comunes, y en la mayoría de los casos, tienen que cicatrizar por segunda intención; este tipo de lesiones tiene lugar a consecuencia de extracciones, traumatismos, toma de injertos, etc. y cuando el epitelio no cicatriza adecuadamente se pueden presentar complicaciones como: alveolitis, osteomielitis y Osteonecrosis., que puede verse agravadas cuando nuestro paciente esta sistémicamente comprometido.

La presente tesis busca poder dar al El Cirujano Dentista alternativas viables para beneficio de los pacientes, a fin de que este tipo de complicaciones puedan prevenirse.

La inflamación aguda es normalmente un mecanismo de protección de los tejidos, sin embargo una respuesta inflamatorias no controladas excesivas o exacerbadas pueden conducir a trastornos crónicos o a una regeneración deficiente de los tejidos. La terapia de modulación de respuesta del huésped (de Omega-3 con dosis bajas de ASS) pretende establecer un entorno tisular más armónico a través de los mediadores protectores derivados de EPA y DHA como son: LPX, resolvinas y protectinas.

En la regeneración de la mucosa en un cierre por segunda intención, se requiere de un balance entre los factores pro y anti inflamatorios, esto permite entender la razón por la cual, el aporte la terapia de modulación de respuesta del huésped podría ser útil en el paciente, ya que representa una terapéutica fácil de seguir por parte del paciente, no representa ningún riesgo a la salud, es accesible y de bajo costo.

## **HIPÓTESIS:**

La combinación de una dieta previa, rica en omega 3, en conjunto con una pre-medicación de AAS a dosis bajas en un modelo de lesión de mucosa oral, sí mejorará la reepitelización y regeneración de la mucosa en un área quirúrgica que cerrará por segunda intención.

## **OBJETIVO GENERAL:**

Evaluar la reepitelización y regeneración de la mucosa en un área quirúrgica que cerrará por segunda intención en un modelo de rata Wistar cuando proporcionaremos una dieta previa rica en Omega 3, en conjunto con un pre-tratamiento a base de AAS.

## **OBJETIVOS PARTICULARES:**

Realizar las observaciones histológicas en un modelo en rata de reepitelización por segunda intención.

Analizar y comparar las características histopatológicas del área donde se realizó la intervención quirúrgica, de cada uno de los grupos de estudio.

## MATERIAL Y MÉTODOS.

Todos los procedimientos realizados en la presente tesis se realizaron con apego a la NOM-062-ZOO-1999, sobre el manejo de animales en el laboratorio, y con la aprobación y los estándares establecidos por la **Comisión de Bioética** de la FES Iztacala bajo el folio 1074. El manejo de los residuos peligrosos biológicos infecciosos (RPBI) como cadáveres, serrín de las camas, suturas, hojas de bisturí, etc. se realizó de acuerdo a la NOM-087-ECOL-SSA1-2000 y avalados por **Comisión de Bioseguridad** de la FES Iztacala bajo el folio 036.

Durante el periodo de experimentación, los especímenes se mantuvieron en el Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala a una temperatura de entre 21 ° -27 ° C en donde se les proporciono acceso *ad libitum* de agua y comida, y fueron monitoreadas cada tercer día para supervisar su cicatrización y comportamiento.

Se emplearon 24 ratas Wistar Macho con un peso entre 200/250 g que se dividieron en los siguientes grupos de estudio (n=6):

- ✓ Grupo **Sham** : Control cirugía simulada o cirugía placebo, sin medicación= SHAM
- ✓ Grupo **CT**: grupo sin cirugía sin medicación.
- ✓ Grupo **O3**: Cirugía con dieta previa de Omega 3, 15 días antes y 21 días después.
- ✓ Grupo **AAS**: Cirugía en especímenes previamente medicadas con Ácido Acetil salicílico 15 días antes y 21 días después.
- ✓ Grupo **O3+AAS**: Cirugía con dieta de Omega 3 y medicación previa de Ácido Acetilsalicílico, 15 días antes y 21 días después.

### Material estándar

- Bata obligatoria
- Cubre boca
- Sanitas
- apósitos quirúrgicos
- campos quirúrgicos
- Jabón
- Solución para limpieza del lugar (hipoclorito de sodio)
- Guantes
- Algodón o gasas.

### Material pre-operatorio.

- Omega 3 (GNC) No. Catalogo: 100107017.
- Ácido Acetilsalicílico. (10 mg / kg/ día) (SIGMA) No. Catalogo: 200-064.

Material para procedimiento quirúrgico:

- Ketamina (60mg/kg) PISA No. Catalogo Q-7833-028.
- Xilazina (7mg/kg) PISA No. Catalogo Q-7833-099.
- Jeringas de insulina.
- Tabla de madera de 34cmx28cm.
- Antiséptico.
- Tubos capilares modificados 1.5 mm como dispositivos quirúrgico para realización del defecto quirúrgico.
- cucharillas de uso odontológico.
- Pinzas de disección.
- Fuente de Luz.

Material para disección:

- Tijeras, pinzas para disección.
- Jeringa para lavar las muestras.
- Contenedor para lavar muestras.
- Frascos etiquetados.
- Solución fijadora OSTEOSOFT® Merck, No.Catalogo 1,01728.

## DISEÑO EXPERIMENTAL

### METODOLOGÍA PARA DIETA DE OMEGA 3.

La dosis elegida para este estudio, con respecto al suplemente de omega 3 en la dieta fue de: 10 mg equivalentes a 510 µl de Omega3 en el humano equivale a 2,000 mg por día (Naqvi, 2014).

Se usó el omega 3 de la marca GNC con número de catálogo 100107017 y número de lote SB007541: Las capsulas se rompieron en esterilidad y se juntó el contenido en frasco estéril para poder manipularlo a la hora de medicar a los especímenes vía oral con una sonda.

La dosis diaria de bebida de Omega 3 recomendad como suplemento alimenticio en los humanos es de 2000mg por Kg de peso al día. Teniendo en consideración que los animales pesaron entre 250+/-50 gramos, se llegó a una media en donde

cada rata consumió una dosis de 10mg equivalentes a 510µl de Omega3 al día (Naqvi, 2014).

## METODOLOGÍA DE LA PRE-MEDICACIÓN CON ASS.

El consumo de agua al día por rata es aproximadamente de 20 a 45 ml, esto depende de: el estado de ánimo, condición climatológica y estado de salud, entre otro; esto puede traducirse a que una rata en promedio consumirá agua en proporción equivalente a un 20 % de su peso corporal por día (López-Espinoza, 2001).

En nuestro estudio las ratas se colocaron en jaulas de acrílico, en cada jaula se colocaron 5 ratas, no se colocaron aisladas con la intención de no deprimir su estado de ánimo, a cada caja con 5 ratas se le denominó "lote"; cada lote de ratas en promedio consumieron 250 ml de agua al día.

La dosis diaria de bebida de ASS fue de 25mg por Kg de peso al día. Teniendo en consideración que los animales pesaron entre 250+/-50 gramos, se llegó a una media en donde cada rata consumió una dosis de 6.25 mg de ASS. Por lo que cada lote consumió un bebedero milimetrado con 1750 ml de agua con 218.75mg de ASS cada dos días, (Martinez A. B., 2011) esta baja dosis administrada en cada espécimen transportada al humano se traduce que debe consumir una dosis de 81 mg hasta 300mg por día para obtener beneficios significativos para reducir las COX 1 y COX 2 (El-Sharkawy, 2010), (Naqvi, 2014). Para la preparación de la bebida se realizaron cálculos exactos. Se colocaron 400 ml de agua potable en un vaso de precipitado en el cual se depositaron 218.75 mg de aspirina como se aprecia en la figura 11.

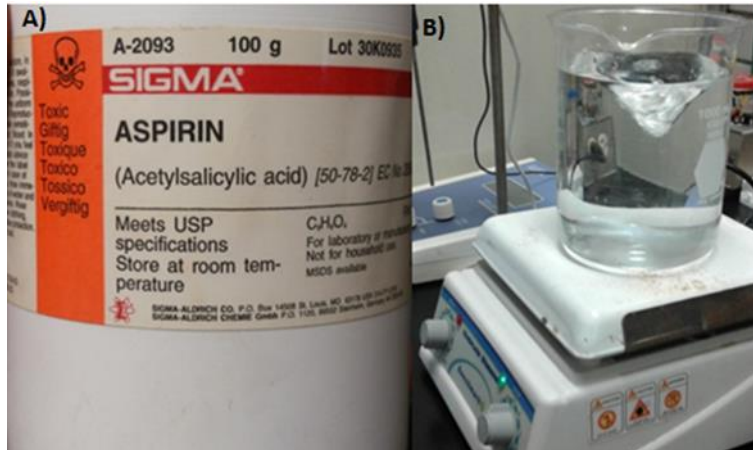


Figura 11: A) Fotografía de medicamento que se utilizó para el estudio B) Disolución de medicamento en agua para bebida de ratas.

Posteriormente, se llevó la bebida al Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala y se llenaron los contenedores con la bebida preparada, y para tener un control de que la bebida no fuera cambiada por el personal del Bioterio, se etiquetaron los lotes con un letrero con la leyenda: “no cambiar bebedero ni dar agua, bebida especial”

La técnica para medicar a los especímenes por la vía oral consistió en sujetar al animal inmovilizándolo con la extensión total de la palma de la mano con ayuda de un campo o tela, colocando al espécimen sobre su propia espalda, cuando el animal dejó de moverse se procedió a la colocación del dedo pulgar, índice y anular sobre su cuello, inmediatamente por debajo de la nuca, se realizó tracción de la piel de manera que la rata no pudiera mover su cabeza o extremidades y con una ligera apertura bucal a consecuencia de la tracción de la piel, se empleó una micro-pipeta despachadora tipo eppendorf, previamente cargada con la dosis de omega 3 correspondiente, se procedió a la colocación de la punta de la pipeta lo más posterior a la cavidad bucal evitando lesionar estructuras como: paladar, lengua, carrillos u orofaringe, como se observa en la figura 12, se realizó la descarga del contenido, esperamos 10 segundos a que el animal consumiera el total de lo administrado. Se realizó una marca en la cola para identificarla y no repetir la dosificación.



Figura 12: A) forma incorrecta de sujetar al animal, las extremidades pueden impedir la administración completa del suplemento. B) forma correcta y sujeción del animal para administrar por complemento el suplemento alimenticio.

## DISEÑO Y PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO

### PROCEDIMIENTO PRE-QUIRÚRGICO:

Dos semanas previas a la intervención quirúrgica se administró, de acuerdo al grupo de estudio, Ácido Acetil Salicílico y una dieta de Omega 3. Los especímenes fueron pesados previamente para determinar la dosis exacta.

Procedimiento quirúrgico:

1. Se anestesió a las ratas con Ketamina y Xilazina (jeringas independientes) con una dosis de acuerdo a su peso, como se observa en la tabla 1.

Dosis de Ketamina			
60mg	———— 1000mg	————>	100mg ——— 1mL
X	— Peso del animal		Resultado ——— X mL
Dosis de Xilazina			
7mg	———— 1000mg	————>	20mg ——— 1mL
X	— Peso del animal		Resultado ——— X mL

Tabla 1: Dosis ideal de Ketamina y Xilazina para provocar anestesia a los especímenes, de acuerdo al peso del animal.

2. Se colocó anestésico y esperamos un promedio de 4 minutos hasta que estuvieron completamente anestesiadas, y posteriormente, se colocaron en una base de madera, se sujetaron las extremidades con cinta adhesiva e hilo cáñamo. Se sujetaron los incisivos para abrir la cavidad bucal, posteriormente, con una pinza de exploración se separaron los carillos para obtener una mejor visión del campo de trabajo.
3. Posteriormente, con un tubo capilar se realizó la lesión, entre el 1ero. y 2ºdo molar como se aprecia en la figura 13, antes de tocar el rafe medio, se retiró obteniendo así una lesión redonda de 1.5 mm de diámetro y con el excavador de uso dental afilado se retiró la mucosa y se raspo el hueso hasta retirar el periostio, observar figura 14
4. Se realizó hemostasia con presión en el área de la herida con torundas de algodón pequeñas y estériles.
5. Por último, se retiró el hilo cáñamo de los incisivos, se retiró el espécimen de la base de madera y se colocó en observación por 30 min aproximadamente para descartar alguna reacción posterior a la anestesia.
6. Se mantuvieron en observación todos los días.



