

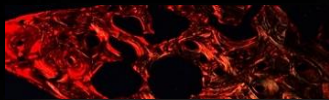
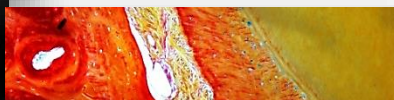
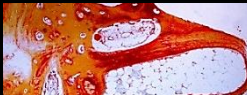
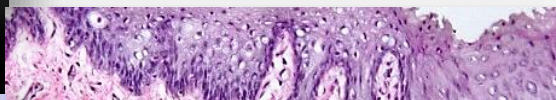
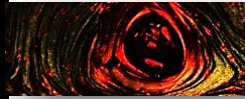
**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**



**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**DEPARTAMENTO DE ESPECIALIDADES CLÍNICAS ODONTOLÓGICAS**

**ESTUDIO DE PROTOCOLOS EFICIENTES EN  
PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA ANÁLISIS  
HISTOLÓGICO DE TEJIDO ÓSEO Y PERI-IMPLANTARIO**



**Zuzanet Nathaly Grecia Espinoza Neira**

**TRABAJO DE FIN DE MÁSTER**

**DIRIGIDO POR:**

**Prof. MARIANO SANZ ALONSO**

**Madrid, 2019**

# AGRADECIMIENTOS

A Dios y a la vida, porque a través de mi Fe guía mi camino y fortalece mi espíritu.

A mi país, Perú; que a través del Ministerio de Educación – PRONABEC, ha financiado estos estudios de posgrado otorgándome la oportunidad de concretar una nueva meta profesional.

Al Vicedecano de Investigación, Posgrado y Doctorado de la Universidad Complutense de Madrid – Facultad de Odontología, Prof. Alejandro Iglesias Linares, por su gran apoyo a distancia en la orientación y gestión documentaria requerida, que permitió dar inicio a mis estudios de Máster.

Agradecer de manera especial a mi tutor, Prof. Mariano Sanz Alonso, por su acertada orientación y crítica, lo que considero haber sido un aporte invaluable en la elaboración de este proyecto de investigación y en mi formación de investigación.

A la Bióloga, Dra. Estela Maldonado Bautista, personal investigador en la Universidad Complutense de Madrid, por su paciencia e inestimable ayuda y orientación en el tratamiento de las muestras histológicas, su colaboración en la ejecución y registro de datos han sido de mucha importancia.

A mis padres, por su amor incondicional, motivación, confianza y comunicación constante; del mismo modo, a toda mi familia por su cariño y apoyo.

A mis amigos en Perú, por las palabras de ánimo y sobre todo a las personas extraordinarias que han sido parte de esta grata experiencia en España y que nunca olvidaré; gracias por el cariño, optimismo, apoyo, impulso, paciencia, conocimiento y aportes profesionales.

Y por último; a mí misma, por mi tenacidad, que fue el punto de partida.

# ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| INTRODUCCIÓN.....  | 1  |
| 1. HISTOLOGÍA ORAL .....                                     | 1  |
| 2. TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO DE MUESTRAS.....                | 5  |
| 2.1. DESCALCIFICACIÓN .....                                  | 7  |
| 2.2. TINCIÓN HISTOLÓGICA .....                               | 9  |
| JUSTIFICACIÓN .....  | 11 |
| HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....                                   | 12 |
| 1. HIPÓTESIS.....  | 12 |
| 2. OBJETIVOS.....  | 12 |
| MATERIAL Y MÉTODOS .....                                     | 13 |
| 1. DISEÑO DEL ESTUDIO .....                                  | 13 |
| 2. MUESTRA .....   | 13 |
| 3. VARIABLES.....  | 15 |
| 4. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....                        | 15 |
| 5. PROCEDIMIENTO DE RECOLECCIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS .....    | 24 |
| RESULTADOS .....   | 27 |
| 1. ESTUDIO DE VALIDEZ DE UN MÉTODO DE DESCALCIFICACIÓN ..... | 29 |
| 1.1. TIEMPO DE DESCALCIFICACIÓN .....                        | 29 |
| 1.2. ELIMINACIÓN COMPLETA DE CALCIO .....                    | 29 |
| 1.3. CONSERVACIÓN MORFOLÓGICA .....                          | 29 |
| 2. ESTUDIO DE VALIDEZ DE UN MÉTODO DE TINCIÓN .....          | 30 |
| 2.1. TINCIÓN CON HEMATOXILINA EOSINA (HE) .....              | 30 |
| 2.2. TINCIÓN CON ROJO PICROSIRIUS (RP) .....                 | 31 |
| 2.3. TINCIÓN CON PENTACRÓMICO DE MOVAT (PM) .....            | 32 |
| DISCUSIÓN .....  | 41 |
| CONCLUSIONES.....  | 45 |
| IMPLEMENTACIÓN .....   | 46 |
| 1. RECURSOS Y LOGÍSTICA .....                                | 46 |
| 2. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES .....                           | 48 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                             | 48 |
| ANEXOS.....  | 54 |
| ANEXO N° 1 .....   | 54 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1 Descripción del modelo animal. ....   | 13 |
| Tabla 2 Variables de medición para el estudio de validez de un método de descalcificación.<br>..... | 15 |
| Tabla 3 Agentes y métodos de descalcificación empleados.....  | 17 |
| Tabla 4 Proceso de lavado y deshidratación.....   | 18 |
| Tabla 5 Proceso de desparafinado y rehidratación. ....  | 20 |
| Tabla 6 Preparación de Hematoxilina – eosina. ....  | 21 |
| Tabla 7 Protocolo de tinción Hematoxilina – eosina.....   | 21 |
| Tabla 8 Protocolo de tinción Pentacrómico de Movat. ....  | 22 |
| Tabla 9 Protocolo de tinción Rojo Picrosirius. ....   | 24 |
| Tabla 10 Proceso de deshidratación - lavado - fijación del cubreobjetos.....                        | 24 |
| Tabla 11 Interpretación de tinción con Hematoxilina-eosina.....                                     | 26 |
| Tabla 12 Interpretación de tinción con Pentacrómico de Movat. ....                                  | 26 |
| Tabla 13 Interpretación de tinción con Rojo Picrosirius. ....                                       | 26 |
| Tabla 14 Esquematización de las 12 láminas portaobjetos. ....                                       | 27 |
| Tabla 15 Resultados del estudio de validez de un método de descalcificación. ....                   | 33 |

# ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 Corte transversal de la región dento-gingival bucal. (Vignoletti y cols 2011).  | 1  |
| Figura 2 Esquema de la anatomía periodontal microscópica (Lindhe y cols 2011).   | 2  |
| Figura 3 Biología de la oseointegración (Katleen Bragança y cols 2018).  | 4  |
| Figura 4 Cámara de curación (Lindhe 2011).   | 4  |
| Figura 5 Esquema de los tejidos duros y blandos alrededor de un diente e implante (De Rose LF, Mealey BL. Periodontics: medicine, surgery and implants. St. Louis: Mosby; 2004). | 5  |
| Figura 6 Técnicas de procesamiento de muestras. Imagen original Rehfeld et al., 2017, modificada y editada por la autora.  | 7  |
| Figura 7 Fragmento óseo conteniendo diente, implante, tejidos periodontales y peri-implantarios.   | 14 |
| Figura 8 Fragmento óseo seccionado con muestra de implante y diente.   | 14 |
| Figura 9 Tabla ósea lingual posterior al retiro del implante.  | 14 |
| Figura 10 Fijación en formol 4%.   | 15 |
| Figura 11 Agentes descalcificadores: Derecha (EDTA 12%), Centro (Osteosoft©), Izquierda (TBD-2™).  | 16 |
| Figura 12 Factores de descalcificación: T° ambiente, agitación durante el proceso de descalcificación.   | 16 |
| Figura 13 "Fracture Technique".  | 18 |
| Figura 14 Procesador automático de tejidos - deshidratación e inclusión en parafina.   | 19 |
| Figura 15 Creación de bloque y sección de parafina.  | 19 |
| Figura 16 Proceso de desparafinado y rehidratación.  | 20 |
| Figura 17 Protocolo de tinción Hematoxilina – eosina.  | 21 |
| Figura 18 Láminas portaobjetos con cortes histológicos finalmente procesados.  | 28 |
| Figura 19 Visión general de los cortes histológicos procesados con 3 agentes descalcificadores y 3 técnicas de tinción.  | 34 |
| Figura 20 Colapso de la interfaz del tejido conectivo – tejido óseo.   | 35 |
| Figura 21 Comparación de cortes histológicos procesados con diferentes métodos de descalcificación y tinción a nivel de región epitelial.  | 36 |
| Figura 22 Comparación de cortes histológicos procesados con diferentes métodos de descalcificación y tinción a nivel de región de transición tejido conectivo - tejido óseo.     | 37 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 23 Comparación de cortes histológicos procesados con diferentes métodos de descalcificación y tinción a nivel de región de tejido óseo. ....        | 38 |
| Figura 24 Comparación de cortes histológicos procesados con diferentes métodos de descalcificación y tinción a nivel de cámara de curación. ....           | 39 |
| Figura 25 Comparación de cortes histológicos procesados con diferentes métodos de descalcificación y tinción a nivel de región de tejido periodontal. .... | 40 |

# INTRODUCCIÓN

El diagnóstico adecuado de la Patología Oral está basado en la actividad interdisciplinaria del Odontólogo en sus diversas especialidades, radiólogo y patólogo; siendo así, la histopatología juega un papel fundamental en el área de la Estomatología a través del examen de biopsias que llegan a los laboratorios para análisis y/o detección de las anomalías o cambios microscópicos en tejidos y células biológicas. Para cumplir con este objetivo, los tejidos o muestras deben ser previamente preparados mediante procesos apropiados conocidos como “Técnicas histológicas”.

## 1. HISTOLOGÍA ORAL

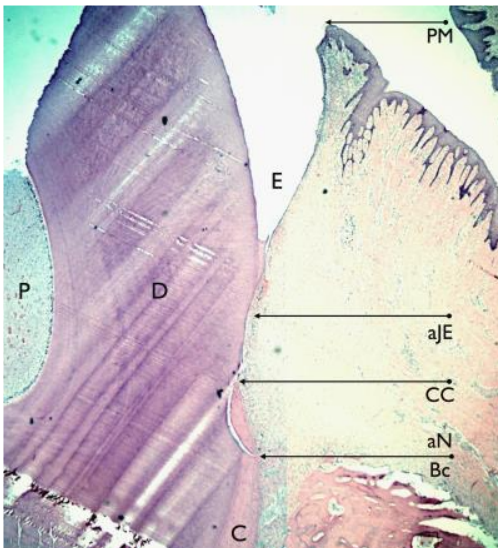


Figura 1 Corte transversal de la región dento-gingival bucal. (Vignoletti y cols 2011).

Al observar muestras histológicas de la región dento-gingival se puede identificar ciertos puntos de referencia que son utilizados para las mediciones histométricas. PM, porción más coronal de la mucosa marginal; ajE, extensión más apical del epitelio de unión; cC, extensión más coronal del cemento; aN, porción más apical de la muesca; Bc, nivel más coronal de la cresta ósea (Bc y aN están en el mismo nivel en la sección histológica); P, tejido pulpar; D, dentina; C, cemento radicular; E, esmalte. (1)

Histológicamente, el tejido dental está constituido por a) Esmalte, matriz extracelular altamente mineralizada. Compuesto por 95% de materia inorgánica, 1% de materia orgánica y el resto por agua. La sustancia calcificada del esmalte está contenida en cristales de hidroxiapatita (2,3) que se organizan formando los prismas del esmalte, también se puede identificar otras estructuras secundarias (3). Al ser una estructura altamente mineralizada, el esmalte desaparece después del proceso de descalcificación de muestras (4); b) Dentina, tejido calcificado compuesto por 70% material inorgánico, 12% agua y 18% matriz orgánica, constituida casi totalmente por colágeno (93%). Su estructura principal es la fibrilla de Tomes (prolongaciones odontoblásticas) alojadas en los túbulos dentinarios, se divide en una dentina periférica o del manto (inmediatamente por debajo del esmalte), dentina peritubular, dentina intertubular, dentina circumpulpar y la predentina. Su grado de

calcificación no es uniforme en las diferentes áreas, las zonas menos calcificadas son la dentina periférica, el límite amelodentinario, la dentina recién formada junto a la pulpa (2). Tras el proceso de descalcificación, en la dentina aún queda materia orgánica por lo que sí es visible microscópicamente; c) Pulpa, tejido conectivo laxo especializado, se compone de células, fibras, sustancia fundamental amorfa, nervios, vasos sanguíneos y linfáticos. Posee 75% agua y 25% de sustancia orgánica en el tejido joven (2) y d) Cemento radicular.