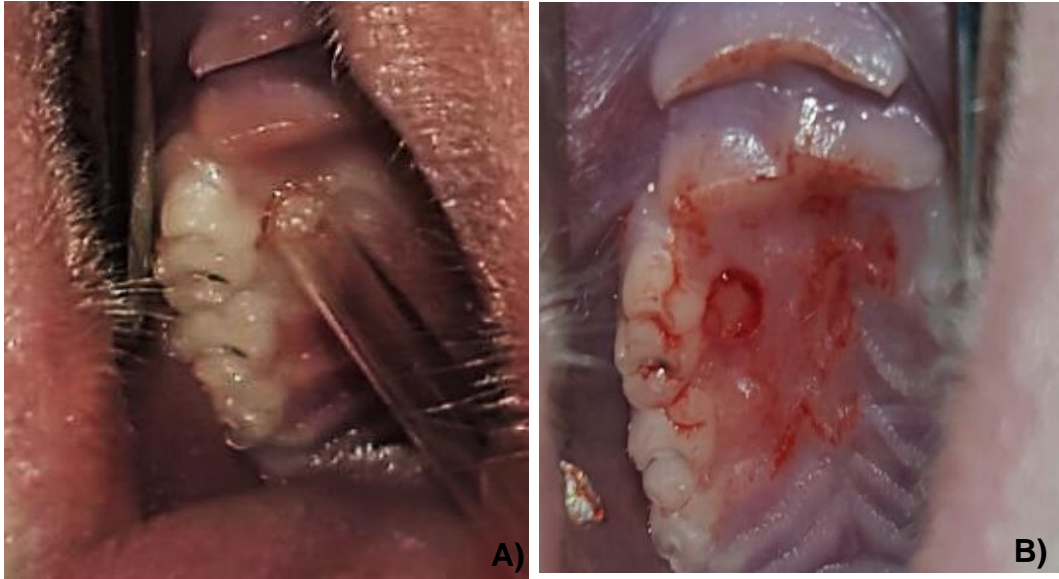


Figura 13.- Fotografías en donde se observa: A) tubo capilar con el que se realizó la lesión en la mucosa palatina a espesor total; B) Lesión realizada en hemi-maxila derecha después de retirar el tejido recortado por el tubo de capilar.

## PARÁMETROS DE EVALUACIÓN CLÍNICA.

Posterior a las intervenciones quirúrgicas y del tiempo de estudio, se evaluó la mortalidad, morbilidad, la presencia de cicatrización o reepitelización; con apoyo de las fotografías *post mortem* inmediatas

La reepitelización de heridas se evaluó macroscópicamente, y el campo quirúrgico fue fotografiado 21 días después de la operación.

## PROCEDIMIENTO POSTQUIRÚRGICO.

Pasados los 21 días de estudio, se realizó el sacrificio mediante sobre-exposición a CO<sub>2</sub> durante un periodo de 15min. Se diseccionaron las maxilas y se realizó una serie de fotografías para la evaluación clínica en el área de la lesión, observando si habrá o no infección y la reepitelización.

Ya extraída la maxila, se lavó a chorro con agua y se colocó en un fijador (OSTEOSOFT®) y se tomó radiografía para el seguimiento de la descalcificación.

Posterior a la descalcificación de la muestra, que en promedio duro 3 semanas, se procedió con la inclusión en parafina de cada muestra, la cual consiste en colocar

los maxilares en un cubo o anillo metálico, para ubicar la muestra dentro del cubo se colocó la cara mesial de los primeros molares hacia el fondo del cubo, y la cara oclusal en dirección frontal, con la finalidad de que al momento de realizar los cortes en el micrótopo, visualizar los dos molares y el lecho de la lesión o reepitelización, en un corte sagital.

La parafina debe estar en estado líquido para facilitar la inclusión de la muestra, es importante saber que la parafina no debe superar los 60°C ya que puede estar caliente en exceso y quemar la muestra, esto podría alterar la metodología al realizar los cortes histológicos, después de que la muestra está orientada dentro del cubo y en la base una loleta de cristal para evitar derrames de la parafina líquida, se procede a vaciar la parafina dentro del contenedor metálico hasta cubrir el maxilar por lo menos 5 mm de excedente, esto con el objetivo que cuando la parafina se comience a enfriar, la contracción que se genere, no sea motivo para que la muestra este expuesta a consecuencia del enfriamiento y contracción de la parafina, después que la parafina haya concluido el tiempo de enfriamiento total se procede a realizar cortes histológicos.

#### OBTENCIÓN DE LOS CORTES SERIADOS HISTOLÓGICOS.

Lo cortes se realizaron a un grosor de 7 micras, en el micrótopo (Leica®) de la Unidad de Biomedicina (UBIMED), con el baño de flotación para el extendimiento de las muestras con los porta objetos previamente poli- L- lisinados, (observe figura 14), y en la Unidad de Morfo-fisiología (UMF) (véase figura 15).



Figura 14.- Micrótopo ubicado en UBIMED, se realizaron cortes de 7 micrómetros, con navaja de alto perfil y baño de flotación con agua destilada.



Figura 15.- Micrótopo Leica ubicado en Unidad de Morfo fisiología, se realizaron cortes de 7 micrómetros con navaja de bajo perfil, y plancha de extendimiento de muestras con solución Ruyter.

Se realizaron cortes seriados, desde el porta 1 hasta el porta 24 en cada porta se colocaron al menos tres muestras hasta un máximo de cinco, después que se realizaron 24 portas de cada muestra se procedió con la tinción de los portas que llevaban los números 1, 12 y 24 con la finalidad de observar si la zona de interés de encontraba dentro de esa serie de 24 portas, en dado caso que los porta objetos teñidos no hayan alojado la zona de interés, procedíamos a realizar tinción de portas cercanos para obtener la muestra de interés para nuestro estudio.

#### *TINCIÓN CON HEMATOXILINA Y EOSINA:*

Para la realización de la tinción con hematoxilina y Eosina (H&E) fue necesario desparafinar los porta objetos con los cortes, en el horno de parafina durante 24 horas a 60 °C, pasado este espacio de tiempo se procedió con la técnica en el tren tinción, (observe figura 16), siguiente:

Sumergir las muestras en:

XILOL I: 5 minutos.

XILOL II: 5 minutos.

ALCOHOL 100°: 3 minutos.

ALCOHOL 96°: 3 minutos.

ALCOHOL 90°: 3 minutos.

ALCOHOL 80°: 3 minutos.

ALCOHOL 70°: 3 minutos

AGUA CORRIENTE: 3 minutos.

HEMATOXILINA DE HARRIS: 12 minutos.

AGUA CORRIENTE: lavar hasta eliminar exceso de colorante.

ALCOHOL ACIDO: paso rápido.

AGUA CORRIENTE: lavar.

AGUA AMONIACAL: se debe sumergir hasta virar azul.

AGUA CORRIENTE: lavar.

EOSINA: 6 minutos.

ALCOHOL 96°: 30 segundos.

ALCOHOL 100° I: 3 minutos.

ALCOHOL 100° II: 5 minutos.

XILOL I: 5 minutos.

XILOL II: 5 minutos.

Posterior a la tinción, se realizó el montaje de cubre objetos con Entellan, evitando el atrapamiento de aire entre el porta objetos y el cubre objetos para evitar la formación de burbujas.



Figura 16.- Fotografía que muestra el treno de tinción para H&E.

### EVALUACIÓN HISTOPATOLÓGICA.

Se utilizó microscopio óptico AXIO LAB de Zeiss®, con el programa “ZEN” de Carl Zeiss®. Se tomaron fotografías panorámicas a: 5x y 10x, y a detalle de la lesión a: 40x, 63x y 100x para su observación histológica.

El microscopio fue calibrado mediante el uso de la platina de  $5+^{100/100}$ mm de Carl Zeiss® con número de catálogo: 474026 para ajustarlo a hacer medidas reales.

Se midió la longitud de las crestas epiteliales y papilas coriales en las imágenes tomadas a 10x de cada una de las ratas.

Después de haber realizado la toma fotográfica con el programa “ZEN”, realizamos mediciones con ayuda de la barra de herramientas, seleccionamos “Edit”, para así poder editar la imagen y después de esto en la misma barra de herramientas seleccionamos “Acquisition” para seleccionar un punto específico a otro para ejecutar la medición lineal, posterior a esto tenemos se seleccionó el icono “Graphics” para así automáticamente obtener una gráfica de las mediciones realizadas.

Para el conteo del número de papilas en las muestras, con las mismas fotografías a 10x de todo los especímenes y con ayuda del programa se colocó la medida de longitud de  $50\mu\text{m}$  y se contó el número de crestas y papilas dentro de esta longitud.

Al final, cuando se tenían todos los datos y mediciones correctas, se debía guardar la imagen con las respectivas anotaciones sobre la misma.

### Análisis de la extensión lineal del epitelio.

Para este análisis se empleó el microscopio óptico binocular MOTIC® del Laboratorio de Investigación en Educación y Odontología (LIEO) del Dr. José Francisco Gómez Clavel y el software MOTIC IMAGES PLUS®, con el que se tomaron fotografías con el objetivo a 10x y se realizaron mediciones en la capa basal del epitelio usando un patrón de extensión lineal de 100.155  $\mu\text{m}$ .

### ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.

Los análisis estadísticos se realizaron a partir de las mediciones en la longitud de las crestas epiteliales y de las papilas coriales en micrómetros, con el programa ZEN. Posteriormente, se registraron una hoja de Excel y transferidos para su cálculo estadístico al programa GraphPad Prism 4 versión 4.0 para Windows, realizando análisis de ANOVA de una vía y el post hoc de Bonferroni, ya que en los parámetros que se aplicó estadística se contaba con más de 30 datos a partir de las muestras estudiadas.

## RESULTADOS.

### RESULTADOS CLÍNICOS.

Ninguno de los especímenes murió durante los experimentos realizados, por lo que el índice de mortalidad fue de 0%. El modelo quirúrgico resulto efectivamente mínimamente invasivo, que permitió que los especímenes se alimentaran, deglutieran y respiraran sin alteración de la función del sistema estomatognático, por lo que la morbilidad fue de 0%.

En todos los especímenes se observó una reepitelización completa al cabo de los 21 días que fue nuestro tiempo de estudio, de la mucosa oral se observó sin ninguna alteración macroscópica evidente de la mucosa masticatoria palatina (véase figura 17).



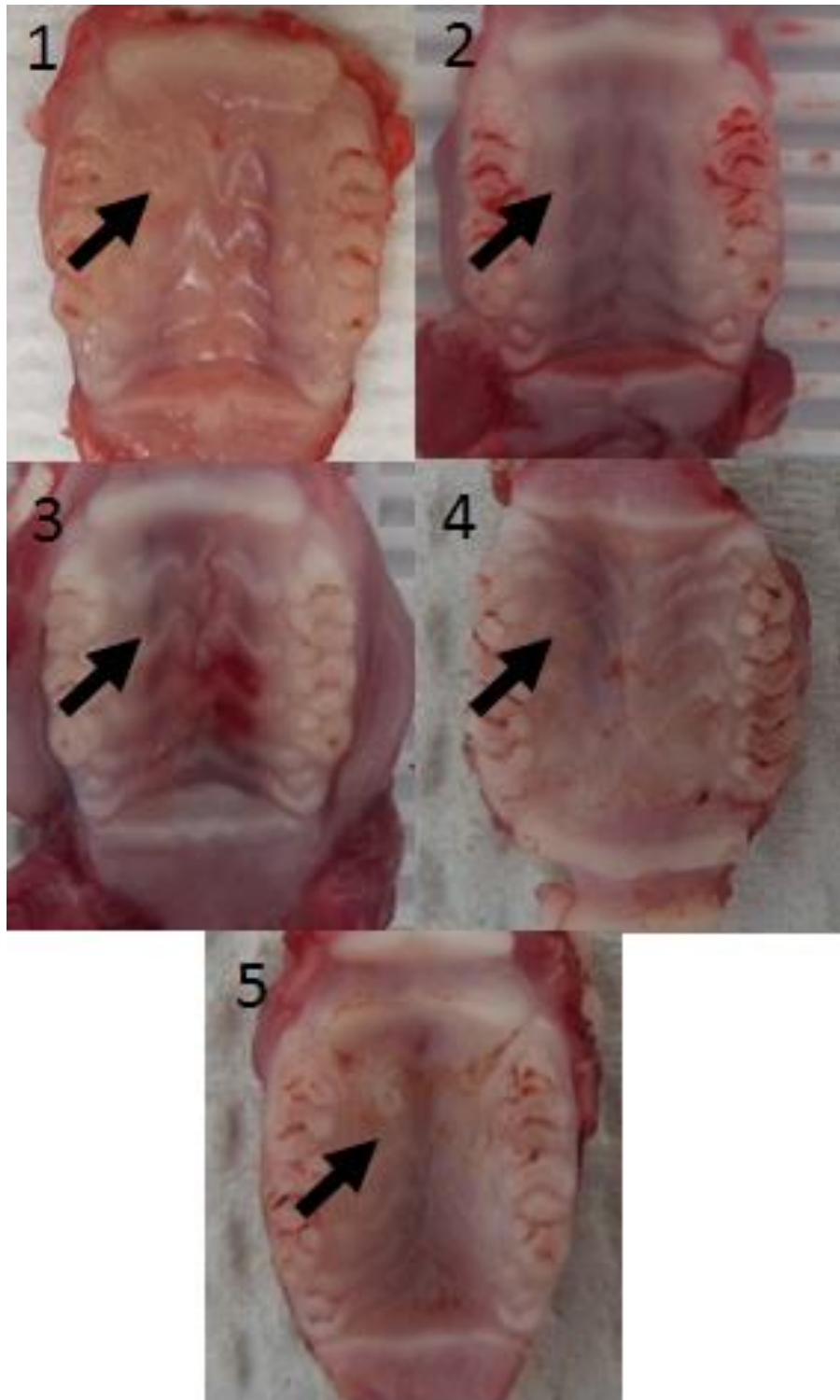


Figura 17.- Imagen comparativa de los especímenes más representativos de cada grupo de estudio.1.- grupo control, 2 grupo SHAM, 3 grupo AAS, 4 grupo O3, 5 Grupo O3+ASS.



## RESULTADOS HISTOLÓGICOS. Resultados del grupo control:

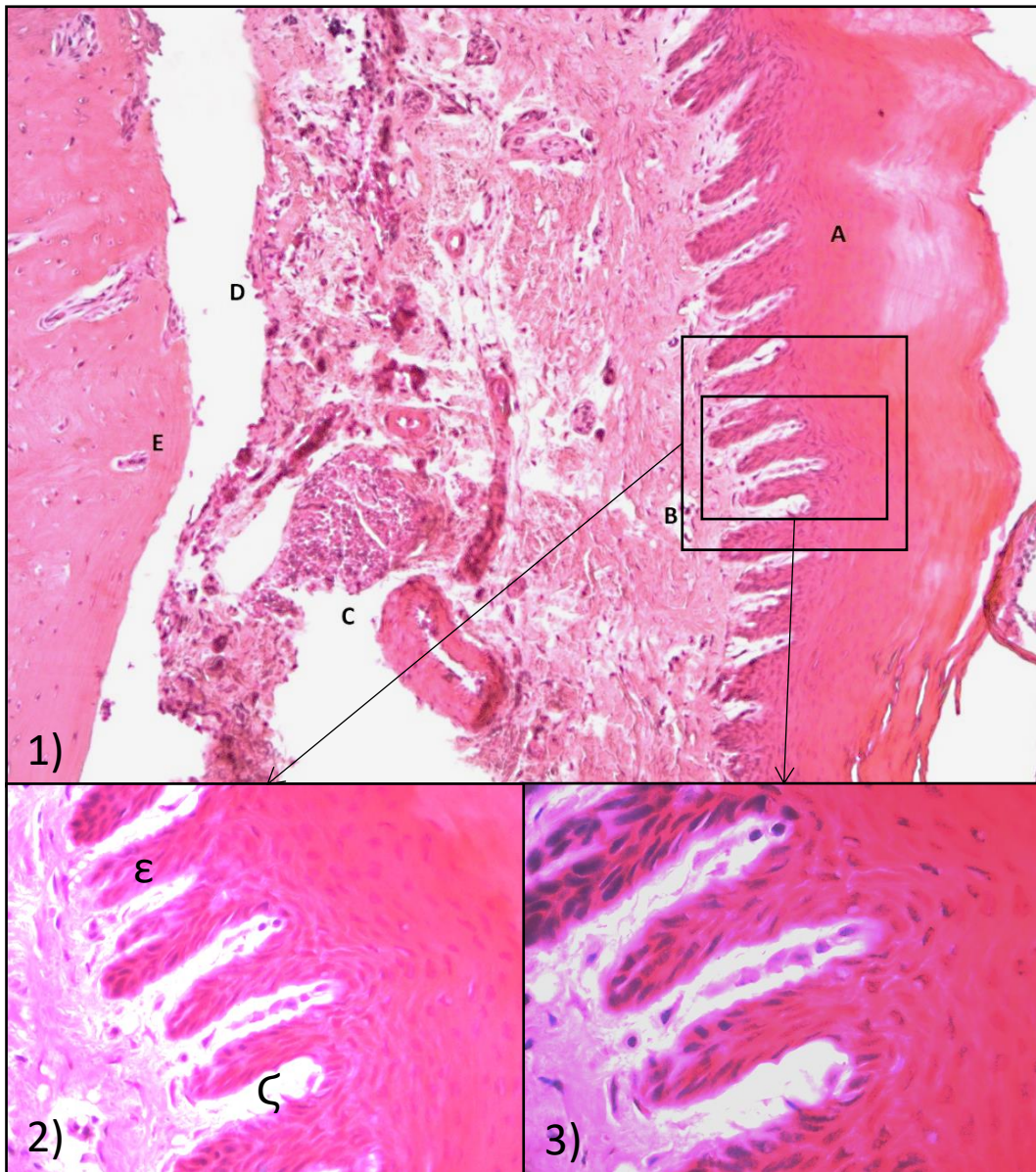


Figura 18: Fotografías representativas del grupo Control con tinción H&E; 1) Fotografía tomada a 10X, en donde se observa: mucosa masticatoria del maxilar, A) tejido epitelial, B) tejido conectivo, C) submucosa, D) Periostio, y E) hueso. 2) Fotografía a 40x en donde observamos: crestas epiteliales ( $\epsilon$ ), y papilas coriales ( $\zeta$ ); 3) Fotografía tomada a 63x donde se observan las células del estrato basal del epitelio.

En el grupo control, de manera general, observamos el hueso del maxilar, el periostio que esta en intimo contacto con el tejido conectivo y el tejido óseo, la submucosa, la lamina propia y el tejido epitelial (observe figura 18).

Se observo la mucosa masticatoria sin defecto, la queratina del estrato córneo del tejido epitelial integra, el estrato córneo se observó ligeramente ansanchado; en el tejido epitelial observamos las crestas epiteliales organizadas, sin una separación marcada. Observamos las papilas coriales del tejido conectivo, que también se encuentran integras y diferenciadas. La submucosa se observa vascularizada, bien conformada con las células propias de este tipo de tejido, que contienen matriz extracelular abundante. En el hueso no se observo tan claramente el periostio, pero se observon los osteocitos dentro del hueso de tipo cortical.

En este grupo observamos un promedio de 9 crestas en la extensión de 50  $\mu\text{m}$ , tomando en cuenta los valores obtenidos en la media de los resultados de ANOVA, obtenemos un valor de 16.83  $\mu\text{m}$  que multiplicado por el promedio de las crestas nos dio una extensión total aproximada del epitelio de 151.47  $\mu\text{m}$ .

Las crestas epiteliales, bien conformadas desde la capa basal hasta el estrato corneo, con una longitud lineal promedio de 16.83  $\pm$  6.977 micrómetros y un error estandar de 1.253 micrometros. Las papilas coriales cuando fueron medidas presentaron en promedio una longitud de 15.26  $\pm$  6.716 micrometros y un error estandar de 1.206 micrometros.



Resultados del grupo de solo defecto, o de cirugía placebo denominado como: "sham".

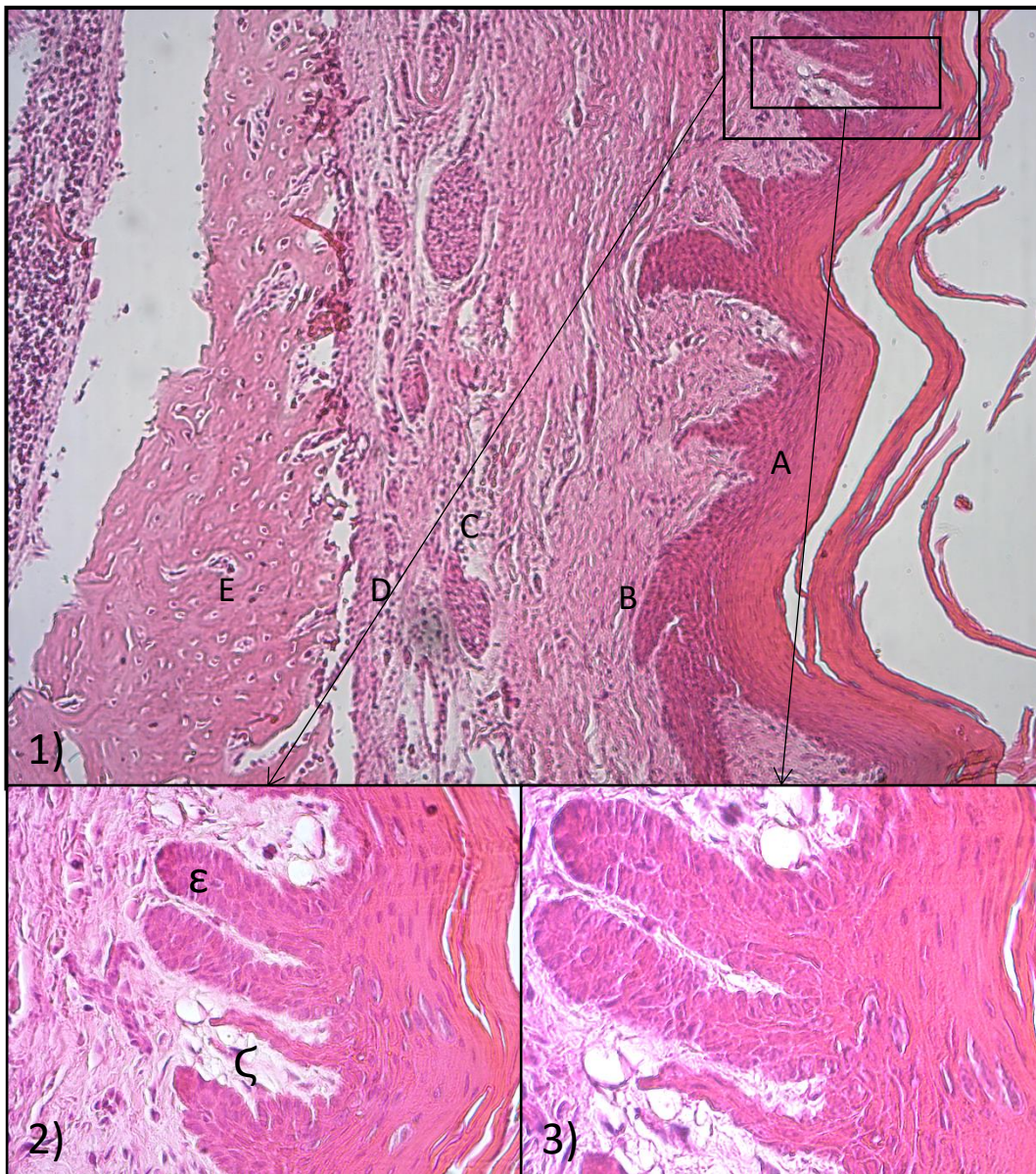


Figura 19: Fotografías representativas del grupo sham con una tinción H&E; 1) Fotografía tomada en microscopía óptica a 10x. Se observa: mucosa masticatoria del maxilar: A) tejido epitelial, B) tejido conectivo, C) submucosa, D) Periostio, E) hueso; 2) Fotografía a 40x donde observamos las crestas epiteliales ( $\epsilon$ ), y papilas coriales ( $\zeta$ ); 3) Fotografía a 63x donde se observan las células del estrato basal del epitelio.

En el grupo sham observamos las estructuras propias de la mucosa masticatoria palatina, como: los estratos del epitelio, las papilas coriales, las crestas epiteliales, el tejido conectivo, la lámina propia, la submucosa, el periostio y hueso, que sanaron y cerraron la lesión a los 21 días (obsérvese la figura 19).

Fue evidente la diferenciación, organización y estructura observada en las células del epitelio de la capa basal, la queratina en el estrato córneo se observó delgada, las crestas epiteliales se observaron organizadas, juntas y con una longitud corta, las papilas coriales se observaron delgadas, pequeñas, y la lámina propia delgada, en la submucosa apreciamos vascularidad adecuada, observando las estructuras propias de esta zona, como vasos sanguíneos y glándulas salivales.

En este grupo observamos un promedio de 7 crestas en la extensión de 50  $\mu\text{m}$ , tomando en cuenta los valores obtenidos en la media de los resultados de ANOVA, obtenemos un valor de 23.47 $\mu\text{m}$  que multiplicado por el promedio de crestas obtenemos una extensión total del epitelio en promedio de 164.29  $\mu\text{m}$ .

Realizando la medición de extensión lineal desde la capa basal del epitelio hasta la capa cornea de las crestas epiteliales se obtuvo en este grupo una longitud promedio de 23.47  $\pm$  6.862 micrómetros y un error estándar de 1.213 micrómetros. Las papilas coriales comienzan a extenderse hacia la submucosa con una extensión lineal, se midieron encontrando una longitud promedio de 18.92  $\pm$  5.556 micrómetros y un error estándar de 0.9979 micrómetros.



Resultados del grupo de Omega 3.