El tejido periodontal se divide en periodonto de protección (encía) y periodonto de inserción (ligamento periodontal, cemento radicular y hueso alveolar). Histológicamente, el epitelio que recubre la encía libre es diferenciado como a) Epitelio bucal, frente a la cavidad bucal, es de tipo plano estratificado queratinizado, dividido en estratos celulares (basal, espinoso, granuloso y córneo), incluye células de Langerhans, células inflamatorias, queratinocitos, melanocitos y células de Merkel (5); b) Epitelio de unión, responsable del contacto entre la encía y el diente (5) y c) Epitelio del surco, enfrenta al diente sin estar en contacto con la superficie del esmalte. (5)

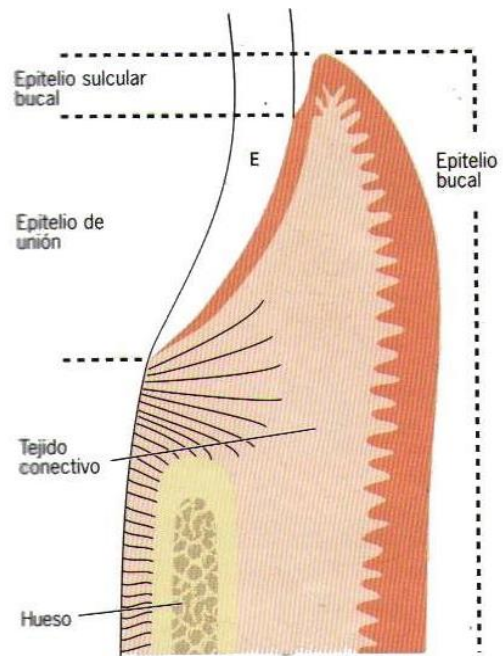


Figura 2 Esquema de la anatomía periodontal microscópica (Lindhe y cols 2011).

El componente tisular predominante en la encía es el tejido conjuntivo (lámina propia o corión). Sus componentes principales son fibras colágenas (alrededor del 60% del volumen de tejido conjuntivo), fibroblastos (alrededor del 5%), vasos y nervios (aproximadamente 35%), incluidos en sustancia fundamental amorfa (matriz). Adicionalmente, distintos tipos de células como fibroblastos, mastocitos, macrófagos y células inflamatorias (5). Las fibras del tejido conjuntivo son producidas por fibroblastos y pueden clasificarse en a) Fibras colágenas, constituyen el componente esencial del periodonto; b) Fibras de reticulina, presentes en las interfaces tejido conjuntivo-epitelio y endotelio-tejido conjuntivo; c) Fibras de oxitalano, escasas en la encía pero abundantes en el ligamento periodontal y d) Fibras elásticas, solo asociadas a los vasos sanguíneos. (5)

El límite entre el epitelio bucal y el tejido conjuntivo/conectivo subyacente presenta una disposición ondulada. Las porciones de tejido conjuntivo que se proyectan en el epitelio se

denominan papilas de tejido conjuntivo (papilas coriales) separadas por crestas epiteliales llamadas papilas dérmicas, siendo por tanto características del epitelio bucal; mientras que, están ausentes en el epitelio de unión, excepto cuando hay inflamación. (5)

El ligamento periodontal está constituido por tejido conectivo denso que soporta al diente en su alveolo, mantiene la relación fisiológica entre el cemento y el hueso alveolar. En sentido coronal se continúa con la lámina propia de la encía y está delimitado por los haces de fibras colágenas que conectan la cresta ósea alveolar con la raíz (5). Las fibras principales del ligamento periodontal están dispuestas en 6 grupos: transeptales, crestos alveolares, horizontales, oblicuas, apicales e interradiculares. (6)

El cemento radicular no contiene vasos sanguíneos ni linfáticos, carece de inervación, no experimenta remodelación ni resorción fisiológica. Contiene fibras colágenas incluidas en una matriz orgánica. Existen 3 formas: a) Cemento acelular de fibras extrínsecas, localizado en la porción coronal y media de la raíz, contiene haces de fibras de Sharpey; b) Cemento celular mixto estratificado, situado en el 1/3 apical de las raíces y furcaciones; y c) Cemento celular con fibras intrínsecas, en lagunas de resorción. Los cementos celulares contienen cementocitos (5) (células capaces de formar nuevos estratos de cemento).

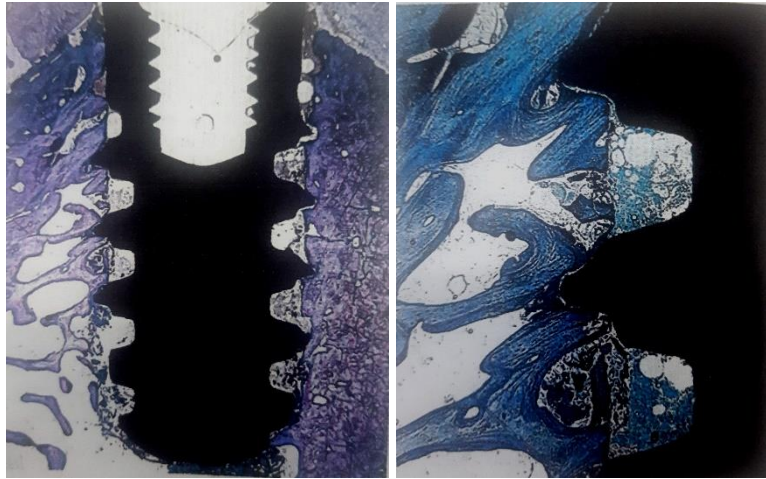
El hueso alveolar está constituido por el hueso alveolar propio y el hueso alveolar de soporte (5). En general, el tejido óseo se caracteriza por tener una matriz extracelular mineralizada, estar altamente vascularizado y presentar gran actividad metabólica (7). Histológicamente, está estructurado en laminillas de matriz osteoide calcificada. La disposición de estas laminillas es la que determina que el hueso sea cortical o esponjoso. Ambos están constituidos por osteonas. El hueso cortical o compacto se estructura en conductos de Havers recubiertos de laminillas en disposición concéntrica donde se sitúan los osteocitos. El hueso esponjoso o trabecular lo constituyen laminillas óseas en forma de red que delimitan cavidades areolares en cuyo interior se encuentra la médula ósea (8). Tanto el hueso cortical como el esponjoso contienen a) Células especializadas, coexisten varios tipos de células y se hallan dentro del propio tejido óseo o en el estroma conjuntivo de la médula ósea, estas son osteoblastos (síntesis de matriz orgánica), osteocitos (síntesis y resorción de matriz), osteoclastos (resorción de matriz orgánica) (8); b) Matriz orgánica, la sustancia osteoide representa 1/3 del peso óseo. Está formada fundamentalmente por proteínas, entre las que destaca el colágeno (90%), sobre todo tipo I (>95%) y tipo V (<5%). Debe considerarse a la matriz mineralizada extracelular como algo más que un reservorio de calcio y fósforo, ya que constituye una reserva de proteínas que participan en la

regulación de la diferenciación celular y en la integridad y función del tejido óseo (8); c) Fase mineral, representa el 65% del peso óseo. Está formado por calcio, fosfato y carbonato (en proporciones de 10:6:1) en forma de pequeños cristales de hidroxiapatita y en menor proporción hay magnesio, sodio, potasio, manganeso y flúor (8). El calcio es uno de los componentes clave para dar a los huesos sus propiedades mecánicas, su matriz cristalina (9), siendo el que le confiere la característica de dureza.

Frente a un daño, la cicatrización del tejido óseo incluye tanto fenómenos de regeneración como de reparación. En Implantología, la formación de hueso nuevo después de la instalación del implante, durante el proceso de oseointegración (conexión funcional y estructural entre hueso sano y la superficie de un implante que soporta carga), comprende 3 fases a) formación de hueso reticular desde la pared lateral del lecho óseo; b) depósito de hueso laminar y fibras paralelas; y c) remodelación y modelación ósea. (10)



*Figura 3 Biología de la oseointegración (Katleen Bragança y cols 2018).*



*Figura 4 Cámara de curación (Lindhe 2011).*

Por otro lado; la mucosa peri-implantaria es el tejido blando que rodea a los implantes dentales. La curación de la mucosa después de la instalación del implante proporciona una adherencia de tejido blando (fijación transmucosa), que actúa como un sellado impidiendo el ingreso de agentes extraños hacia el tejido óseo. (5)

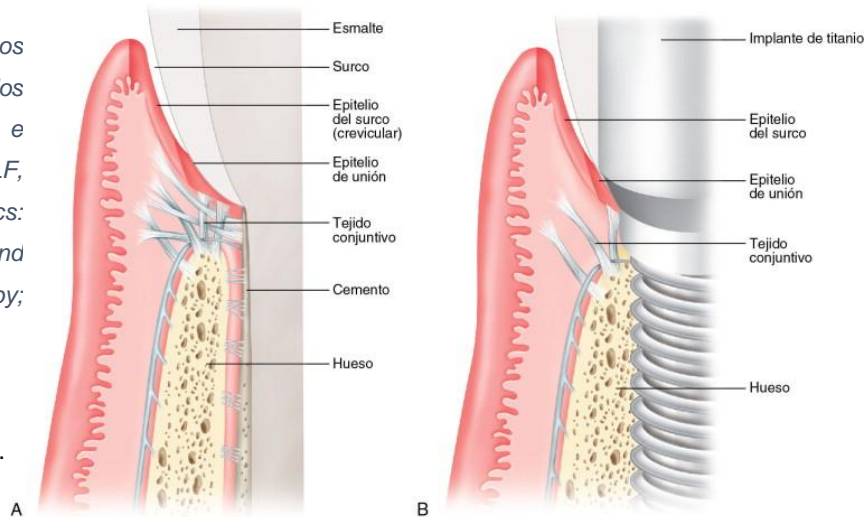
La encía normal y la mucosa peri-implantaria tienen varias características en común; por ejemplo, la superficie externa de la mucosa peri-implantaria también está cubierta por un epitelio oral queratinizado que en el borde epitelial se conecta con una delgada barrera epitelial (similar al epitelio de unión de los dientes naturales). (5)

La diferencia principal entre el tejido mesenquimático presente en torno de un diente y el sitio con implante consiste en la presencia de cemento sobre la superficie radicular. Desde este cemento se proyectan las fibras colágenas dentogingivales y dentoalveares en dirección lateral, coronal y apical. En sitios con implantes, debido a la ausencia de cemento y ligamento periodontal, la disposición de las fibras colágenas difieren; en este caso, están incluidas en el periostio de la cresta ósea y se proyectan en direcciones paralelas a la superficie del implante y no logran fijarse en el metal. Otra diferencia radica en la distribución de las estructuras vasculares en el compartimento apical de la barrera epitelial. (5)

*Figura 5 Esquema de los tejidos duros y blandos alrededor de un diente e implante (De Rose LF, Mealey BL. Periodontics: medicine, surgery and implants. St. Louis: Mosby; 2004).*

(A) Tejido periodontal.

(B) Tejido peri-implantario.



## 2. TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

En los últimos tiempos, en el campo de la Periodoncia e Implantología los tejidos enviados para análisis histopatológico pueden ser procesados mediante inclusión en resina/metacrilato o parafina. La parafina es el método tradicional, recomendada para métodos más específicos como enzimáticos e inmunohistoquímica (IHQ) en los tejidos duros. (11)

El procesamiento convencional de preparación histológica de las muestras biológicas incluye diversas fases o etapas que deben ser cumplidas teniendo en cuenta el tipo de muestra que se va a procesar, tejido duro o blando (Fig. 6). Estas fases son:

- **Fijación**, ayuda a proteger los huesos y tejido blando circundante de los efectos dañinos de la descalcificación ácida (4), permite que el tejido alcance el grado de firmeza requerido y retrasa la degradación (12). Se destaca el uso de aldehídos (formaldehído) como los más

utilizados para histoquímica e IHQ (13,14), siendo formalina neutra amortiguada al 10% adecuada tanto para la inclusión de muestras en parafina como metacrilato. (4)

- **Descalcificación**, los tejidos altamente mineralizados como el hueso y diente requieren descalcificación como un paso inicial, con la finalidad de integrarlo en parafina, seccionar, teñir los tejidos y posterior análisis histopatológico (15,16).
- **Lavado y deshidratación**, tiene como objetivo eliminar el agua de los tejidos seleccionados para solidificarlos, permitir la inclusión en parafina, facilitar el corte de secciones delgadas, más finas para usar en microscopios de luz y gruesas para el microscopio electrónico. El agua se elimina de los tejidos mediante el método de deshidratación a través del etanol (12), usando concentraciones crecientes hasta llegar a 100°.
- **Inclusión en parafina**, tiene por objeto transformar el material biológico semilíquido en otro sólido, homogéneo y duro (14).
- **Corte o sección**, los métodos convencionales son imposibles en casos de tejidos como huesos, dientes, odontomas y lesiones calcificadas. En estas situaciones, la "descalcificación" hace que el tejido sea lo suficientemente suave como para ser cortado por el microtomo (17). Por tanto, es imposible preparar secciones incrustadas con parafina mediante una microtomía estándar sin descalcificación previa. (18)
- **Desparafinado y Rehidratación**, el desparafinado es realizado mediante tratamiento con xilol o sustitutos y la rehidratación del tejido a través de concentraciones decrecientes de etanol, desde 100°.
- **Tinción histológica**, la coloración, reconocida técnicamente como tinción, consiste en "hacer visibles las estructuras biológicas" (19).
- **Montaje**, se realiza colocando sobre el portaobjeto una gota de medio de montaje transparente con la finalidad de fijar el cubreobjeto, consiguiendo la adhesión y protección del corte histológico.
- **Observación en el microscopio**, para la visualización de la morfología, cambios microscópicos en tejidos o procesos fisiopatológicos según el objetivo del estudio.

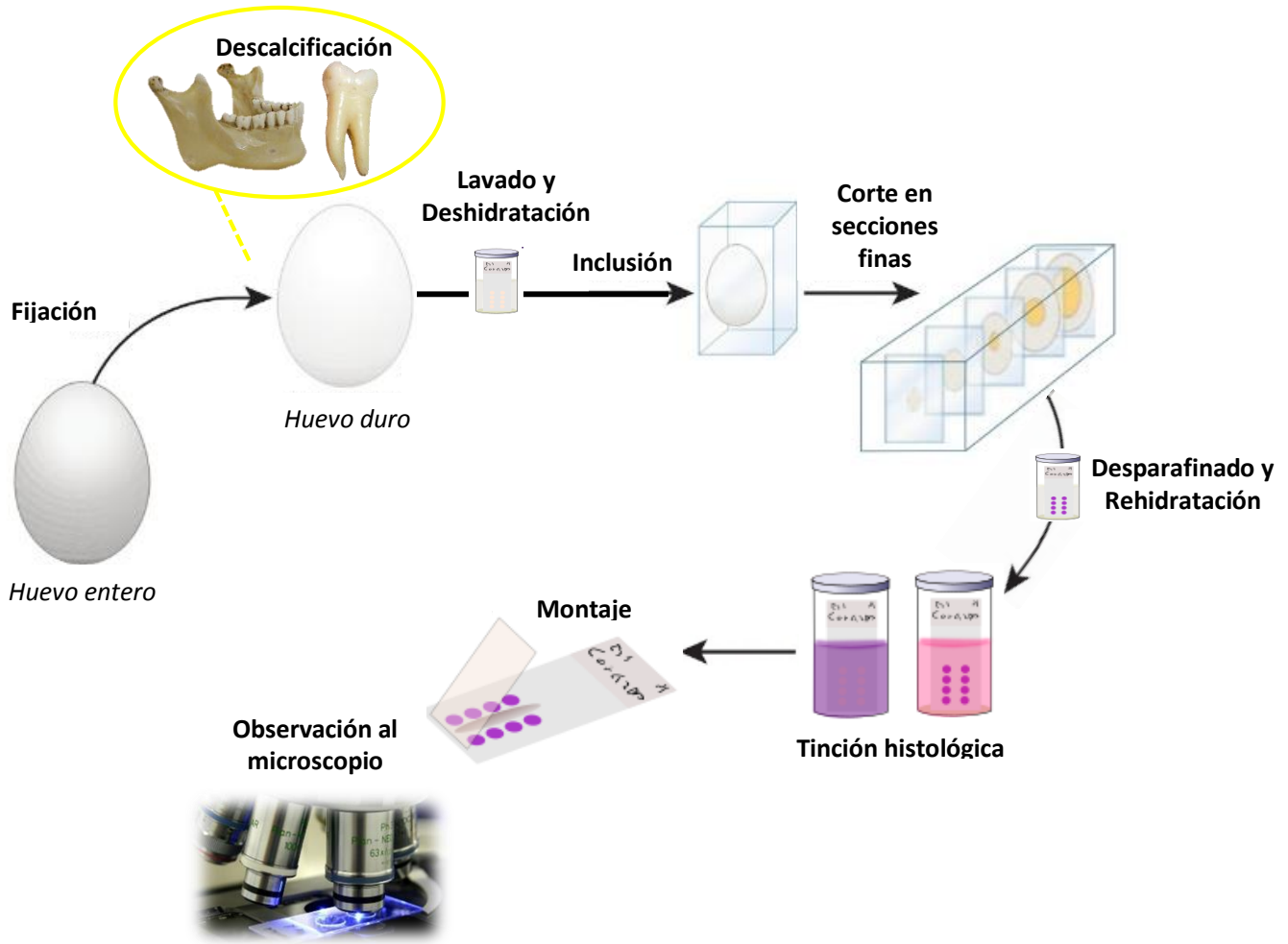


Figura 6 Técnicas de procesamiento de muestras. Imagen original Rehfeld et al., 2017, modificada y editada por la autora.

## 2.1. DESCALCIFICACIÓN

Considerada uno de los procesos más sensibles a la técnica, empleada en los laboratorios de histopatología para el examen de tejidos calcificados (20). Consiste en la eliminación de sales o iones de calcio de los tejidos mineralizados, haciéndolos adecuados para el corte de las secciones histológicas (21). Se realiza por varios motivos, como la tinción de rutina de las secciones de parafina, la histoquímica de enzimas, la IHQ, la inmunocitoquímica y la microscopía electrónica. (22)

Actualmente, los tejidos mineralizados se descalcifican utilizando 3 tipos de agentes: ácidos inorgánicos/minerales fuertes (ácido clorhídrico), ácido orgánico débil (ácido fórmico) o agentes quelantes (ácido etilendiaminotetracético - EDTA) (13). Así mismo; existen otras

mezclas comerciales como Histofix® descalcificador 3 (rápido, contiene EDTA) (23); Osteosoft®, cuya formulación está basada en EDTA (24); TBD-2™, descalcificador de ácido fórmico (25) y otros.

Al día de hoy no existe un método o protocolo de descalcificación estandarizado. Se observan métodos tradicionales (16), métodos de descalcificación por microondas (17) y métodos de descalcificación por perfusión (26). Los métodos tradicionales, implican sumergir los tejidos mineralizados en soluciones que contienen ácidos (minerales u orgánicos) y agentes quelantes (16); debiéndose realizar preferiblemente con EDTA, y con revisiones periódicas de la consistencia del tejido cada 12h (13). El tiempo de descalcificación depende de varios factores, como la temperatura, el pH y la concentración del agente descalcificador, el tamaño y la densidad de la muestra a descalcificar (27). Por consiguiente; la literatura reporta que el tiempo promedio empleado para la descalcificación convencional varía entre 25-40 horas (27), 3 a 6 días (20), incluso meses dependiendo del tamaño de la muestra y el tipo de solución utilizada.

El sometimiento de las muestras a tiempos prolongados de exposición a los fluidos de descalcificación causa inflamación e hidrólisis de la matriz ósea. Por ello; se han realizado varios intentos para acelerar el proceso de descalcificación buscando que los fluidos descalcificadores de elección produzcan un daño mínimo al tejido. Algunos protocolos de descalcificación descritos en la literatura son rápidos, pero la preservación morfológica está comprometida (28) o en todo caso tienen la ventaja de preservar la morfología pero con la desventaja de un tiempo de descalcificación prolongado, como es el caso de la solución gold estándar, EDTA.

Frente a esta problemática, muchos científicos como Verdenius y Alma 1958, Iwasaki y cols 1998, Pitol y cols 2007, Neves y cols 2011, Prasad y Donoghue 2013, Singh y cols 2013, Guibas y cols 2014, Zhai y cols 2014, Savi y cols 2017, Abrantes y cols 2017 y otros han intentado introducir nuevas sustancias descalcificadoras o han intentado modificar los agentes de descalcificación conocidos, para cumplir los criterios de un buen agente descalcificador que: a) asegure la eliminación completa de calcio, b) cause un daño mínimo a las células y tejidos, c) cause la no alteración de tinciones posteriores y d) se descalcifique a una velocidad razonable (28,29). Fuera de estas investigaciones; hoy en día no se registra antecedentes de estudios comparativos sobre las características y efectos de descalcificación con agentes comerciales como Osteosoft® ni TBD-2™ que vienen siendo reportados en el proceso de descalcificación de muestras de algunos estudios realizados

por autores como a) Pavlič y cols 2019 usaron Osteosoft© y TBD-2™ para la descalcificación de dientes (tiempo de descalcificación con Osteosoft © aproximadamente 14 semanas) (30); b) Belhassen y cols 2017 descalcificaron cócleas de cobayas con TBD-2™ (tiempo de descalcificación 48-72 h) (31); y c) Kim y cols 2014 descalcificaron tejido óseo con TBD-2™ (32); mientras que, Martínez-Sanz y cols 2012 con Osteosoft© (33).

Lamentablemente, la descalcificación del hueso sigue siendo considerado un procedimiento complejo, tedioso y frustrante del trabajo en laboratorios. Una inadecuada descalcificación del tejido óseo puede afectar las fases siguientes de la técnica de procesamiento de muestras como la tinción histológica, debido a la desnaturalización de tejidos y células.