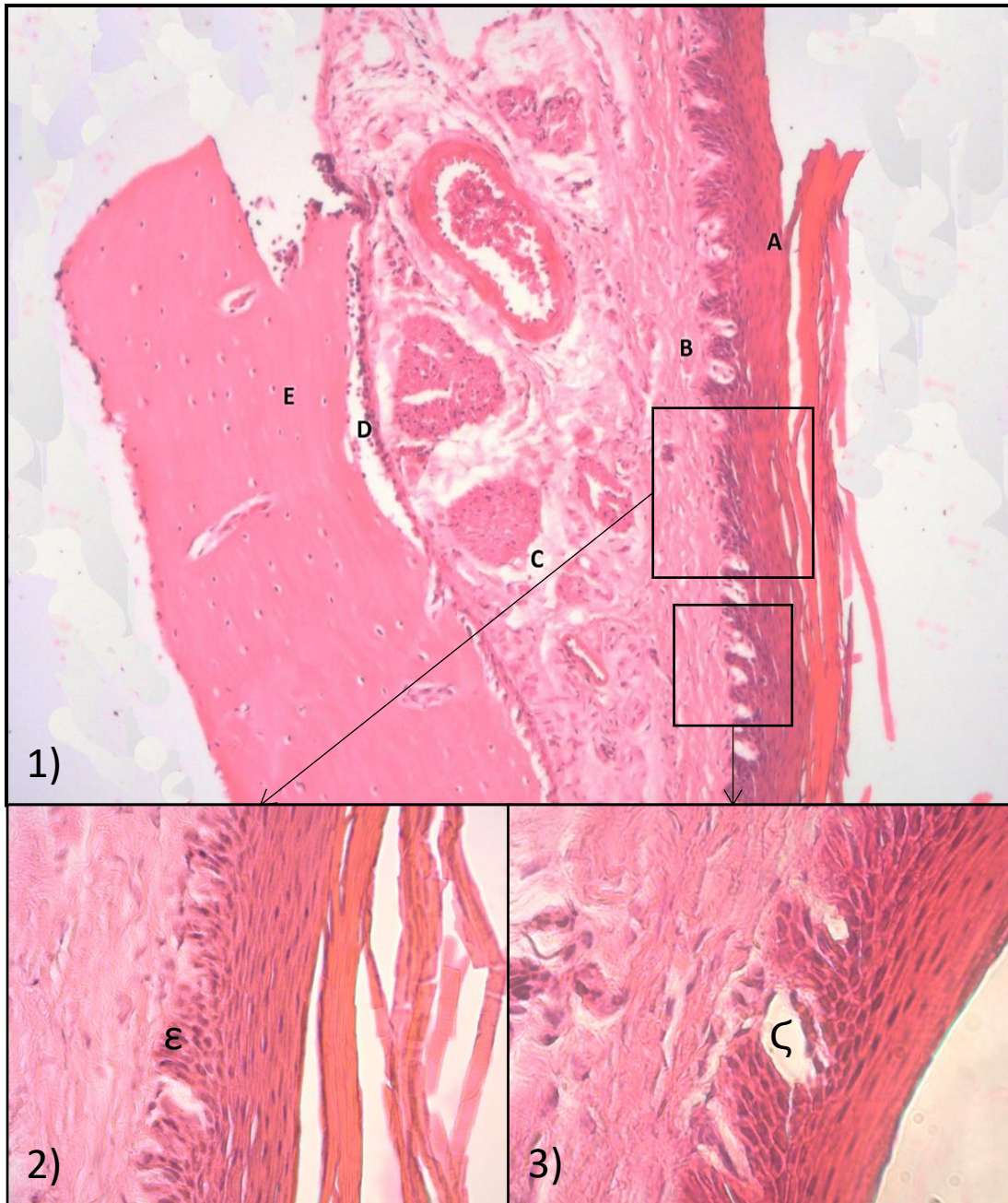


Figura 20: Fotografías representativas del grupo O3 tomada en microscopia óptica con una tinción H y E. 1) Fotografía tomada a 10X, se observa: mucosa masticatoria del maxilar, A) tejido epitelial, B) tejido conectivo, C) submucosa, D) Periostio, y E) hueso.;2) Fotografía a 40x donde observamos las crestas epiteliales (ε), y papilas coriales (ζ); 3) Fotografía a 63x donde se observan las células del estrato basal del epitelio.

En el grupo de Omega 3, pudimos apreciar las diferentes estructuras propias de la mucosa masticatoria palatina: los estratos del epitelio, las papilas coriales, las crestas epiteliales, el tejido conectivo, la lámina propia, la submucosa, el periostio y el hueso.

De manera general en el grupo O3 se observó el estrato corneo con una capa de queratina desprendible y delgada, las crestas epiteliales se observaron muy cortas hacia la lámina propia, estas crestas se observó que se encontraban en íntimo contacto y eran abundantes, las papilas coriales por igual, se observaron delgadas y cortas hacia el tejido epitelial. En la imagen representativa de este grupo (obsérvese la figura 20) se evidencia que las papilas y las crestas epiteliales son abundantes y están en diferenciación, la lámina propia es delgada con evidente contenido de fibras de COL en su interior, la submucosa se aprecia con abundante matriz extra celular, se observa una arteria con contenido abundante de eritrocitos, el periostio se encuentra bien delimitado y en contacto con la sub mucosa y el hueso.

En este grupo observamos un promedio de 12 crestas en la extensión de 50  $\mu\text{m}$ , tomando en cuenta los valores obtenidos en la media de los resultados de ANOVA, obtenemos un valor de 14.57 $\mu\text{m}$  que multiplicado por el promedio de crestas obtenemos una extensión total del epitelio en promedio de 174.84  $\mu\text{m}$ .

Las crestas epiteliales, cuando fue medida su longitud desde la capa basal hasta el estrato corneo, se observó que obtuvimos una longitud lineal promedio de 14.57  $\pm$  6.826 micrómetros y un error estandar de 1.107 micrometros. Las papilas coriales cuando fueron medidas presentaron en promedio una longitud de 12.26  $\pm$  6.841 micrometros y un error estandar de 1.156 micrometros.



Resultados del grupo de ASS.

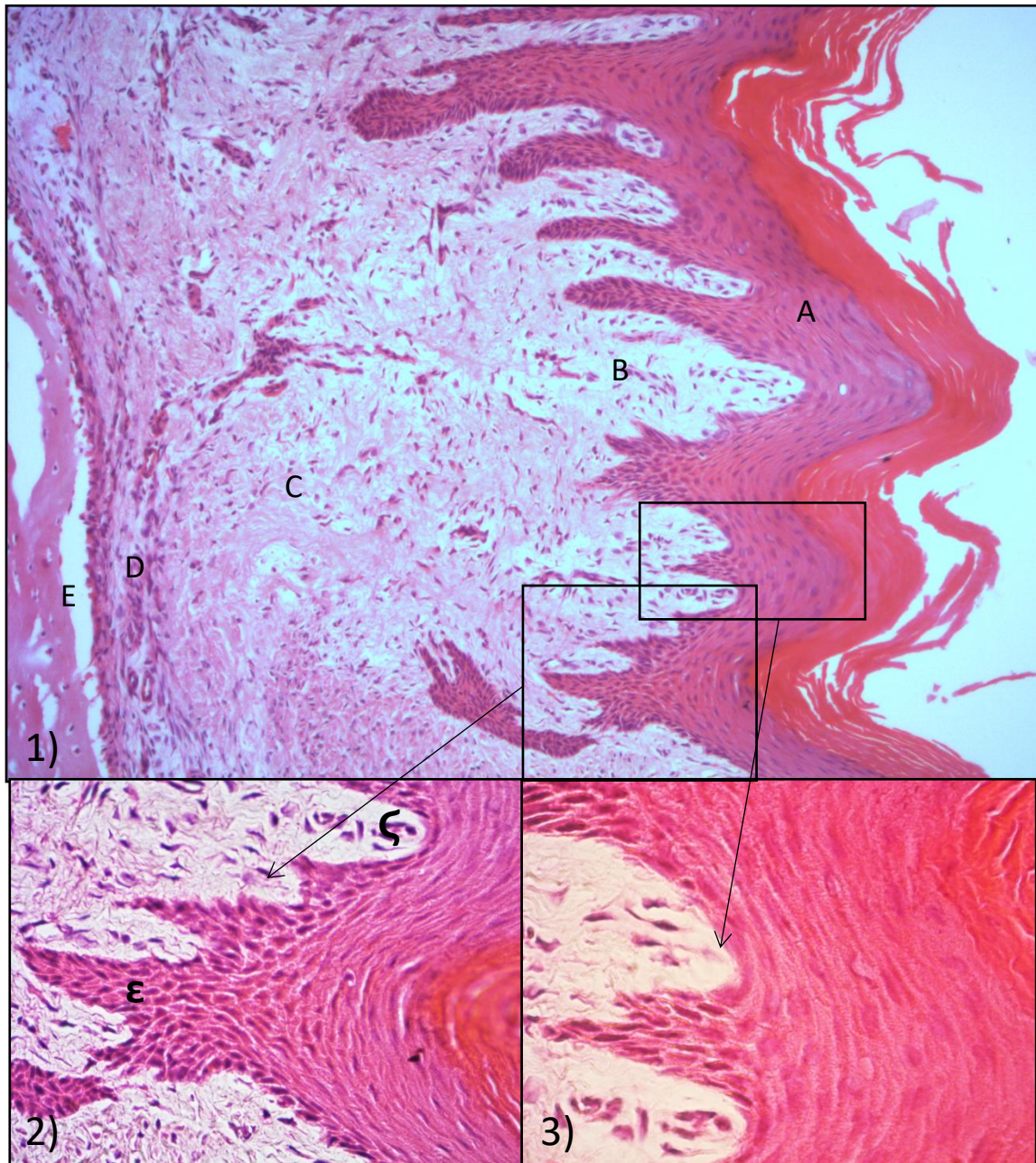


Figura 21: Fotografías representativas tomadas en microscopia óptica, tinción H&E del grupo ASS. 1) Fotografía tomada a 10x, donde se observa la mucosa masticatoria del maxilar: A) tejido epitelial, B) tejido conectivo, C) submucosa, D) periostio, y E) hueso. 2) Fotografía a 40x donde observamos crestas epiteliales ( $\epsilon$ ) y pailas coriales ( $\varrho$ ); 3) Fotografía a 63x donde se observan las células del estrato basal del epitelio.

En la figura 21 del grupo ASS se pueden apreciar las diferentes estructuras propias de la mucosa masticatoria palatina: estratos del epitelio, las papilas coriales, las crestas epiteliales, tejido conectivo, lámina propia del tejido epitelial, la membrana y la lámina basal, la submucosa, el periostio y el hueso.

Lo que podemos destacar del grupo ASS es que existe en el estrato corneo abundante queratina, las crestas epiteliales en general se observaron muy largas en comparación con los grupos anteriores, se encuentran organizadas, integras y entre ellas, se observaron las papilas coriales de diferente tamaño tanto en grosor como en longitud con abundantes fibras colágenas, la lámina propia es voluminosa y bien vascularizada; y se observó que se encontraba en íntimo contacto con la submucosa, en donde estaban alojados los vasos de pequeño calibre, el periostio se observó continuo y regular con continuidad íntima con el hueso subyacente. Las crestas epiteliales se observaron muy marcadas y diferenciadas en sus capas basales.

En este grupo observamos un promedio de 8 crestas en la extensión de 50  $\mu\text{m}$ , tomando en cuenta los valores obtenidos en la media de los resultados de ANOVA, obtenemos un valor de 41.77 $\mu\text{m}$  que multiplicado por el promedio de crestas obtenemos una extensión total del epitelio en promedio de 334.16  $\mu\text{m}$ .

Las crestas epiteliales, cuando fue medida su longitud desde la capa basal hasta el estrato corneo, se observó que obtuvimos una longitud lineal promedio de 41.77  $\pm$  20.82 micrómetros y un error estandar de 3.740 micrometros. Las papilas coriales cuando fueron medidas presentaron en promedio una longitud de 35.50  $\pm$  13.79 micrometros y un error estandar de 2.477 micrometros.



Resultados en la combinación de O3+ASS.



Figura 22: Fotografías representativas del grupo O3+ASS tomadas en microscopia óptica con una tinción de H&E. 1) Fotografía tomada a 10x, en donde se observa: mucosa masticatoria del maxilar: A) tejido epitelial, B) tejido conectivo, C) submucosa, D) Periostio, y E) hueso; 2) Fotografía a 40x donde observamos crestas epiteliales ( $\epsilon$ ) y pailas coriales ( $\zeta$ ); 3) Fotografía a 63x donde se observan las células del estrato basal del epitelio.

En el grupo de O3+ASS pudimos apreciar las diferentes estructuras propias de la mucosa masticatoria palatina, como los estratos del epitelio, las papilas coriales, los clavos epiteliales, el tejido conectivo, la lámina propia, la submucosa, el periostio y hueso, como se observa en la figura 22.

En esta combinación de dieta y medicación observamos el estrato córneo del epitelio con queratina desprendible y adelgazada en la zona de la lesión. El tejido epitelial se presentó regular y bien organizado pero con una anchura limitada, tendiendo a observarse angosto, la lámina basal se apreció evidentemente separada por la submucosa y el epitelio con abundantes fibras de COL pero con una anchura reducida, en la submucosa apreciamos estructuras propias de la zona como vasos sanguíneos y el periostio que se apreció continuo y en contacto íntimo con el hueso subyacente, las papilas coriales con la capa basal bien delimitada por los queratinocitos así como también crestas epiteliales con aposición de células en el estrato basal para la formación de nuevas crestas epiteliales.

En este grupo observamos un promedio de 11 crestas en la extensión de 50  $\mu\text{m}$ , tomando en cuenta los valores obtenidos en la media de los resultados de ANOVA, obtenemos un valor de 9.739 $\mu\text{m}$  que multiplicado por el promedio de crestas obtenemos una extensión total del epitelio en promedio de 107.129  $\mu\text{m}$ .