## **2.2. TINCIÓN HISTOLÓGICA**

Implica la interacción de los tejidos con los reactivos de tinción, dando como resultado la coloración en función de la composición y afinidad (34) permitiendo de este modo la visualización de las estructuras morfológicas. Durante el desarrollo de los dientes, los componentes de los tejidos duros, como la dentina, el esmalte, el hueso y la presencia de colágeno maduro e inmaduro, complican la diferenciación mediante tinción histoquímica. (35)

Por lo general; las técnicas de tinción utilizan colorantes hidrosolubles, siendo necesario la remoción de la parafina. Se pueden usar varios tipos de tinciones, de acuerdo a Gartner LP y Hiatt JL. 1999 pueden ser agrupados en 3 clases distintas a) Colorantes que diferencian los componentes ácidos y básicos de las células (19); b) Colorantes especializados que diferencian los componentes fibrosos de la matriz extracelular y c) Sales metálicas que precipitan en los tejidos. (36)

Desde la utilización de los primeros colorantes naturales, ya por Leeuwehoek en el siglo XVII hasta la aplicación de las anilinas en métodos dicrómicos, tricrómicos y policrómicos, cuyo auge se sitúa en el siglo XIX y primeras décadas del siglo XX, se ha visto que autores como Li y cols 2005, Gupta y cols 2012, Belaldavar y cols 2014, Rentsch y cols 2014, Kunche y cols 2017 han realizado estudios de comparaciones histológicas en tejidos calcificados resaltando en algunos casos la eficiencia de otras tinciones frente a la tinción de Hematoxilina – eosina (HE). Es así que, la historia de la histología indica que existió una creciente necesidad de procedimientos de tinción eficientes, precisos y menos complejos. Muchos procedimientos todavía están en uso hoy en día, y muchos otros se han

reemplazado con nuevas técnicas de tinción inmunológica, molecular y otras técnicas avanzadas de tinción. Actualmente, las tinciones histológicas mejoradas, se han modificado y combinado con otras tinciones para mejorar su eficacia. (12)

El análisis microscópico de los tejidos patológicos es importante para la determinación de un diagnóstico. En este sentido, existen innumerables tinciones empleadas para el análisis de los tejidos bucales (37), dentro de los cuales la técnica de tinción convencional es la HE, usada rutinariamente en los laboratorios de histopatología, debido a sus ventajas de facilitar el estudio de diversos tipos de tejido y cambios morfológicos de las células, fácil aplicación y requiere poca instrumentación. La HE, incluye el uso de dos tintes: a) Hematoxilina, componente básico que tiñe el núcleo (debido a los ácidos nucleicos) en tonos azul/púrpura (12,19). Una desventaja de la tinción con hematoxilina es que es incompatible con la inmunofluorescencia (38); y b) Eosina, compuesto ácido que tiñe citoplasma, fibra elástica, colágeno y fibras musculares, en tonos de color rosa (12,19). Putns y Desa 1977, señalan que la tinción de hematoxilina eosina de rutina produce el mismo color tanto en tejidos calcificados como blandos.

Alternativamente a la tinción de HE, que solo brinda una visión general de los tejidos, existen otras tinciones específicas que pueden diferenciar más componentes del tejido óseo al producir colores contrastantes o también pueden detectar diferentes grados de madurez del colágeno (35); entre algunas de ellas se menciona a) Pentacrómico de Movat (PM), representa una de las mejores metodologías de coloración por su análisis detallado del progreso de la curación ósea (39); y b) Rojo Picrosirius (RP), una de las tinciones más importantes para estudiar las redes de colágeno en diferentes tejidos. (40)

En conclusión, resulta importante resaltar que la base fundamental para evaluar la morfología, patología oral y la regeneración ósea consiste primero en la producción de muestras con una adecuada calidad.

## JUSTIFICACIÓN

---

Considerando que, actualmente para la obtención de un diagnóstico de patología oral, se otorga un papel importante a los exámenes histopatológicos auxiliares, se decide desarrollar un proyecto de investigación en la búsqueda de protocolos eficientes en las técnicas de procesamiento de muestras; debido que, la preparación del tejido es indispensable para la observación de células y realización de análisis comparativos. Es importante recordar que la producción de muestras con una adecuada calidad está en relación de la interacción de varios mecanismos o fases que deben trabajar en conjunto, tales como; fijación, descalcificación, procesamiento, incrustación, seccionado y tinción histológica. Un método eficiente que integre todos estos conceptos de manera adecuada será esencial para evitar procedimientos laboriosos, pérdida de inmunoreactividad, permitir la conservación de la morfología y para la obtención de rápidos resultados en el diagnóstico histopatológico.

Bajo esta premisa, el presente proyecto de investigación se justifica en: a) Las desventajas de los sistemas tradicionales que incluyen el uso de EDTA y HE, inconvenientes en cuanto al tiempo consumido en la descalcificación, daño al tejido con la pérdida de las estructuras morfológicas y poca diferenciación (contraste de colores) de los componentes estructurales y la fisiopatología ósea; b) Ausencia de estudios que comparen la eficiencia de la descalcificación entre el agente tradicional EDTA y los productos comerciales Osteosoft® y TBD-2™; c) Necesidad de buscar técnicas de procesamiento histológico óptimas, que permitan la ejecución de proyectos de investigación con periodos de trabajo de 1 año, lo que al día de hoy resulta incompatible por los periodos prolongados de descalcificación. En consecuencia, se tiene la finalidad de disminuir el obstáculo del tiempo, garantizar la conservación de la morfología y tener la capacidad de elegir la técnica de tinción más adecuada para la visualización de las estructuras según el objetivo del estudio.

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

## 1. HIPÓTESIS

Conociendo la importancia de realizar una adecuada preparación de los tejidos y las dificultades que se presentan en el manejo por la ausencia de soluciones que cumplan todos los requisitos necesarios, se plantea las siguientes hipótesis de trabajo:

- **H1** = Los métodos de descalcificación con Osteosoft® y TBD-2™ permiten obtener mejores resultados en la tinción histológica con HE, PM y RP en comparación con EDTA 12%; combinando una descalcificación más rápida con preservación de las estructuras morfológicas.
- **H2** = Las técnicas de tinción específica PM y RP resultan superiores al permitir un análisis más detallado del progreso de la curación ósea y visualización de redes de colágeno, respectivamente; para el estudio de muestras de tejido óseo en comparación con la visión general que brinda la tinción base de HE.

## 2. OBJETIVOS

- **Objetivo General**
  - Optimizar el método de descalcificación y tinción para muestras que contengan tejido óseo, diente/implante y tejidos periodontales/peri-implantarios, mediante la comparación de nuevos métodos con los sistemas de procesamiento convencionales.
- **Objetivos Específicos**
  1. Comparar la velocidad de descalcificación entre Osteosoft®, TBD-2™ con el producto rutinariamente usado, EDTA 12%.
  2. Constatar la eliminación completa de calcio.
  3. Comprobar la conservación morfológica de los tejidos mediante la no alteración de la tinción histológica.
  4. Comparar y determinar la eficacia de la tinción específica PM y RP frente a la tinción base HE.

# MATERIAL Y MÉTODOS

## 1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se diseñó un estudio observacional, descriptivo, transversal y prospectivo a partir de un proyecto precedente de experimentación animal, para lo cual se contó con la colaboración del Laboratorio de Investigación de la Universidad Complutense de Madrid. Se desarrolló:

- Estudio de validez de un método de descalcificación; a través de la comparación de 3 agentes descalcificadores distintos, TBD-2™ y Osteosoft© frente a la solución gold estándar, EDTA 12%.
- Estudio de validez de un método de tinción de muestras para el análisis del tejido óseo; mediante la comparación de las tinciones específicas de PM y RP frente a la tinción base, HE.

## 2. MUESTRA

La muestra provino de fragmento de mandíbula de perro adulto de raza beagle, empleada en un estudio previo donde se colocaron implantes dentales; dicho proyecto contó con la aprobación del Comité de Ética del Hospital Veterinario Rof Codina y la autorización del Departamento Territorial de la Junta de Galicia (Anexo N° 1).

Los fragmentos óseos de aproximadamente 10 mm de grosor incluían los implantes dentales, ocasionalmente parte de estructuras dentarias y tejidos periodontales/ peri-implantarios; en dicho proyecto, se usó la tabla ósea vestibular para el análisis histopatológico, mientras que la tabla ósea lingual fue la muestra destinada al presente estudio de investigación.

*Tabla 1 Descripción del modelo animal.*

|                            |   |
|----------------------------|---|
| <b>Especie</b>             | Canina, raza Beagle   |
| <b>Centro de origen</b>    | Centro autorizado de animales de experimentación de la Fundación Rof Codina (AE-LU-001) |
| <b>Centro de procesado</b> | Laboratorio de Investigación de la Universidad Complutense de Madrid                    |
| <b>Edad media</b>          | Adulto  |
| <b>N° de muestras</b>      | 3 fragmentos óseos  |

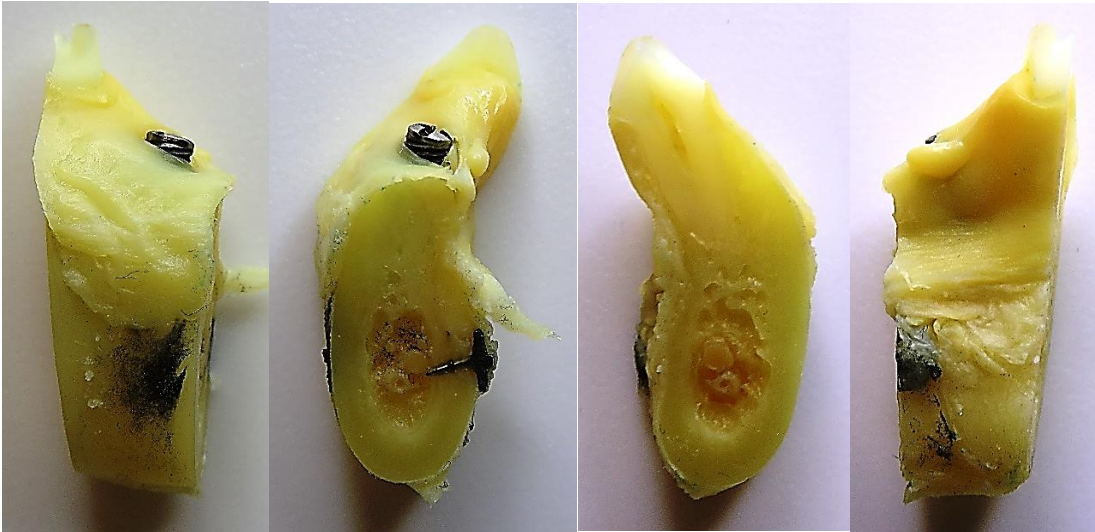


Figura 7 Fragmento óseo conteniendo diente, implante, tejidos periodontales y peri-implantarios.



Figura 8 Fragmento óseo seccionado con muestra de implante y diente.



Figura 9 Tabla ósea lingual posterior al retiro del implante.

### 3. VARIABLES

Para el estudio de validez de un método de descalcificación, se tuvo en cuenta los criterios que debería cumplir un buen agente descalcificador (28,29) y se diseñó variables de tipo cualitativa, medidas mediante escala ordinal: Eficiente / Buena integridad (+++), Aceptable / Moderada integridad (++) y Poco eficiente / Inaceptable (+).

Tabla 2 Variables de medición para el estudio de validez de un método de descalcificación.

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| <b>Variables independientes</b> | EDTA 12%                               |
|                                 | Osteosoft©                             |
|                                 | TBD-2™                                 |
| <b>Variables dependientes</b>   | Velocidad / Tiempo de descalcificación |
|                                 | Eliminación completa de calcio         |
|                                 | Conservación morfológica               |

Mientras que, para el estudio de validez de un método de tinción de las muestras, las características de la comparación entre las tinciones específicas PM y RP frente a la tinción base HE fue visualizada directamente en las muestras e informadas de manera descriptiva.

### 4. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

El procesamiento de las muestras se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación de la Universidad Complutense de Madrid, realizándose mediante inclusión en parafina y consistiendo en las siguientes fases:

- 1. Fijación en formol:** se empleó una solución de formol tamponado al 4% en donde se mantuvo el tejido durante 1 mes.

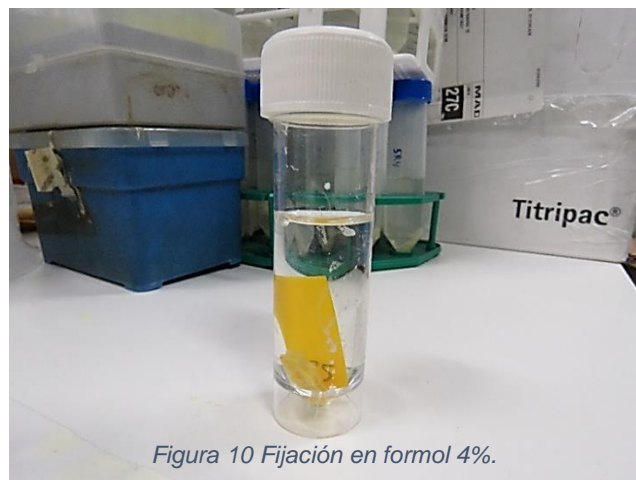


Figura 10 Fijación en formol 4%.

2. **Descalcificación:** Para cumplir con los objetivos generales de la descalcificación, cada una de las 3 muestras fue sumergida en un agente descalcificador diferente (Tabla N° 3). Durante el proceso se controló los factores que pueden intervenir en el tiempo de descalcificación (concentración, temperatura y agitación).

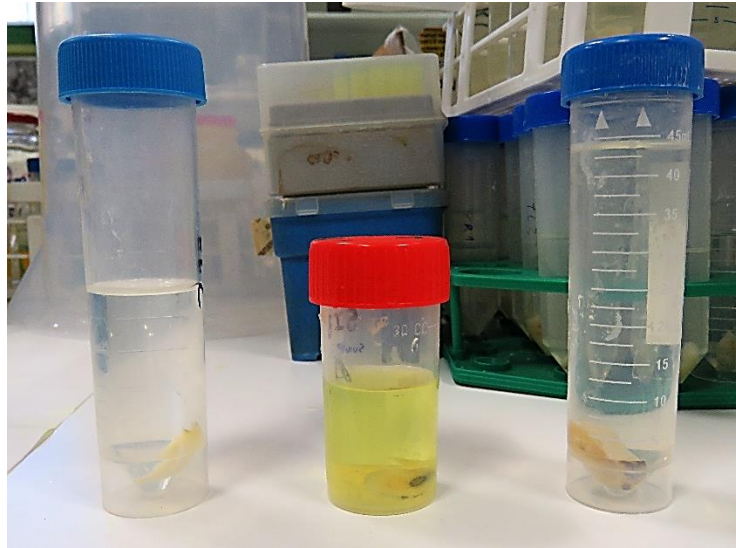


Figura 11 Agentes descalcificadores: Derecha (EDTA 12%), Centro (Osteosoft©), Izquierda (TBD-2™).



Figura 12 Factores de descalcificación: T° ambiente, agitación durante el proceso de descalcificación.

Tabla 3 Agentes y métodos de descalcificación empleados.

| Nombre del producto              | EDTA 12% pH=7                             | Osteosoft©                                | Shandon™ TBD-2™  |
|----------------------------------|---|---|--|
| Origen                           | Panreac (ref.: 141669), Barcelona, España | Merck (ref.: 101728), Darmstadt, Alemania | Thermofisher Scientific (ref.: 6764003), Karlsruhe, Alemania |
| Formulación                      | Agente Quelante                           | Basada en EDTA                            | Basada en ácido fórmico                                      |
| Concentración                    | 12%                                       | Uso directo                               | Uso directo  |
| Tamaño de la muestra             | Apróx.10 mm                               | Apróx.10 mm                               | Apróx.10 mm  |
| Agitación                        | Constante                                 | Constante                                 | Constante  |
| T° de descalcificación           | T° Ambiente                               | T° Ambiente                               | T° Ambiente  |
| Tiempo final de descalcificación | 14 meses                                  | 7 meses                                   | 7 semanas  |

El punto final de descalcificación fue determinado mediante prueba física; una vez que el tejido óseo presentó una consistencia blanda se aplicó “*Fracture Technique*”,

consistió en realizar la sección del bloque de la muestra en un plano bucolingual (41–43) bajo la ayuda de un bisturí con el propósito de retirar el implante.



Figura 13 "Fracture Technique".

Pese a la detección aparentemente positiva del punto de descalcificación y debido al tamaño de las muestras, se observó que la zona central del tejido óseo se mantenía sin descalcificar en todos los casos, por lo que se usó adicionalmente la solución de Histofix® ("Histofix® Descalcificador 3"; Panreac Química S.L.U., Illinois, EE.UU.).

- Lavado y deshidratación:** una vez que el tejido se encontró descalcificado y el implante fue retirado, se lavó en agua destilada y el fragmento óseo fue llevado al procesador automático de tejidos (Slee Medical, Mainz, Alemania) para someterse a un proceso de deshidratación como se muestra en la tabla N° 4.

Tabla 4 Proceso de lavado y deshidratación.

| Proceso                 | Tiempo       |
|-------------------------|--------------|
| Lavar en agua destilada | 1 h          |
| EtOH 70°                | 1 h          |
| EtOH 80°                | 1 h 30 min   |
| EtOH 90°                | 1 h 30 min   |
| EtOH 100° (x2)          | 4h (total)   |
| Butanol (x2)            | 10 h (total) |

4. **Inclusión en parafina:** las muestras fueron incluidas 2 veces en parafina líquida (60 °C); debido al tamaño de las muestras, permanecieron en el procesador automático de tejidos por un tiempo de 24 h para garantizar la incrustación de la parafina.

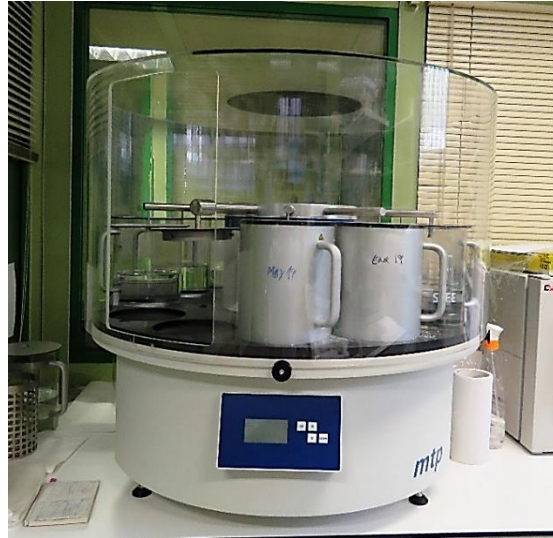


Figura 14 Procesador automático de tejidos - deshidratación e inclusión en parafina.

5. **Corte o sección:** creado el molde de parafina se procedió a realizar los cortes en el microtomo semiautomático Rotary Microtome Cut 5062 (Slee Medical, Mainz, Alemania) para la obtención de secciones de 7  $\mu\text{m}$  de grosor. En el transcurso, debido a la falta de descalcificación de la zona central del tejido, éste ofrecía resistencia; motivo por el cual, era necesario la inmersión en Histofix® por un tiempo de 1 h, luego se lavaba y se continuaba la sección, repitiéndose el procedimiento tantas veces como era requerido.

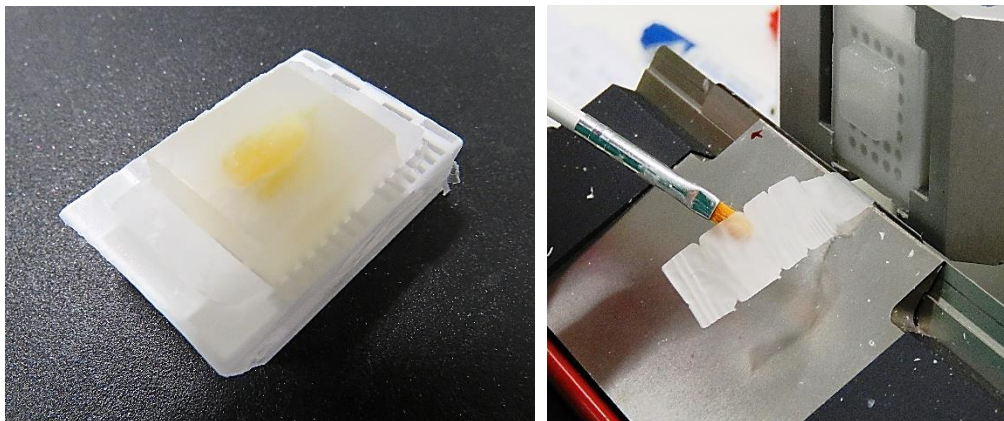
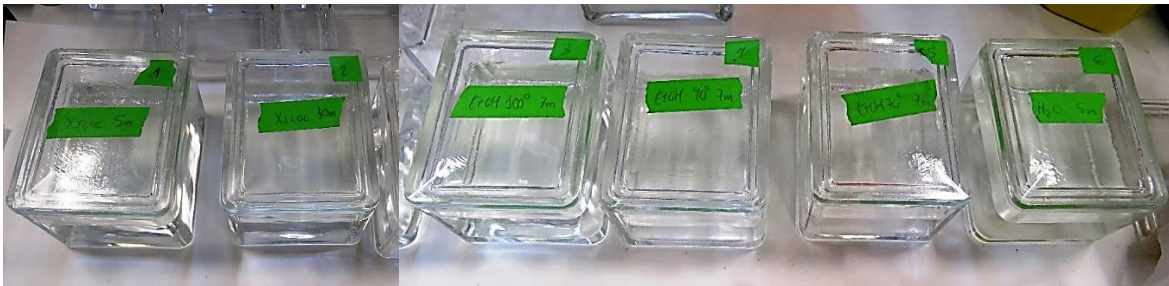


Figura 15 Creación de bloque y sección de parafina.

- 6. Desparafinado y rehidratación:** previamente a la ejecución del proceso de tinción, las muestras tuvieron que ser desparafinadas y rehidratadas a través de concentraciones decrecientes de etanol a partir de 100° (Tabla N° 5).

*Tabla 5 Proceso de desparafinado y rehidratación.*

| Proceso        | Tiempo         |
|----------------|----------------|
| Xilol (x2)     | 15 min         |
| EtOH 100°      | 5 min          |
| EtOH 90°       | 5 min          |
| EtOH 70°       | 5 min          |
| Agua destilada | 5 min (mínimo) |



*Figura 16 Proceso de desparafinado y rehidratación.*

- 7. Tinción histológica:** las funciones principales de la tinción implican resaltar las características importantes del tejido, así como mejorar el contraste del mismo (12,44). En el presente estudio se aplicó la técnica de tinción rutinaria de HE y 2 técnicas de tinción específica (PM y RP).

- **Hematoxilina – eosina (HE)**

Su función es teñir el núcleo de azul o púrpura (12,19) y citoplasma, fibra elástica, colágeno y fibras musculares, en tonos de color rosa (12,19). Se usó hematoxilina de Mayer (Hematoxilina de Mayer; Panreac Química S.L.U.) (45), eosina amarillenta (Panreac Química S.L.U.) (46) y floxina (Panreac Química S.L.U.) siendo éstas las más populares (19,47). La preparación de la solución que finalmente se emplea para la técnica es descrita en la tabla N° 6 y el protocolo de tinción aplicado sobre los cortes histológicos se describe en la tabla N° 7.