Las crestas epiteliales, cuando fue medida su longitud desde la capa basal hasta el estrato córneo, se observó que obtuvimos una longitud lineal promedio de 9.739  $\pm$  2.504 micrómetros y un error estándar de 0.3653 micrometros. Las papilas coriales cuando fueron medidas presentaron en promedio una longitud de 12.17  $\pm$  3.282 micrometros y un error estándar de 0.500 micrometros.

## COMPARACIÓN DE LAS MEDIDAS DE LAS CRESTAS EPITELIALES.

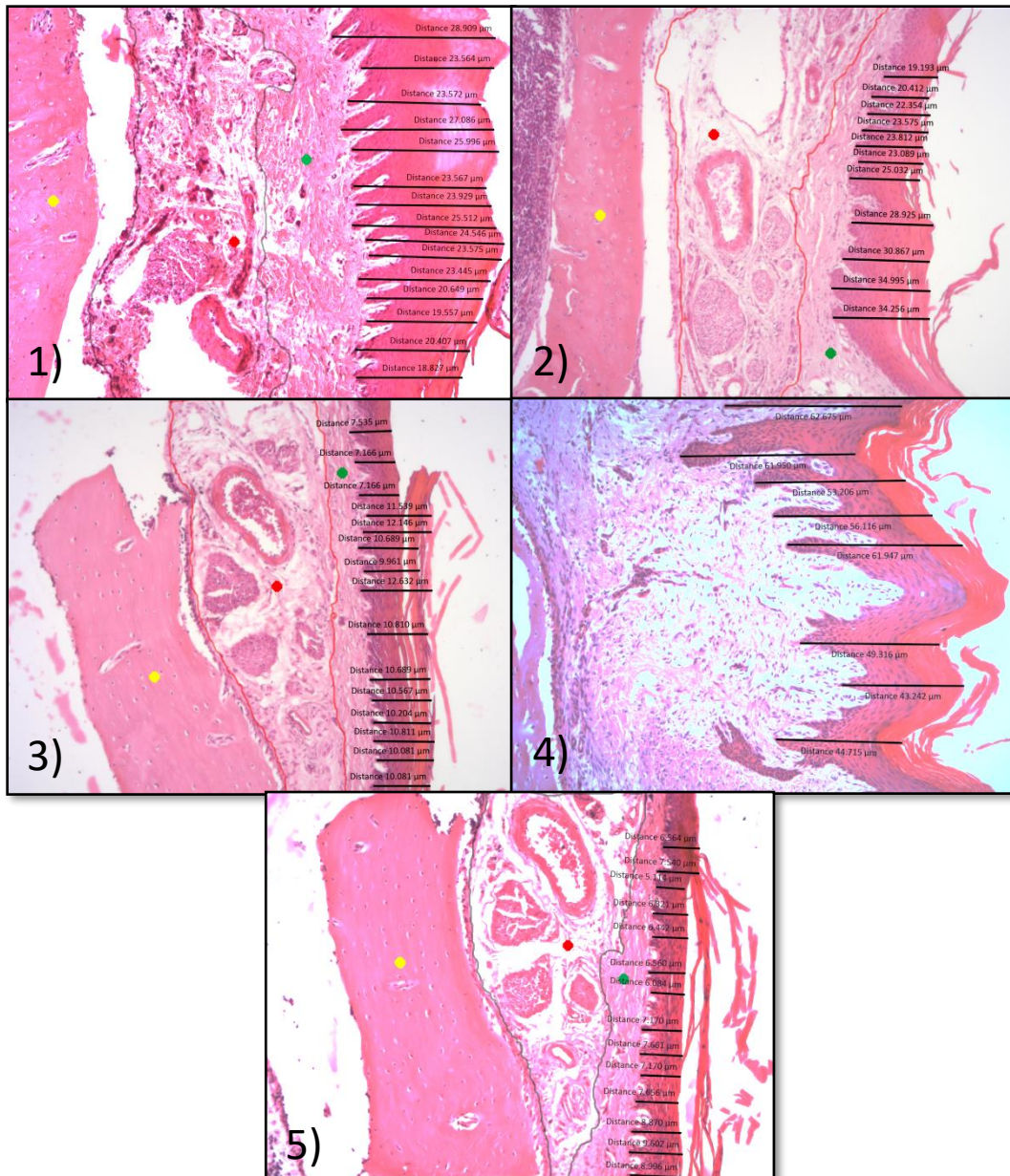


Figura 22: Fotografías representativas de todos los grupos de estudio donde se realizaron las mediciones de las crestas epiteliales, tomadas en microscopia óptica a 10x con una tinción de H y E. 1) Fotografía correspondiente al grupo control. 2) Fotografía correspondiente al grupo sham 3) Fotografía correspondiente al grupo O3. 4) fotografía correspondiente al grupo ASS. 5 fotografía correspondiente al grupo O3 más ASS.



## COMPARACIÓN DE MEDICIÓN DE LAS PAPILAS CORIALES.

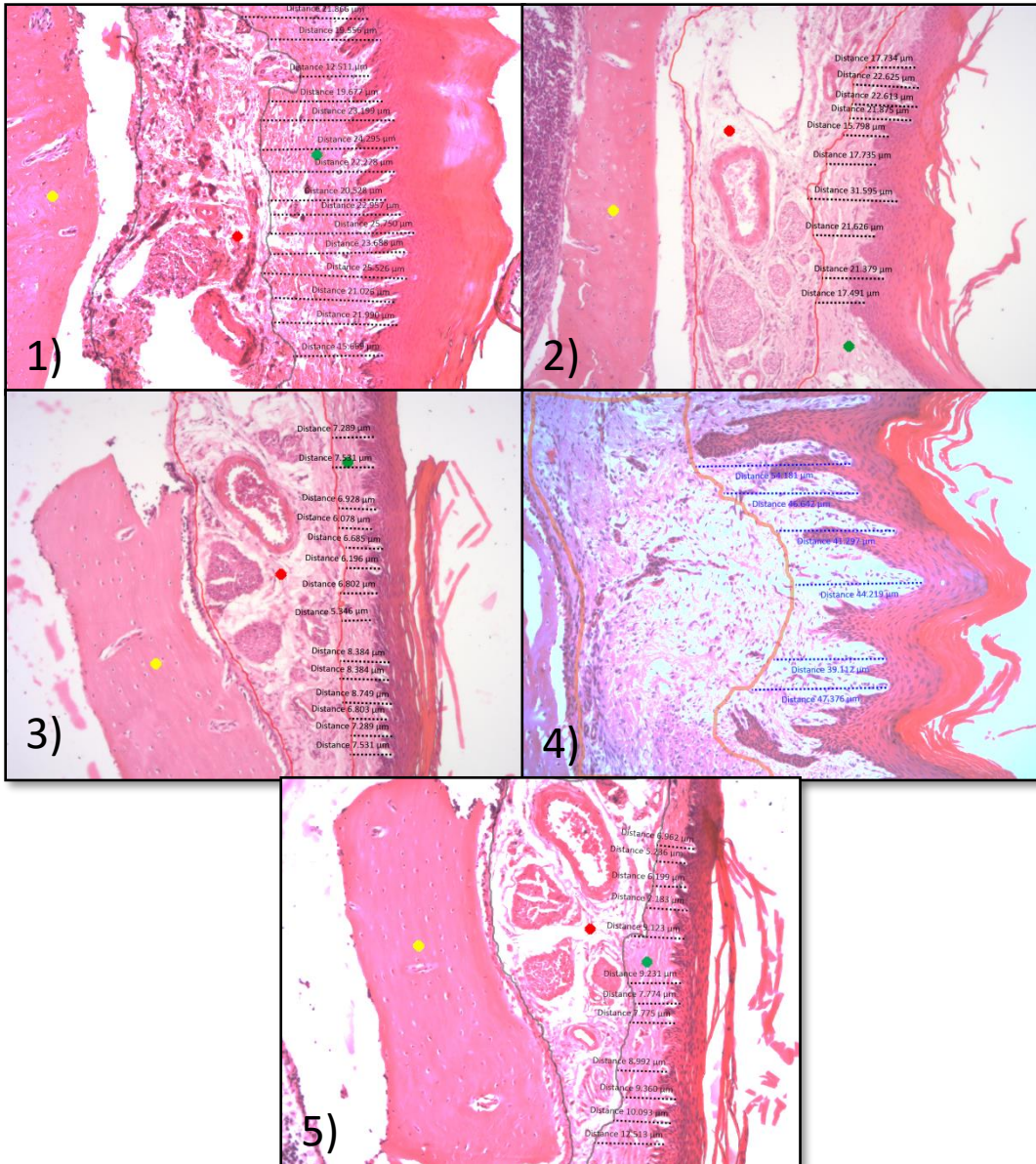


Figura 23: Fotografías representativas de todos los grupos de estudio donde se realizaron las mediciones de las papilas coriales, tomadas en microscopía óptica a 10x con una tinción de H&E. 1) Fotografía correspondiente al grupo control. 2) Fotografía correspondiente al grupo sham 3) Fotografía correspondiente al grupo O3. 4) fotografía correspondiente al grupo ASS. 5) fotografía correspondiente al grupo O3 más ASS.

## ANÁLISIS HISTOMORFOMÉTRICO.

Realizamos el conteo del número de crestas epiteliales que observábamos en el área de la lesión de cada uno de los especímenes de todos los grupos, para obtener una longitud promedio en  $50\mu\text{m}$ . esto lo realizamos multiplicando el promedio de las crestas epiteliales con la longitud media de cada grupo. Así obteniendo la longitud promedio del epitelio en  $50\mu\text{m}$ .

Los resultados son evidentes como se muestra en la tabla 2 y en la figura 24, ya que el grupo con mayor número de crestas epiteliales fue el grupo de O3 a diferencia del grupo de ASS que fueron 8; aunque tenemos más cresta en el grupo O3 la longitud promedio del epitelio en  $50\mu\text{m}$  de este grupo fue menor a comparación del grupo de ASS.

Crestas Epiteliales.					
Grupo	Control.	sham	ASS	O3	O3+ASS
Promedio de Crestas Epiteliales.	9	7	8	12	11
Media de la longitud en $\mu\text{m}$	16.83	23.47	41.77	14.57	9.739
Longitud promedio del epitelio en $50\mu\text{m}$	151.47	164.29	334.16	174.84	107.129

Tabla 2: Obtención del promedio de las crestas epiteliales, la media de la longitud en  $\mu\text{m}$  y la obtención de la longitud promedio del epitelio en una extensión de  $50\mu\text{m}$ .

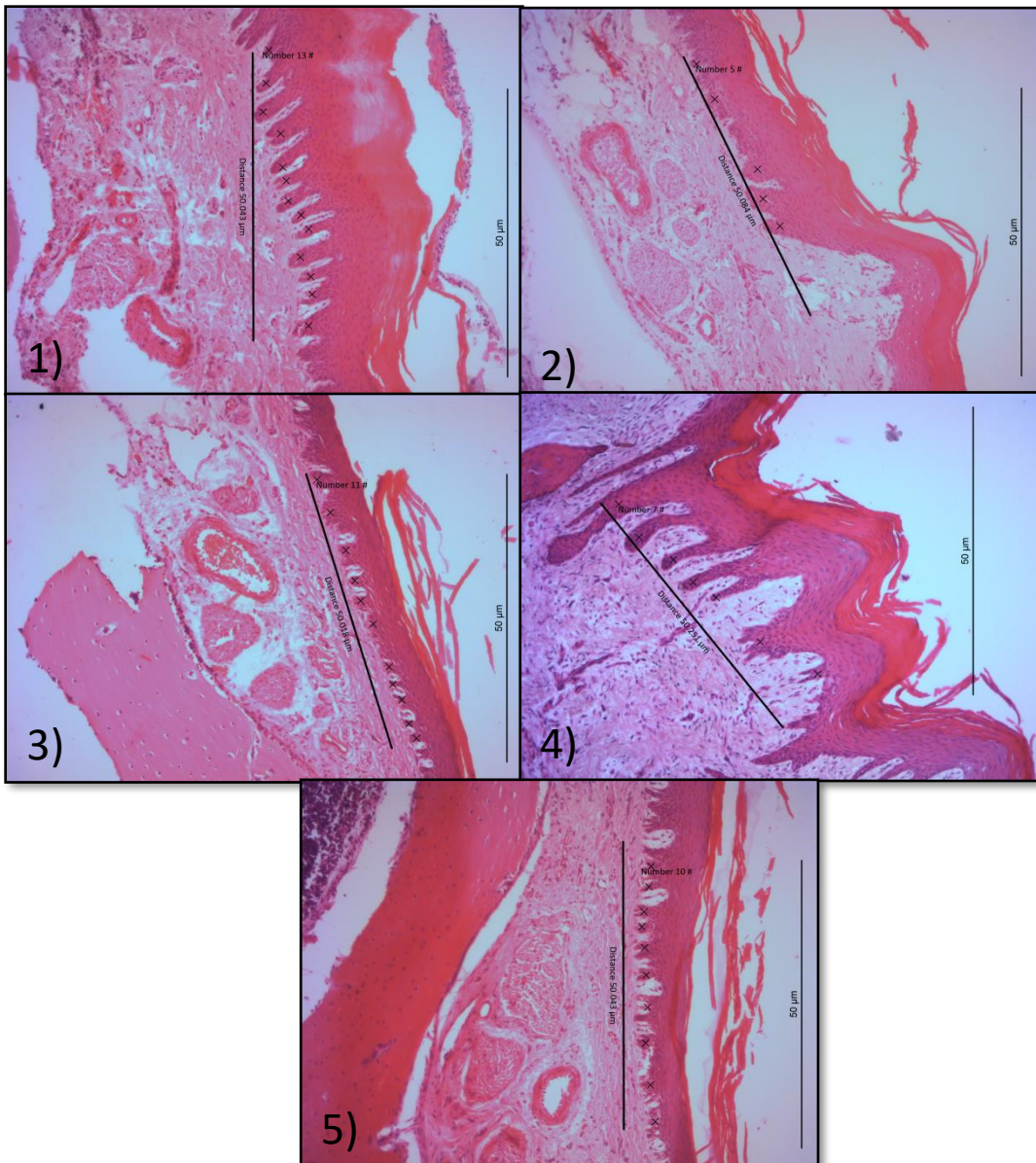


Figura 24: Fotografías representativas de todos los grupos de estudio donde se realizó el conteo de las crestas epiteliales en una extensión lineal en 50µm, tomadas en microscopia óptica a 10x con una tinción de H & E. 1) Fotografía correspondiente al grupo control. 2) Fotografía correspondiente al grupo sham 3) Fotografía correspondiente al grupo O3. 4) fotografía correspondiente al grupo ASS. 5 fotografía correspondiente al grupo O3 más ASS.

Resultados para Crestas epiteliales realizando test de ANOVA de una sola vía con un test pos hoc de BONFERRONI.

Los resultados de la ANOVA indican que sí hay deferencias entre los grupos de estudio y en el post test que comparo todos los grupos se observó que hay diferencias: el grupo ASS con todos los grupos \*\*\* y hay diferencia entre el grupo Sham con O3\*\* el Grupo control vs ASS+O3 \* Donde:  $p < 0.05^*$   $p < 0.001^*$   $p < 0.0001^{***}$

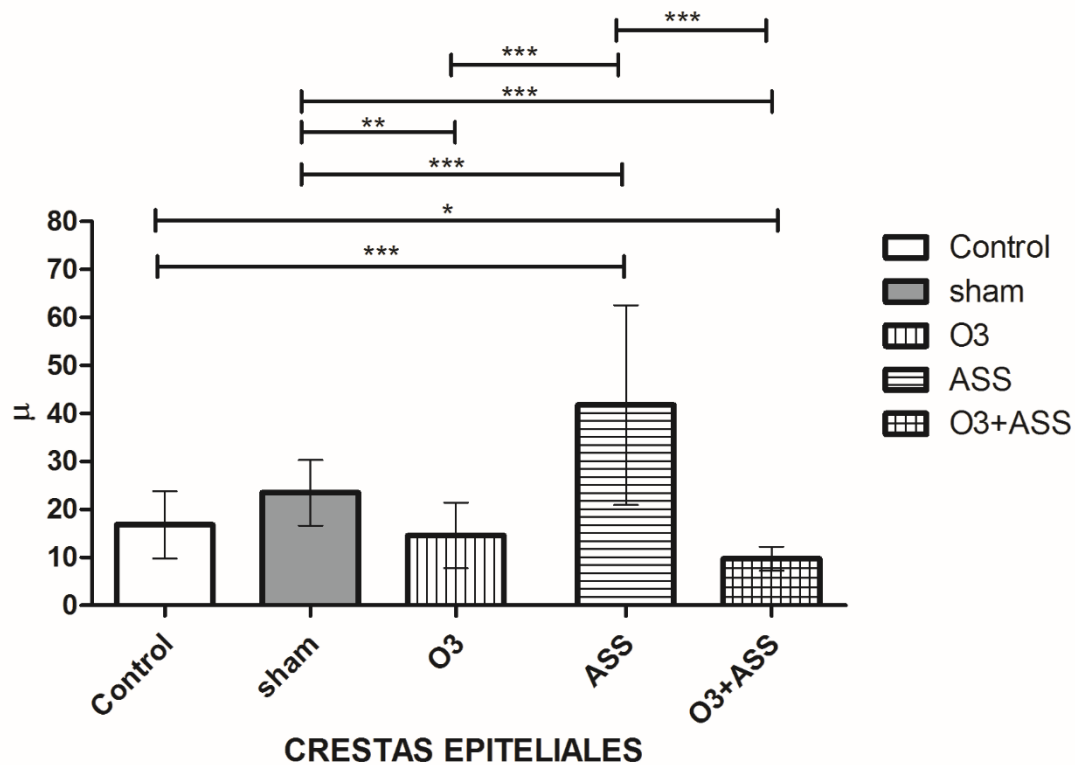
1way ANOVA Column statistics	A	B	C	D	E
	Control	sham	ASS	O3	O3+ASS
	Y	Y	Y	Y	Y
Number of values	31	32	31	38	47
Minimum	7.146	10.81	13.32	7.166	5.114
25% Percentile	10.57	18.71	31.20	9.718	8.506
Median	14.09	23.33	36.97	11.18	9.360
75% Percentile	23.57	29.48	57.29	20.26	10.46
Maximum	28.91	35.00	96.58	33.73	16.28
Mean	16.83	23.47	41.77	14.57	9.739
Std. Deviation	6.977	6.862	20.82	6.826	2.504
Std. Error	1.253	1.213	3.740	1.107	0.3653
Lower 95% CI	14.27	21.00	34.13	12.33	9.003
Upper 95% CI	19.39	25.94	49.41	16.82	10.47

Tabla 3: Resultados de test de ANOVA, donde se obtienen valores estadísticamente diferentes de cada uno de los grupos con respecto a las crestas epiteliales.



Bartlett's test for equal variances					
Bartlett's statistic (corrected)	160.0				
P value	< 0.0001				
P value summary	***				
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes				
ANOVA Table					
	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	21450	4	5364		
Residual (within columns)	17940	174	103.1		
Total	39390	178			
Bonferroni's Multiple Comparison Test					
	Mean Diff.	t	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Control vs sham	-6.639	2.594	No	ns	-13.91 to 0.6367
Control vs ASS	-24.94	9.669	Yes	***	-32.27 to -17.60
Control vs O3	2.257	0.9185	No	ns	-4.730 to 9.244
Control vs O3+ASS	7.093	3.019	Yes	*	0.4129 to 13.77
sham vs ASS	-18.30	7.151	Yes	***	-25.57 to -11.02
sham vs O3	8.896	3.652	Yes	**	1.969 to 15.82
sham vs O3+ASS	13.73	5.901	Yes	***	7.115 to 20.35
ASS vs O3	27.19	11.07	Yes	***	20.21 to 34.18
ASS vs O3+ASS	32.03	13.63	Yes	***	25.35 to 38.71
O3 vs O3+ASS	4.836	2.183	No	ns	-1.463 to 11.13

Tabla 4: Valores comparativos de los grupos con respecto a las crestas epiteliales donde: p<0.05\* p<0.001\* p<0.0001\*\*\*



Grafica 1: Representación gráfica con respecto a los valores obtenidos de cada grupo de estudio.



PAPILAS CORIALES:

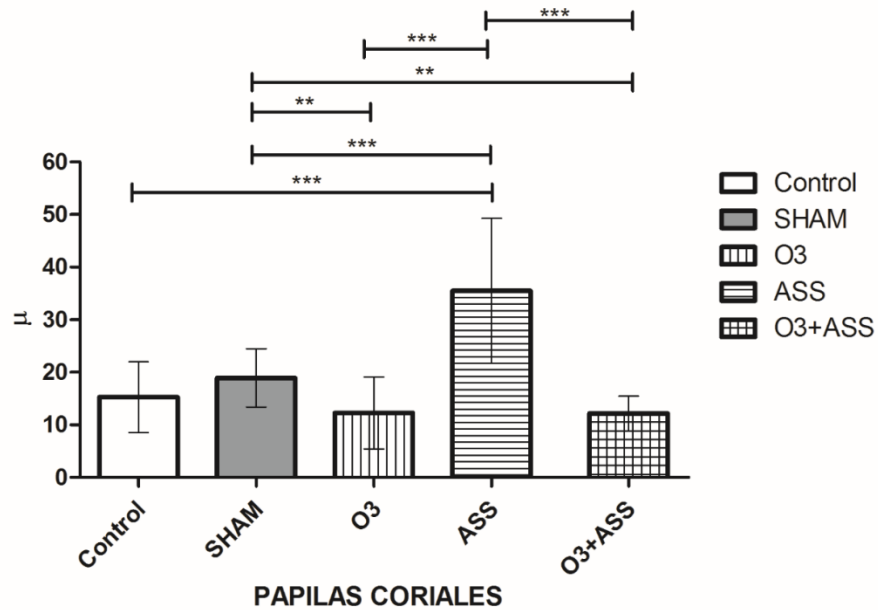
Resultados para Papilas Coriales realizando test de ANOVA de una sola vía con un test pos hoc de BONFERRONI. Los resultados de la ANOVA indican que sí hay diferencias entre los grupos de estudio y en el post test se comparó todos los grupos, observando diferencias: el grupo ASS con todos los grupos \*\*\* y hay diferencia entre el grupo sham vs O3 \*\* el sham vs ASS+O3\*\* Dónde:  $p < 0.05^*$   $p < 0.001^{**}$   $p < 0.0001^{***}$

1way ANOVA Column statistics	A	B	C	D	E
	Control	SHAM	ASS	O3	O3+ASS
	Y	Y	Y	Y	Y
Number of values	31	31	31	35	43
Minimum	5.830	10.76	14.08	5.346	5.236
25% Percentile	10.20	14.20	24.87	7.289	9.360
Median	12.64	18.03	32.28	8.992	12.39
75% Percentile	21.99	22.61	47.50	15.18	14.58
Maximum	25.75	31.60	62.84	33.21	17.98
Mean	15.26	18.92	35.50	12.26	12.17
Std. Deviation	6.716	5.556	13.79	6.841	3.282
Std. Error	1.206	0.9979	2.477	1.156	0.5005
Lower 95% CI	12.80	16.88	30.44	9.913	11.16
Upper 95% CI	17.72	20.96	40.55	14.61	13.18

Tabla 5: Resultados de test de ANOVA, donde se obtienen valores estadísticamente diferentes de cada uno de los grupos con respecto a las papilas coriales.

Bartlett's test for equal variances					
Bartlett's statistic (corrected)	74.69				
P value	< 0.0001				
P value summary	***				
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes				
ANOVA Table					
	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	12360	4	3089		
Residual (within columns)	10030	166	60.42		
Total	22380	170			
Bonferroni's Multiple Comparison Test					
	Mean Diff.	t	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Control vs SHAM	-3.664	1.856	No	ns	-9.281 to 1.953
Control vs ASS	-20.24	10.25	Yes	***	-25.85 to -14.62
Control vs O3	2.996	1.563	No	ns	-2.458 to 8.450
Control vs O3+ASS	3.089	1.687	No	ns	-2.122 to 8.299
SHAM vs ASS	-16.57	8.395	Yes	***	-22.19 to -10.96
SHAM vs O3	6.660	3.474	Yes	**	1.206 to 12.11
SHAM vs O3+ASS	6.753	3.687	Yes	**	1.542 to 11.96
ASS vs O3	23.23	12.12	Yes	***	17.78 to 28.69
ASS vs O3+ASS	23.33	12.74	Yes	***	18.12 to 28.54
O3 vs O3+ASS	0.09280	0.05245	No	ns	-4.942 to 5.127

Tabla 6: Valores comparativos de los grupos con respecto a las papilas coriales donde: p<0.05\* p<0.001\* p<0.0001\*\*\*



Grafica 2: Representación gráfica con respecto a los valores obtenidos de las papilas coriales de cada grupo de estudio.

## Resultados Análisis de la extensión lineal del epitelio.

Como se aprecia en la figura 25, en la que se observan las fotografías representativas para cada uno de los grupos de estudio.