Tabla 6 Preparación de Hematoxilina – eosina.

| Compuesto                        | Concentración final |
|----------------------------------|---------------------|
| Eosina amarillenta diluida al 1% | 10%                 |
| Floxina diluida al 1%            | 1%                  |
| EtOH 96°                         | 78%                 |
| Ac. acético                      | 0,40%               |
| Agua destilada                   | 10,6%               |

Tabla 7 Protocolo de tinción Hematoxilina – eosina.

| Proceso   | Tiempo   |
|---|----------|
| 1. Sumergir en solución de HE                                   | 5 min    |
| 2. Lavado en agua corriente (hasta eliminar el exceso de tinte) | 2 min    |
| 3. Sumergir en eosina-floxina                                   | segundos |
| 4. Lavado en agua corriente (hasta eliminar el exceso de tinte) | 2 min    |
| 5. Lavado con agua destilada                                    | 5 min    |

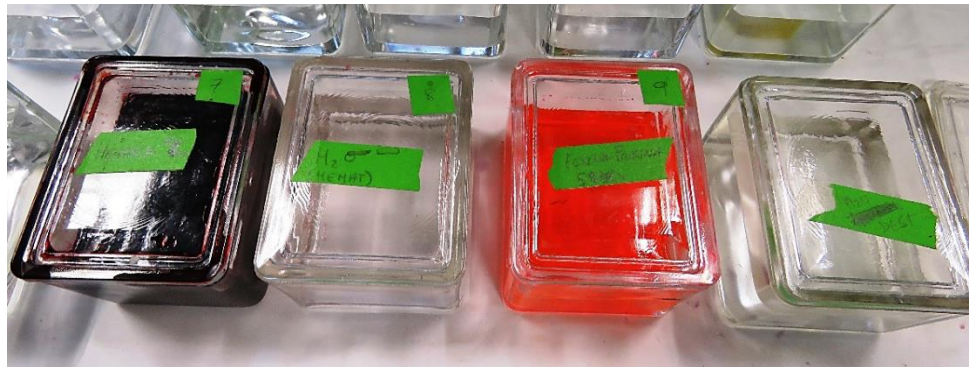




Figura 17 Protocolo de tinción Hematoxilina – eosina.


- **Pentacrómico de Movat (PM)**

Se usó el Kit de tinción de Pentacromo de Movat - Russell-Movat modificado (Movat Pentachrome Stain Kit, modified Russell-Movat; ScyTek Laboratories Inc., Utah, EE.UU.) (48), diseñado para uso en la demostración histológica

de colágeno, elastina, músculo, mucina y fibrina en secciones de tejido (48). Se siguió las instrucciones del protocolo adjunto con el kit, las que son descritas en la tabla N° 8.

Tabla 8 Protocolo de tinción Pentacrómico de Movat.

| <b>Proceso</b>   |  |
|--|--|
| <p>1. Preparar la solución WES: Hematoxylin (5%) + Ferric chloride (10%) + Lugol's Iodine (en proporción 2:1:1).</p> |    |
| <p>2. Añadir WES 20 min.</p>   |  |
| <p>3. Lavar el exceso en agua corriente.</p>   |  |
| <p>4. Añadir Ferric Chloride (2%) y dejar unos segundos hasta que claree el color oscuro.</p>                        |  |
| <p>5. Lavar con agua corriente.</p>  |  |
| <p>6. Comprobar en microscopio si se han teñido las fibras elásticas. Si no ha sido así, repetir el paso 4.</p>      |  |
| <p>7. Lavar en agua destilada (x2).</p>  |  |
| <p>8. Añadir Sodium Thiosulfate Solution (5%) e incubar 1 min.</p>   |  |
| <p>9. Lavar en agua corriente 2 min y luego en agua destilada 2 veces.</p>   |  |
| <p>10. Añadir Acetic Acid Solution (3%) e incubar 2 min.</p>   |  |

|  |  |
|--|--|
| <p>11. Sacudir el porta para retirar acético y, sin lavar, añadir Alcian Blue Solution (pH=2,5) e incubar 25 min.</p>                                |  |
| <p>12. Lavar en agua corriente 2 min y luego en agua destilada 2 veces.</p>  |  |
| <p>13. Añadir Biebrich Scarlet / Acid Fuchsin Solution e incubar 10 min.</p>   |  |
| <p>14. Lavar en agua destilada 2 veces.</p>  |  |
| <p>15. Añadir Acetic Acid Solution (1%) e incubar 5-10 seg. con agitación.</p>   |  |
| <p>16. Lavar rápidamente en agua destilada.</p>  |  |
| <p>17. Añadir Phosphotungstic Acid Solution (5%) e incubar 3-7 min. (x2).</p>  |  |
| <p>18. Observar al microscopio. El colágeno debe aparecer claro pero las fibras elásticas deben estar teñidas. Si no es así, repetir el paso 17.</p> |  |
| <p>19. Lavar rápidamente en agua destilada.</p>  |  |
| <p>20. Añadir Acetic Acid Solution (1%) y que corra por las secciones.</p>   |  |
| <p>21. Sacudir bien el porta y, sin lavar, añadir Metanil Yellow Solution (1%) e incubar 15 min.</p>   |  |
| <p>22. Lavar en EtOH 100° (x3)</p>   |  |

- **Rojo Picrosirius (RP)**

Se usó el kit de tinción Rojo Picrosirius - tinción de tejido conectivo (Picrosirius red stain kit; Abcam, Cambridge, Reino Unido) (49), diseñado para su uso en la visualización histológica de las fibras de colágeno I y III, además del músculo en las secciones de tejido (49). El protocolo usado se aprecia en la tabla N° 9.

Tabla 9 Protocolo de tinción Rojo Picrosirius.

| Proceso                       | Tiempo     |
|-------------------------------|------------|
| 1. Sumergir en solución de RP | 1h         |
| 2. Ácido acético al 5% (x2)   | 5 segundos |
| 3. EtOH 100° (x2)             | 15 min     |

8. **Deshidratación, lavado y fijación del cubreobjetos** al finalizar los procesos de tinción los cortes histológicos pasaron nuevamente por un procedimiento de deshidratación, lavado con xilol y fijación del cubreobjetos para su conservación, observación microscópica y almacenamiento.

Tabla 10 Proceso de deshidratación - lavado - fijación del cubreobjetos.

| Proceso   | Tiempo |
|---|--------|
| EtOH 70°  | 5 min  |
| EtOH 80°  | 5 min  |
| EtOH 90°  | 5 min  |
| EtOH 100°   | 5 min  |
| Lavar con Xilol (x3)  | 15 min |
| Fijación del cubreobjetos*  | -      |
| * Medio de montaje (Vitro-Clud ®; R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Alemania). |        |

## 5. PROCEDIMIENTO DE RECOLECCIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS

Al concluir las etapas de preparación de las muestras, se continuó con la fase de recopilación de datos a través de un método directo en el Laboratorio de Investigación de la Universidad Complutense de Madrid.

Las secciones de tejidos en los portaobjetos fueron visualizadas y fotografiadas con la ayuda de un microscopio Leica DMR con cámara digital Leica DFC 320 y programa LAS EZ asociado (Leica Geosystems AG, St. Gallen, Suiza), el cual permitió la observación microscópica y la comparación de la calidad de las muestras. Cabe mencionar, que en el caso de los portaobjetos procesados con tinción de RP; adicionalmente, para el registro de las fotografías, se usó filtro de luz polarizada incorporada en el microscopio.

En el caso del estudio de validez de un método de descalcificación, tras la evaluación de las imágenes, los resultados se expresaron en una escala ordinal y se consignaron en una

matriz de datos. Esta escala consideró 3 resultados para valorar el tiempo de descalcificación, eliminación completa de calcio y conservación morfológica después del uso de los 3 agentes descalcificadores, siendo:

- **Tiempo de descalcificación (velocidad)** Teniendo como referencia el largo tiempo de descalcificación de la solución gold estándar, EDTA (aprox. 1 año) y el grosor de las muestras de tejido óseo (mandíbula de perro aprox. 10 mm) se planteó la siguiente escala:
  - **Eficiente** (< 5 meses) Calificada con +++
  - **Aceptable** (5-9 meses) Calificada con ++
  - **Poco eficiente** ( $\geq 1$  año) Calificada con +
- **Eliminación completa de calcio**
  - **Eficiente** (eliminación completa de calcio) Calificada con +++
  - **Aceptable** (eliminación incompleta de calcio) Calificada con ++
  - **Poco eficiente** (mínima eliminación de calcio) Calificada con +
- **Conservación morfológica** evaluada mediante la no alteración de la tinción histológica.
  - **Buena integridad** (adecuada tinción de estructuras morfológicas de acuerdo al tipo de solución empleada, ausencia o mínima presencia de artefactos). Calificada con +++
  - **Moderada integridad** (leve alteración de la tinción de estructuras morfológicas de acuerdo al tipo de solución empleada, presencia de artefactos). Calificada con ++
  - **Inaceptable** (pérdida de morfología, ausencia de tinción de estructuras morfológicas y presencia de artefactos). Calificada con +

El estudio de validez de un método de tinción de muestras para el análisis del tejido óseo se realizó a través de la observación, comparación y descripción de las características de tinción de las 3 técnicas empleadas, destacando los diferentes contrastes de colores de cada estructura histológica y los procesos de biología ósea que podrían ser estudiados con cada una de ellas; analizando así, la eficacia de la tinción base de HE y tinciones específicas de PM y RP.

De este modo, la visualización de colores fue interpretada en función a la técnica de tinción, tal como se observa en las tablas N° 11, 12 y 13.

- **Hematoxilina – eosina (HE) (45,46)**

Tabla 11 Interpretación de tinción con Hematoxilina-eosina.

|                     | <b>Estructura</b> | <b>Color</b>   |
|---------------------|-------------------|----------------|
| <b>Hematoxilina</b> | Núcleos           | Azúl / púrpura |
| <b>Eosina</b>       | Citoplasma        | Rosa           |

- **Pentacrómico de Movat (PM) (48)**

Tabla 12 Interpretación de tinción con Pentacrómico de Movat.

| <b>Estructura</b>  | <b>Color</b>      |
|--------------------|-------------------|
| Fibras elásticas   | Azul oscuro-negro |
| Núcleos celulares  | Azul / negro      |
| Colágeno           | Naranja a rojo    |
| Fibras reticulares | Amarillo          |
| Mucina             | Azul brillante    |
| Fibrina            | Rojo brillante    |
| Músculo            | Rojo              |

- **Rojo Picrosirius (RP) (49)**

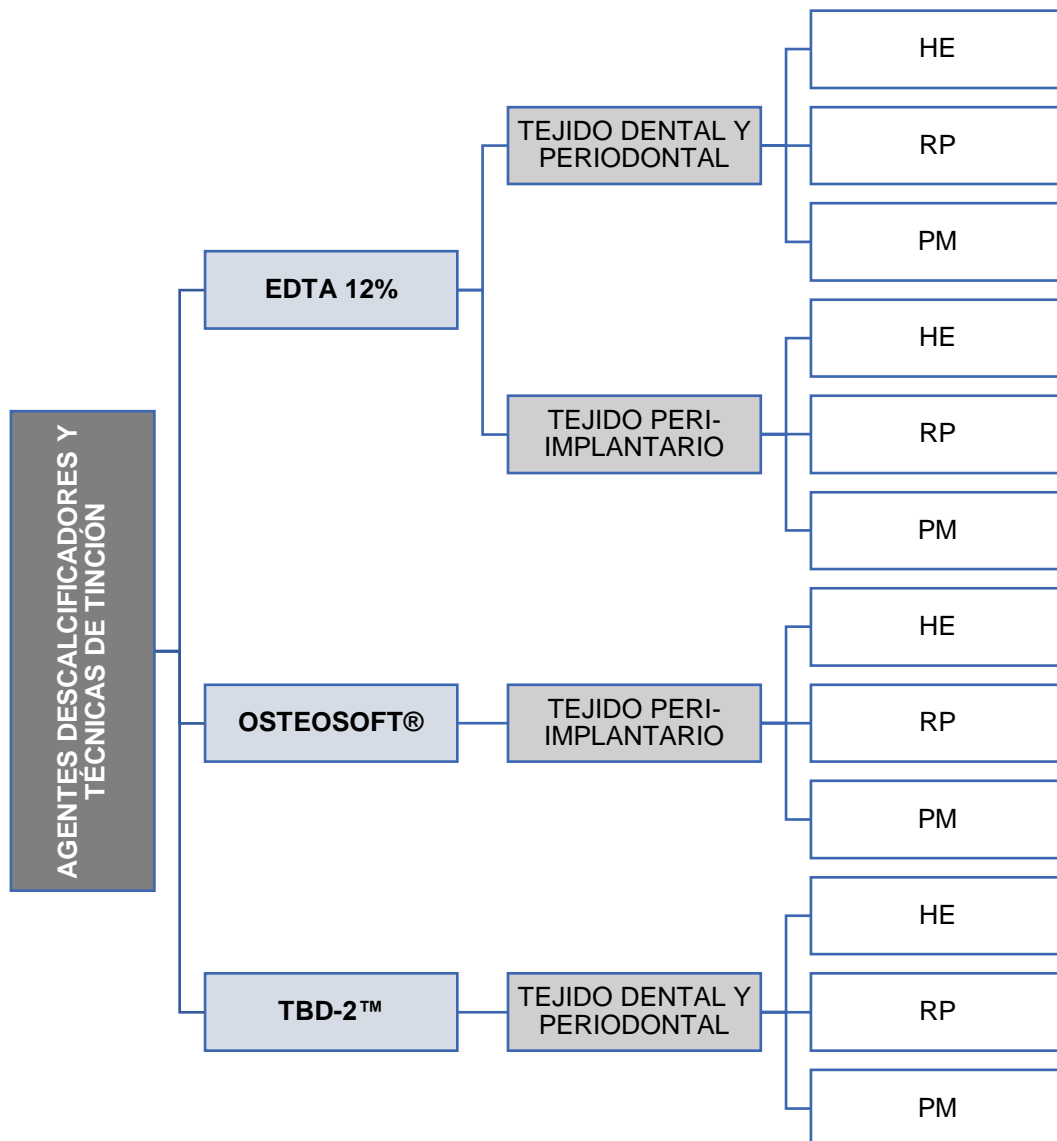
Tabla 13 Interpretación de tinción con Rojo Picrosirius.

|  | <b>Estructura</b>          | <b>Color</b>                      |
|--|----------------------------|-----------------------------------|
| <b>Microscopía de luz</b>  | Colágeno                   | Rojo                              |
|  | Fibras musculares          | Amarillo                          |
|  | Citoplasma                 | Amarillo                          |
| <b>Microscopía de luz polarizada</b>   | Tipo I (fibras gruesas)    | Birrefringencia* amarillo-naranja |
|  | Tipo III (fibras delgadas) | Birrefringencia* verde            |
| *Birrefringencia = cualidad de birrefringente (que produce doble refracción de un rayo de luz). RAE. |                            |                                   |

## RESULTADOS

Al finalizar la técnica de procesamiento de muestras se obtuvo un total de 12 láminas portaobjetos, procesadas con 3 agentes descalcificadores distintos y con 3 técnicas de tinción histológica, revelando los resultados redactados en el presente apartado.

Tabla 14 Esquematización de las 12 láminas portaobjetos.



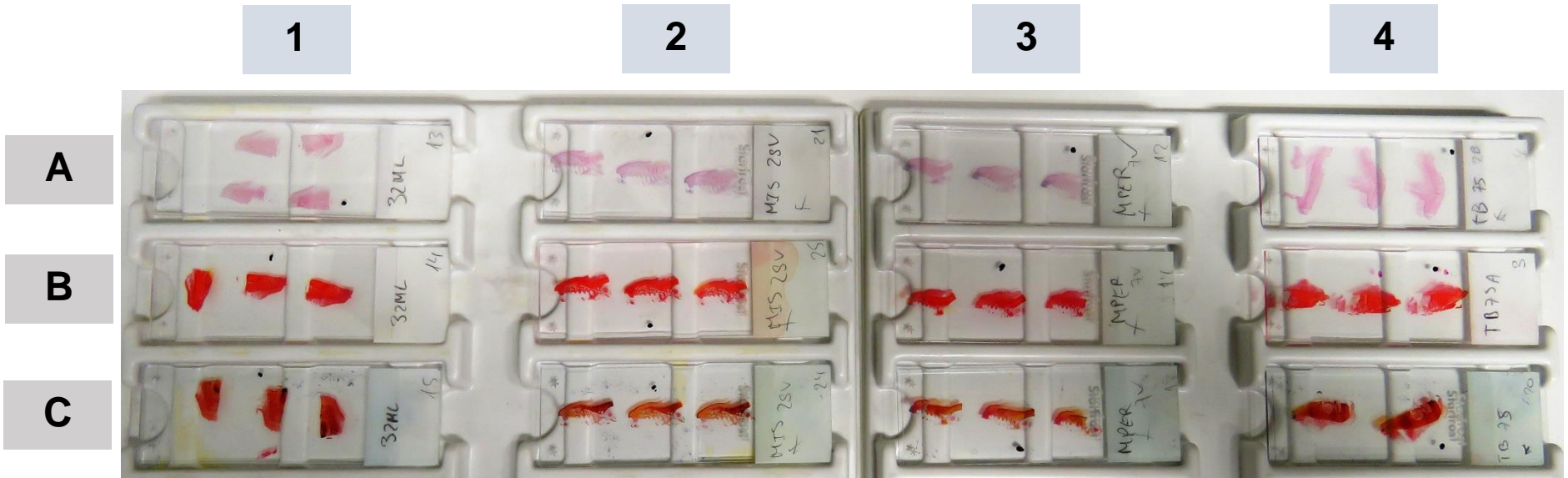


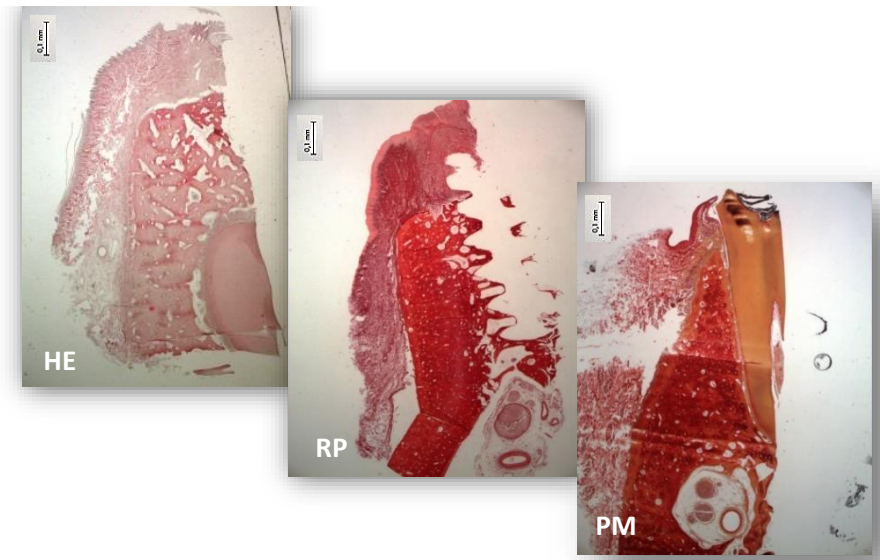
Figura 18 Láminas portaobjetos con cortes histológicos finalmente procesados.

#### AGENTES DESCALCIFICADORES EMPLEADOS

- (1) EDTA 12%: corte histológico con tejido dental y periodontal.
- (2) EDTA 12%: corte histológico con tejido peri-implantario.
- (3) Osteosoft©: corte histológico con tejido peri-implantario.
- (4) TBD-2™: corte histológico con tejido dental y periodontal.

#### TÉCNICAS DE TINCIÓN REALIZADAS

- (A) Tinción con Hematoxilina eosina (HE).
- (B) Tinción con Rojo Picrosirius (RP).
- (C) Tinción con Pentacrómico de Movat (PM).



# 1. ESTUDIO DE VALIDEZ DE UN MÉTODO DE DESCALCIFICACIÓN

## 1.1. TIEMPO DE DESCALCIFICACIÓN

Los dos productos comerciales reflejaron mejores características en la velocidad de descalcificación en comparación con la solución gold estándar; apreciándose que el agente descalcificador TBD-2™, cuya formulación está basada en ácido fórmico, brindó mayor velocidad (7 semanas); seguido del Osteosoft© basado en EDTA (7 meses) y por último el EDTA 12% (14 meses), siendo estos resultados valorados en la tabla N° 15.

## 1.2. ELIMINACIÓN COMPLETA DE CALCIO

Las actividades de experimentación con el uso de fragmentos de mandíbula de perro de aproximadamente 10 mm de grosor confirmaron que el tamaño de las muestras fueron un inconveniente para el proceso convencional de descalcificación; al tratarse de muestras de mayor tamaño a las clásicamente procesadas, se evidenció que los tiempos de descalcificación con los 3 agentes utilizados resultó insuficiente para la eliminación completa de calcio; debido a que, la zona interna de los fragmentos siguió conservando su característica de dureza propia del tejido óseo ofreciendo resistencia durante el proceso de corte o sección, teniéndose que poner en contacto el bloque de parafina con la solución descalcificadora Histofix® aproximadamente 1 h con la finalidad de continuar la descalcificación y proseguir con la sección de la muestra para la obtención de cintas de 7 µm de grosor. Los resultados son valorados en la tabla N° 15.

## 1.3. CONSERVACIÓN MORFOLÓGICA

El uso de los 3 agentes (EDTA 12%, TBD-2™ y Osteosoft©) con distintos tiempos de descalcificación, permitió la obtención de cortes histológicos teñidos bajo 3 técnicas de tinción (HE, PM y RP) sin producir daño al tejido que conlleve a la pérdida de integridad de las estructuras morfológicas. (Fig. 19)

La intensidad del color de las 3 técnicas de tinción fue ligeramente menor posterior a la descalcificación con TBD-2™; sin embargo, esta diferencia no afectó la visualización de las estructuras morfológicas. Adicionalmente; se observó un mayor colapso (separación) de la interfaz del tejido conectivo – tejido óseo con el Osteosoft© y menor con el TBD-2™ y EDTA 12% (Fig. 20). En general, el agente descalcificador que permitió una mejor conservación morfológica fue el EDTA 12% y TBD-2™ calificada como buena integridad, siendo menor

con Osteosoft® calificada como moderada integridad, como se aprecia en la tabla N° 15 y en las figuras N° 21 – 25.

## 2. ESTUDIO DE VALIDEZ DE UN MÉTODO DE TINCIÓN

Las tinciones específicas como PM y RP han reflejado mayor eficacia al brindar una visión más específica de los distintos elementos tisulares y las diferentes estructuras citoplasmáticas al microscopio, en comparación con la coloración dicrómica de HE que ofrece una visión más general.

### 2.1. TINCIÓN CON HEMATOXILINA EOSINA (HE)

Las tinciones histológicas con HE posterior a la descalcificación con los 3 agentes reflejaron la tinción dicrómica de las estructuras morfológicas, observándose:

- **Región Epitelial:** los 3 cortes histológicos descalcificados en EDTA 12%, Osteosoft® y TBD-2™ permitieron visualizar las papilas coriales y las papilas dérmicas del epitelio y tejido conectivo, respectivamente; siendo los núcleos celulares teñidos de púrpura/azul y el citoplasma de rosa. (Fig. 21)
- **Región de transición tejido conectivo – tejido óseo:** el tejido conectivo o conjuntivo fue observado en los 3 cortes histológicos como una red de células y fibras de colágeno en color rosa claro en continuidad con el tejido óseo. (Fig. 22)
- **Región de tejido óseo:** el hueso se presentó como una estructura de color rosa oscuro, apreciándose una variación de tonalidad entre los 3 agentes descalcificadores. No obstante, se pudo distinguir claramente las osteonas y otros componentes del tejido duro. (Fig. 23)
- **Zona de cámara de curación (tejido peri-implantario):** la técnica de tinción HE aplicada en los cortes histológicos descalcificados con EDTA 12% y Osteosoft®, permitió observar la formación ósea que se extiende desde las zonas laterales del hueso “viejo” hacia la invaginación de la cámara de curación en color rosado oscuro y tejido trabecular rodeando estructuras vasculares en color rosado claro. (Fig. 24)
- **Región de tejido periodontal:** la aplicación de HE en los cortes histológicos con EDTA 12% y TBD-2™ permitió diferenciar en ambos casos las estructuras de cemento, dentina, hueso (visualización de osteonas características), teñidos

en color rosa oscuro y ligamento periodontal en color rosa claro; así mismo, los núcleos celulares en color azul/púrpura. (Fig. 25)

## 2.2. TINCIÓN CON ROJO PICROSIRIUS (RP)

Las tinciones histológicas con RP posterior a la descalcificación con los 3 agentes determinaron la presencia de colágeno.