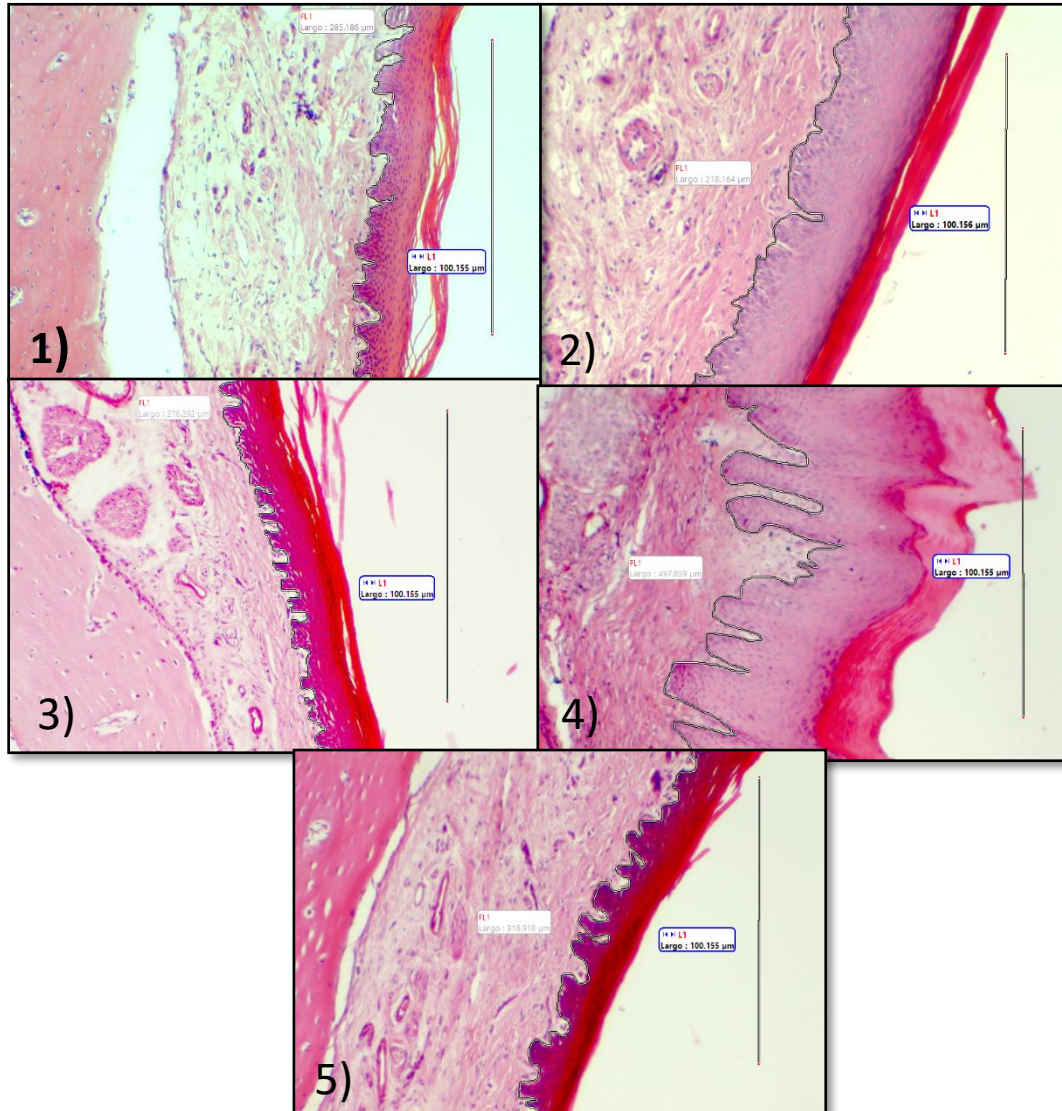


Figura 25: Fotografías representativas de todos los grupos de estudio donde se realizó la medición de la extensión lineal de la capa basal del epitelio, teniendo como referencia 100.155  $\mu\text{m}$ , tomadas en microscopía óptica a 10x con una tinción de H& E. 1) Fotografía correspondiente al grupo control con longitud de 285.186  $\mu\text{m}$ . 2) Fotografía correspondiente al grupo sham con longitud de 218.164  $\mu\text{m}$  3) Fotografía correspondiente al grupo O3 con longitud de 276.292  $\mu\text{m}$ . 4) fotografía correspondiente al grupo ASS con longitud de 497.859  $\mu\text{m}$ . 5) fotografía correspondiente al grupo O3 más ASS con longitud de 316.918  $\mu\text{m}$ .

Las fotografías fueron tomadas en microscopia óptica a 10x con una tinción de H&E. En el grupo control observamos un promedio de longitud de 3088.211  $\mu\text{m}$ , en el sham encontramos una longitud promedio de 226.507  $\mu\text{m}$ . En el grupo O3 observamos una longitud promedio de 359.125  $\mu\text{m}$ . En el grupo ASS observamos una longitud promedio de 608.928  $\mu\text{m}$ , y por último, la longitud promedio encontrada en el grupo O3+ASS fue de 298.798  $\mu\text{m}$ . Siendo como en las mediciones histológicas anteriores mayor la longitud del epitelio en el grupo ASS.

## DISCUSIÓN.

El modelo mínimamente invasivo que se utilizó en este trabajo de tesis, que fue propuesto por primera vez por Morales y cols en el 2015 (Morales, 2015), nos resultó útil, ya que se comprobó que los animales podían respirar, deglutir y alimentarse sin problema alguno. También, este modelo fue suficiente para provocar una herida que cicatrizó por segunda intención, como ocurre en alveolos dentales después de una exodoncia o bien, en la resolución de lesiones mucosas reactivas como aftas, automodaduras, etc. que son heridas que al cicatrizar carecen de continuidad del tejido.

Keswani SG y cols (Keswani, 2013) emplearon un modelo similar en el que, como nosotros, realizaron una herida en la mucosa palatina a la altura del primer molar con el objetivo de asegurarse de que sólo los tejidos epiteliales y submucosas fueran extirpados; sin embargo, ellos no tocaron al periostio subyacente ni las arterias palatinas, en nuestro modelo al realizar la herida ligeramente cargada hacia el hemi-paladar derecho eliminamos la arteria palatina; por lo que es importante observar que esta se regenero en todos los especímenes, además de que en los cortes histológicos obtenidos en nuestro estudio algunas arterias se apreciaban engrosadas en el endotelio, probablemente porque la regeneración que tuvo el mismo.

A pesar de que se ha descrito que la mucosa bucal cicatriza más aceleradamente que la piel (Keswani, 2013), entre nuestros principales hallazgos observamos que aún después de 21 días hay diferencias entre los grupos, que nos permitieron establecer que la terapia previa con ASS a dosis bajas contribuye a mejorar la regeneración tisular en nuestro modelo de herida.

El efecto de los AGPI sobre la mucosa bucal no se ha estudiado directamente; menos aún el efecto de la “terapia de modulación de respuesta del huésped (omega-3 más una dosis baja de aspirina)”. En nuestra búsqueda bibliográfica no encontramos estudios con los que podamos comparar directamente nuestro trabajo, pues el modelo es nuevo o no ha sido usado y la mayoría de los reportes sobre esta combinación de terapia son realizados en humanos y de manera observacional y descriptiva.

En cuanto al O3, en muchos de los artículos revisados se han descrito sus efectos beneficiosos en procesos inflamatorios tales como: artritis reumatoide (Catalan, 2015), la enfermedad de Crohn (Velásquez Berrio, 2013), el asma (Harper, 2006), la psoriasis (Pérez A. A., 2012), nefropatías (Barceló-Coblijn G. C., 2005), osteoporosis (Longo, 2016); sin embargo, no hay modelos en mucosa oral, al

respecto hay estudios en enfermedad periodontal (Melo, 2014), (Vardar S, 2004), sin embargo, no aportan datos histológicos.

En sus resultados Vardar-Sengul S y cols (Vardar, 2004) mencionan que la terapia de O3 durante 15 días antes y 15 días después en pacientes con periodontitis no fue eficaz para en la prevención de la pérdida ósea alveolar, pero si redujo significativamente los niveles PGE2, PGF2alpha, LTB4, y PAF, por lo que consideran que dar O3 como profiláctico puede tener beneficios adicionales en los tejidos gingivales; esto podemos explicarlo porque PGE2, PGF2alpha, LTB4, y PAF son consideradas citoquinas pro-inflamatorias producto de los eicosanoides y con el O3 el resultado esperado es una reducción de estas y un aumento en LPX, resolvinas y protectinas. Otros autores (Campan, 1997), (El-Sharkawy, 2010) han estudiado los efectos del O3 en periodontitis, pero en general ninguno ha aportado resultados histológicos, aun así proponen en general, que el Omega 3 puede resultar beneficioso para la salud periodontal. Todos estos estudios se realizaron en Periodontitis, que sabemos es una enfermedad inflamatoria crónica multifactorial, a diferencia de nuestro modelo donde la lesión que se realizó indujo a una inflamación aguda; tal vez sea este el motivo porque el que histológicamente no podamos ver los beneficios que puede aportar el O3.

La cicatrización de heridas es un proceso dinámico y complejo, que comprende de procesos como la inflamación y la superposición de la proliferación celular como células del tejido epitelial y células del tejido conectivo. Durante la inflamación existen moléculas pro-inflamatorias y antiinflamatorias como productos bioactivos lipídicos, principalmente derivados de la oxidación del ácido araquidónico (AA), que incluyen a las prostaglandinas (PG), tromboxanos (TX), leucotrienos (LT), pero también a las lipoxinas (LX) resolvinas y protectinas; es posible que en nuestro modelo de individuos sanos el mecanismo de reparación tisular por sí mismo, sea suficiente y por ello, estos efectos beneficiosos del O3 de los que se ha hablado, no hagan diferencia entre los grupos (Berry, 2016.)

De acuerdo con la literatura la ASS tiene diferentes propiedades terapéuticas, como son: analgesia, antiagregante plaquetario y antipirético; estos efectos son producidos de acuerdo a las dosis empleadas en cada afección. En una dosis baja la ASS inhibe a COX2 ; en el humano de 70 a 100 mg al día son capaces de inhibir la vía de la COX2 y en consecuencia propiciar la liberación de eicosanoides benéficos en la resolución de heridas (Lack, 2013). Por otro lado, Lichtenberger (Lichtenberger, 2017) recomendó como dosis baja el uso de aspirina de 75 a 325 mg al día en humanos, los beneficios que observo en los tejidos con esa dosis; fueron significativos; en nuestro modelo decidimos emplear la dosis traslacional de

10mg al día en base a los estudios previamente realizados por (Naqvi, 2014) esta dosis fue utilizada en ratas.

Los resultados de Lack y cols. en el 2013 (Lack, 2013) contrastan con los nuestros, ya que en su modelo de osteotomía ósea en conejos ellos observaron que la ASS provocó un retraso en la curación del hueso de una manera dosis-dependiente, este retraso fue observado por estos autores en los grupos en que el umbral de ASS fue superior a un equivalente de 325 mg al día en humanos; en conjunto con este estudio, nuestros resultados nos permiten determinar que las dosis de ASS por debajo de una dosis traslacional a 100mg en humanos permiten observar histológicamente una mejoría en la regeneración de los tejidos blandos.

Así, de la combinación de O3+ASS, el primer antecedente que encontramos sobre el uso de esta terapia “moduladora de la respuesta del huésped” fue de Vardar-Sengul y cols en el 2004 (Vardar, 2004) quienes la probaron en un modelo de periodontitis experimental en el que concluyeron que marcadores como MMP8 fueron inhibidos en los grupos con esta terapia, en base al trabajo que presentaron estos autores, creemos que podría ser viable evaluar este marcador en nuestras muestras a fin de comparar nuestros resultados ya que en nuestro caso, nuestros estudios histopatológicos no evidenciaron que nuestro grupo O3+ASS presentara una mejor respuesta tisular con respecto al grupo de solo ASS que parece ser el mejor.

El-Sharkawy y cols en 2010, en su estudio clínico en pacientes con periodontitis severa, observaron que los pacientes tratados con el Omega 3 + ASS a dosis bajas experimentaron una ganancia de inserción así como niveles salivales disminuidos de RANKL y de la MMP-8. Aunque este estudio es distante de nuestro modelo la regeneración de los tejidos blandos observados por estos autores se corresponde con los datos histológicos que nosotros obtuvimos en nuestro modelo, además de que inhibe significativamente mediadores con función de resorción ósea. Ellos concluyeron que esta terapia de Omega 3 en combinación con la AAS a dosis bajas, a la que denominaron: “Terapia moduladora del huésped”, puede ser una medida de prevención para modular de inflamación en poblaciones susceptibles; y sí bien en nuestro modelo, esta terapia parece tener un efecto modulador de la inflamación los hallazgos de su uso no demostraron histopatológicamente ser mejores que los que observamos al usar solo ASS.

Elkhouli y cols (Elkhouli, 2011) evaluaron la regeneración de los tejidos de la furca dental en pacientes con enfermedad periodontal a los que les administraron O3+ ASS en bajas dosis utilizando aloinjerto de hueso liofilizado (DFDBA), concluyeron que esta terapia contribuye a una mayor ganancia en el nivel de inserción gingival

y una mayor reducción de la profundidad de sondaje, así como una reducción de los marcadores inflamatorios: interleucina-1 $\beta$  e interleucina-10(IL-10), en comparación con nuestro estudio, el grupo de O3+ASS no mostro evidencias histológicas notorias en la regeneración de las células epiteliales, y los autores no evaluaron el efecto de las dosis bajas de ASS como terapia, por lo que es posible que sus alentadores resultados sean debidos más a los efectos de la ASS que a la terapia combinada con O3.

El mecanismo de auto-renovación de las células del epitelio está controlado por un equilibrio de mitosis de las células de la capa basal y la descamación de células de la capa más superficial. En nuestro estudio el grupo de AAS presento diferencias evidentes en la diferenciación y longitud de las crestas epiteliales y de las papilas coriales; lo que nos hace plantearnos que la ASS, de acuerdo con la literatura, pudo haber tenido el efecto de inhibir a la COX2, bloquear la producción de PGE y, según Chiurchiu y cols (Chiurchiù, 2016), modular la inmunidad adaptativa potenciando la respuesta inmune innata [macrófagos y las células asesinas naturales (NK)], así como producir mediadores especializados pro-resolutivos lipídicos como: el ácido docosahexaenoico (DHA), resolvina, maresinas, LPX y protectinas, así en suma, la actividad conjunta de todos estos procesos se reflejó en nuestros resultados histológicos.

De las mediciones histopatológicas que se realizaron se observó que las crestas epiteliales y las papilas coriales presentaron una longitud significativamente mayor en el grupo ASS en comparación con los demás grupos, así mismo, en la comprobación realizada para la extensión lineal del epitelio los resultados indicaron que el grupo ASS presento una mayor extensión del epitelio, en tanto que los grupo de O3 y O3+ASS se observaron muy parecidos al grupo control y sham. Aún con estas evidencias, decidimos medir el número de crestas en una longitud constante, que en la fotografías tomadas a 10x, fue de 50 $\mu$ m; esto lo realizamos con el objetivo de hacernos una idea de la longitud promedio que podría tener el tejido epitelial en el área de la mucosa que se regenero, en el lugar donde antes estuvo la lesión. Después de realizar estos cálculos, el grupo ASS mostró mayores evidencias histológicas de promover la regeneración de los tejidos epitelial y conectivo.

Este tipo de mediciones histopatológicas no han sido reportadas por otros autores, y creemos que esta descripción histológica puede importante como un precedente de la evidencia del uso de terapia moduladora de la respuesta del huésped, y que más tarde pude ser complementada con aportes realizados a través de técnicas moleculares en el área de la lesión.



## **CONCLUSIONES.**

La utilización de la terapia moduladora de la respuesta del huésped representa una alternativa de “terapéutica” con el objetivo de favorecer la cicatrización, reepitelización y remodelación de heridas en la mucosa bucal. En nuestro modelo la terapéutica mediante la medicación de ASS a dosis bajas demostró ser eficaz en la regeneración de la mucosa oral por segunda intención después de 21 días.

Es importante reconocer que la terapéutica empleada es una buena alternativa para mejorar lesiones de la mucosa oral y del periodonto, no compromete la salud del paciente, si no que al contrario beneficia la calidad de reparación y cicatrización, además de ser accesible y económica.

## PERSPECTIVAS.

El modelo empleado en el presente trabajo debe tener más tiempos de estudio, desde 3, 7, 14 y 21 días para observar clínica e histológicamente los cambios de acuerdo a los tiempos de cicatrización y reepitelización, además de realizar pruebas de ELISA, o de cromatografía de gases para evaluar la presencia o no de resolvinas; y alguna técnica como la inmunohistoquímica para detectar MMP8.

## BIBLIOGRAFÍA

- Barceló-Coblijn, G. &. (2009). Alpha-linolenic acid and its conversion to longer chain n- 3 fatty acids: Benefits for human health and a role in maintaining tissue n- 3 fatty acid levels. *Progress in lipid research*, 355 - 374.
- Barceló-Coblijn, G. C. (2005). Dietary  $\alpha$ -linolenic acid increases brain but not heart and liver docosahexaenoic acid levels. *lipids* , 787 - 798.
- Berry, E. Y. (2016.). Los eicosanoides: contribuyentes emergentes en mediada por células madre cicatrización de heridas. *Las prostaglandinas y otros mediadores de lipidos.*, 1 - 8.
- Campan, P. P. (1997). Pilot study on n-3 polyunsaturated fatty acids in the treatment of human experimental gingivitis. *Journal of clinical periodontology.*, 907 - 913.
- Catalan, S. J. (2015). Los acidos garsos dietarios y su relacion con la salud. *Nutricion Hospitalaria.*, 1362 - 1375.
- Caughey, G. E. (1996). The effect on human tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta production of diets enriched in n-3 fatty acids from vegetable oil or fish oil. *The American Journal of clinical nutrition.*, 116 - 122.
- Chiurchiù, V. L. (2016). Proresolving lipid mediators resolvin D1, resolvin D2,. *Inflamation*, 1 - 11.
- de Blas, L. P. (2016). *Estudio de los niveles de ácido docosahexaenoico (22: 6n-3) en macrófagos peritoneales de ratón.* valladolid : Instituto de biologia y genetica molecular.
- De la calle-Peña, M. d. (2008). *Efecto del tratamiento cronico con una ezcla de acidos grasos omega 3 6 y 9 sobre la reactividad vascular y el estres oxidativo en ratas.* Salamanca.: Universidad de Salamanca.
- Durán, A. A. (2014). THE INTAKE OF OMEGA-3 FATTY ACIDS IMPROVE COGNITIVE SKILLS OF HEALTHY CHILDREN. *División de Ciencias de la Salud*, 19 - 22.
- Elkhouli, A. M. (2011). The efficacy of host response modulation therapy (omega-3 plus low-dose aspirin) as an adjunctive treatment of chronic periodontitis (Clinical and biochemical study). *Journal of periodontal research.*, 261 - 268.

- El-Sharkawy, H. A. (2010). Adjunctive treatment of chronic periodontitis with daily dietary supplementation with omega-3 Fatty acids and low-dose aspirin. *Journal of Periodontology*, 1635 - 1643.
- Farias, m., & julieta, k. ( 2011). nuevas emulsiones lipidicas enriquecidas con omega 3 ¿beneficios reales en nutricion parenteral? *revista chilena*, 77-83.
- Felzani, R. (2005). Cicatrización de los tejidos con interés en cirugía bucal: revisión de la literatura. *acta odontologica venezolana.*, 310 - 318.
- Garzón, I. J. (2009). Estudio de marcadores de diferenciación epitelial en mucosa oral construida por ingeniería tisular. *Doctoral dissertation, Tesis doctoral*, 50 - 62.
- González, H. B. (2008). EL ACIDO ARAQUIDONICO Y LA RESPUESTA INFLAMATORIA. *International Research Fellow in Rheumatology*, 53 - 67.
- Gronert, K. (2010). Inflamacion.
- Gronert, K. (2010). Los acidos grasos Omega 3 y su relacion salud enfermedad. *Inflamacion.*, 1 - 4.
- Harper, C. R. (2006). Flaxseed oil increases the plasma concentrations of cardioprotective (n-3) fatty acids in humans. *the journal of nutrition*, 83 - 87.
- I. Fernandez, A. N. (2007). Estudio comparativo entre dos fuentes alimentarias aportadoras de acidos grasos poliinsaturads omega 3 y su efecto sobre el timo y el perfil lipidico de ratas. *Archivos latinoamericanos de nutricion* , 146 - 154.
- J. J. Carrero, E. M. (2005 ). Efectos cardiovasculares de los acidos grasos omega 3 y alternativas para incrementar su ingesta. *Nutricion Hospitalaria. Alimentos Funcionales.*, 63 - 69 .
- Keswani, S. B. (2013). Role of salivary vascular endothelial growth factor (VEGF) in palatal mucosal wound healing. *Wound Repair Regen.*, 554 - 562.
- Lack, W. D. (2013). Effect of aspirin on bone healing in a rabbit ulnar osteotomy model. *J Bone Joint Surg Am.*, 488 - 496.
- Lichtenberger, L. M.-C.-G. (2017). Bioavailability of Aspirin in Rats Comparing the Drug's Uptake into GI Tissue and Vascular and Lymphatic Systems: Implications on Aspirin's Chemopreventive Action. *Gastroenterology*, 152(5), S887.

- Longo, A. B. (2016). Providing Flaxseed Oil but Not Menhaden Oil Protects against OVX Induced Bone Loss in the Mandible of Sprague-Dawley Rats. *Nutrients*, 597.
- López-Espinoza, A. &. (2001). Efectos de dos programas de privación parcial sobre el peso corporal y el consumo total de agua y comida en ratas. *Acta Comportamental: Revista Latina de Análisis del Comportamiento.*, 1 - 9.
- Martinez, A. B. (2011). Efecto de la bebida gasificada en la pared gástrica de ratas macho con gastritis inducida por ácido acetilsalicílico. *Ciencia e investigacion Medico Estudiantil Latinoamericana.*, 21 - 25.
- Martinez, M. C. (2006). Mecanismos de activación de la coagulación. *Revista Medica del instituto Mexicano del Seguro Social.*, 51 - 58.
- Medina, A. (2012). Resolvina E1 promueve resolución de la inflamación en enfermedad periodontal. *avances en periodoncia e implantologia oral.*, 71 - 75.
- Melo, R. B. (2014). Antiperoxidative properties of oil mixes of high ratio Omega-9: Omega-6 and low ratio Omega-6: Omega-3 after molar extraction in rats. *Acta Cirurgica Brasileira.*, 371-375.
- Morales, M. A. (2015). *Osteonecrosis Maxilar Asociado al Uso de Bifosfonatos.* Mexico.: Universidad Nacional Autonoma de Mexico.
- Moreno-Gavilanes, J. P. (2010). *Evaluacion de los acidos grasos omega 3 y omega 6 presentes en alimentos enriquecidos que se expenden en los supermercados de riobamba.* Ecuador.: Escuela Superior Politecnica de chimborazo.
- Naqvi, A. Z. (2014). Docosahexaenoic acid and periodontitis in adults: a randomized controlled trial. *Journal of Dental Research.*, 767 - 773.
- Oliart-Ros, R. (2001). *Efecto de los acidos grasos poli - insaturados esenciales en la resistencia a la insulina asociada a la hiertension arterial.* . Mexico.: Universidad Nacional Autonoma de Mexico.
- Orozco, T. R. (2008). *Efecto de los acidos grasos Omega 3 y linoleico conjugado en dabetes mellitus tipo 2 en ratas wistar.* Mexico.: Universidad Nacional Autonoma de Mexico.

- Pérez, A. A. (2012). Condicionantes de las complicaciones crónicas y su tratamiento: obesidad, hipertensión arterial y dislipidemia. *Revista Venezolana de Endocrinología y Metabolismo.*, 84 - 95.
- Perez, H. (2011). *Efecto del aceite de linaza (ácido alfa linolénico) sobre la fluidez membranal en células de ratas espontáneamente hipertensas con diabetes.* Mexico.: Universidad Nacional Autónoma de México .
- Pérez, R. G. (2002). Antiinflamatorios inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa-2 (COX-2). *alergología e inmunología clínica.*, 247 - 256.
- Petasis, N. A.-Z. (2005). Design, synthesis and bioactions of novel stable mimetics of lipoxins and aspirin-triggered lipoxins. *Prostaglandins leukot essent fatty acid.* , 301 - 321.
- Rodríguez-Cruz, M. T. (2005). Mecanismos moleculares de acción de los ácidos grasos poliinsaturados y sus beneficios en la salud. *Revista de Investigación Clínica.*, 457 - 472.
- Rosenstein, E. D. (2003). Pilot study of dietary fatty acid supplementation in the treatment of adult periodontitis. *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids.*, 213 - 218.
- Schwab, U. S. (2006). Effects of hempseed and flaxseed oils on the profile of serum lipids, serum total and lipoprotein lipid concentrations and haemostatic factors. *European journal of nutrition.*, 470 - 477.
- Serhan C.N., C. N. (2014). Mediadores Lipídicos en la Resolución de la Inflamación. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* , 1-21.
- Serhan, C. H. (2002). Resolvins: a family of bioactive products of omega 3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. *Journal of experimental medicine.*, 1025 - 1037.
- Serhan, C. N. (2008). El control de la resolución de la inflamación aguda: un nuevo género de mediadores antiinflamatorios y proresolving duales. *Perioperative and Pain Medicine, Brigham and Women's Hospital.*, 1520 - 1526.
- Serhan, C., & Chiang, N. V. (2008). La resolución de la inflamación: mediadores antiinflamatorios y pro-resolución de lípidos duales. *Nat Rev Immunol.*, 349 - 361.
- Van Dyke, T. (2007). El control de la inflamación y la periodontitis. *Periodontology.*, 158 - 166.

- Vardar S, B. E. (2004). Terapéutica frente a la administración profiláctica más terapéutico del ácido graso omega-3 en periodontitis inducidas por endotoxinas en ratas. *J Periodontol.*, 75 (12): 1640-6.
- Vardar, S. B. (2004). Therapeutic versus prophylactic plus therapeutic administration of omega-3 fatty acid on endotoxin-induced periodontitis in rats. . *Journal of periodontology*, 1640-1646.
- Velásquez Berrio, M. G.-V. (2013). Lipoxinas inducidas por la aspirina: una alternativa para modular los procesos proinflamatorios en la preeclampsia. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología.*, 292 - 305.
- Welsch, U. &. (2008). *Histología*. Ed. Médica Panamericana.
- Wilkinson, P. L.-S. (2005). Influence of  $\alpha$ -linolenic acid and fish-oil on markers of cardiovascular risk in subjects with an atherogenic lipoprotein phenotype. *Atherosclerosis*, 115 - 124.
- Zavala, A. G. (2009). Cicatrización de las heridas. *Dermatología Venezolana.*, 3 - 4