- **Región Epitelial:** los 3 cortes histológicos descalcificados en EDTA 12%, Osteosoft© y TBD-2™ permitieron visualizar las papilas coriales y las papilas dérmicas del epitelio y tejido conectivo, respectivamente; observándose que sin luz polarizada (SLP) el citoplasma tomó un color amarillo y las fibras colágenas del tejido conectivo se colorearon en tonalidades rojizas; mientras que con luz polarizada (CLP) se apreció birrefringencia con color rojo brillante del tejido conectivo y la ausencia de la región epitelial. (Fig. 21)
- **Región de transición tejido conectivo – tejido óseo:** la zona de continuidad entre el tejido conectivo y el tejido óseo SLP se conformó por fibras colágenas y matriz ósea teñidas en tonos rojizos y CLP estas estructuras adquirieron birrefringencia con color rojo brillante. (Fig. 22)
- **Región de tejido óseo:** en los 3 cortes histológicos, el hueso se observó SLP como una estructura compacta en tonalidades rojizas y CLP las fibras de colágeno alrededor de los sistemas de Havers mostraron birrefringencia con colores que variaron de amarillo a naranja o verde, encontrándose actualmente en controversia que los colores polarizados de la tinción con RP dependerían solo del grosor de la fibra y del empaquetamiento y no de la composición del tipo de colágeno I y III. (Fig. 23)
- **Zona de cámara de curación (tejido peri-implantario):** esta técnica de tinción aplicada en los cortes histológicos descalcificados con EDTA 12% y Osteosoft©, permitió ver el proceso de formación ósea SLP mediante la presencia de tejido trabecular y zonas de colágeno en tonalidades rojizas y CLP a través de birrefringencia de color rojo representando la orientación del colágeno. (Fig. 24)
- **Región de tejido periodontal:** la aplicación de RP en los cortes histológicos con EDTA 12% y TBD-2™ permitió diferenciar SLP las estructuras de cemento, dentina, hueso (visualización de osteonas características) y ligamento periodontal teñidos en tonos rojizos; mientras que CLP se notó la birrefringencia en color rojo y verde. (Fig. 25)

### 2.3. TINCIÓN CON PENTACRÓMICO DE MOVAT (PM)

Las tinciones histológicas con PM posterior a la descalcificación con los 3 agentes reflejaron tinción policrómica.

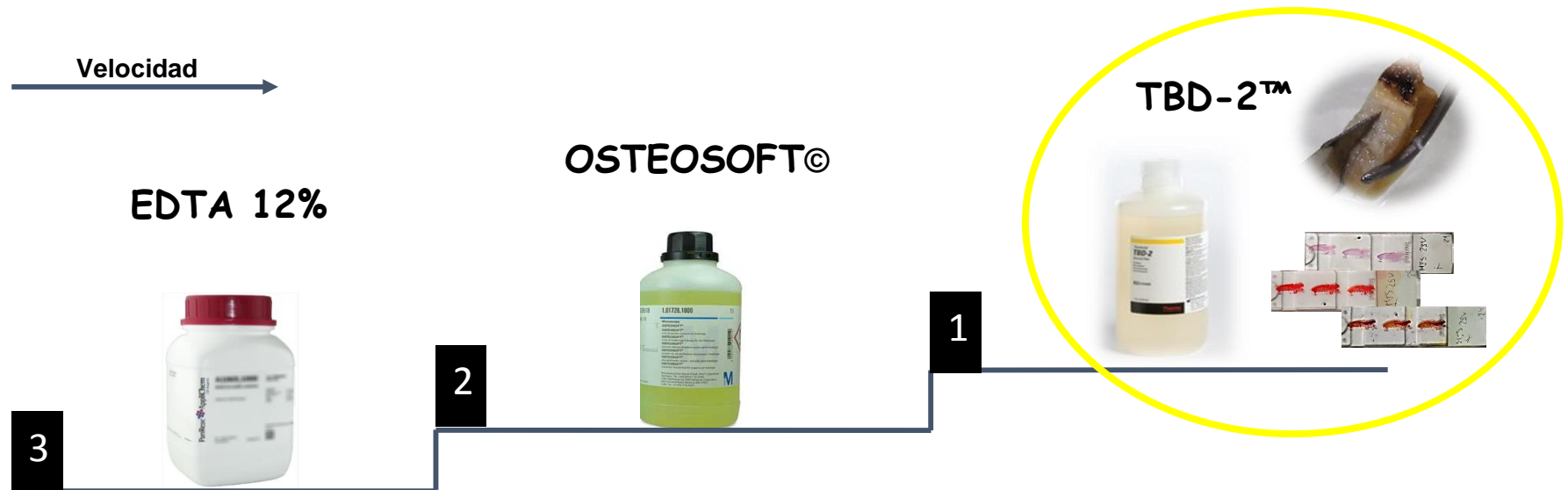
- **Región Epitelial:** los 3 cortes histológicos descalcificados en EDTA 12%, Osteosoft© y TBD-2™ permitieron visualizar las papilas coriales y las papilas dérmicas del epitelio y tejido conectivo, respectivamente; siendo el epitelio teñido en color rojo oscuro; núcleos celulares, azul/negro; colágeno, naranja a rojo; fibras reticulares, amarillo. (Fig. 21)
- **Región de transición tejido conectivo – tejido óseo:** se observó la continuidad de las fibras reticulares, color amarillo y fibras colágenas, color rojo del tejido conectivo con el tejido óseo. (Fig. 22)
- **Región de tejido óseo:** en los 3 cortes histológicos, se pudo diferenciar el hueso maduro o mineralizado de color amarillo oscuro, osteoides bien organizados rodeados totalmente de color rojo y la formación de osteoides nuevos rodeados parcialmente de tinción roja. (Fig. 23)
- **Zona de cámara de curación (tejido peri-implantario):** esta técnica de tinción aplicada en los cortes histológicos descalcificados con EDTA 12% y Osteosoft©, permitió el análisis detallado de la progresión de la curación ósea a través de la tinción policrómica de las estructuras morfológicas, estableciendo una demarcación clara de nuevos osteoides (color rojo) y hueso mineralizado (color amarillo). La etapa de aposición ósea a través de manchas de color rojo. (Fig. 24)
- **Región de tejido periodontal:** la aplicación de PM en los cortes histológicos con EDTA 12% y TBD-2™ permitió diferenciar las estructuras de dentina en tonalidades amarillo-naranja; cemento y hueso, naranja con matices de colágeno en color rojo; ligamento periodontal, conformado por fibras reticulares (amarillo) y colágeno (rojo); así mismo, los núcleos celulares en color azul/negro. (Fig. 25)

Tabla 15 Resultados del estudio de validez de un método de descalcificación.

| VARIABLES                      |               | EDTA 12%        | Osteosoft©     | TBD-2™                  |
|--------------------------------|---------------|-----------------|----------------|-------------------------|
|                                |               | Agente quelante | Basado en EDTA | Basado en ácido fórmico |
| TIEMPO                         | VELOCIDAD     | +               | ++             | +++                     |
| ELIMINACIÓN COMPLETA DE CALCIO | PRUEBA FÍSICA | ++              | ++             | ++                      |
| CONSERVACIÓN MORFOLÓGICA       | HE, PM, RP    | +++             | ++             | +++                     |

(HE) = Hematoxilina – eosina; (PM) = Pentacrómico de Movat; (RP) = Rojo Picrosirius.  
 (+) = Poco eficiente / inaceptable; (++) = Aceptable / Moderada integridad; (+++) = Eficiente / Buena integridad.

33



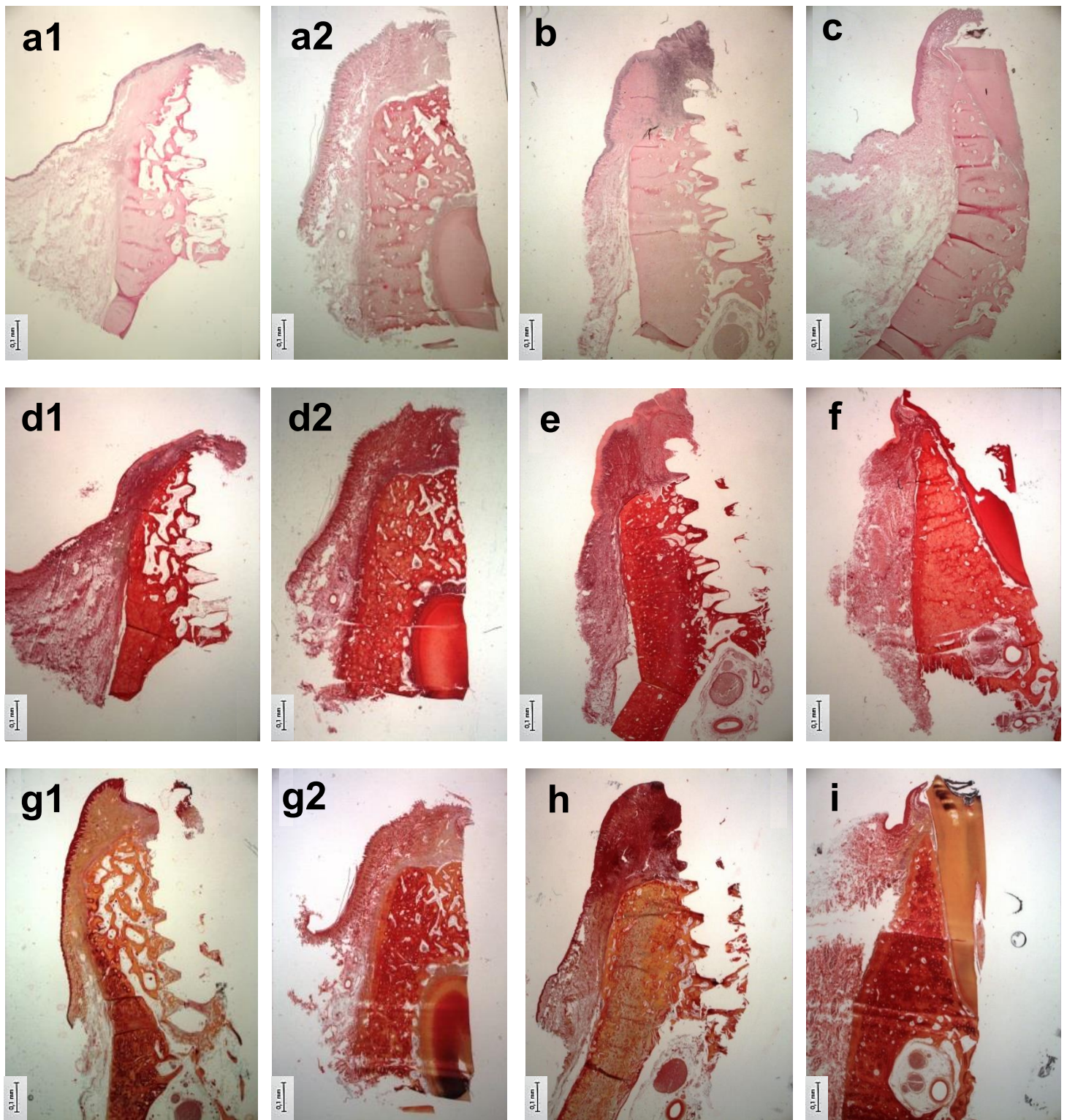


Figura 19 Visión general de los cortes histológicos procesados con 3 agentes descalcificadores y 3 técnicas de tinción.

(a) EDTA 12% + HE: 1 (tejido peri-implantario) y 2 (tejido dental y periodontal); (b) Osteosoft© + HE; (c) TBD-2™ + HE; (d) EDTA 12% + RP: 1 (tejido peri-implantario) y 2 (tejido dental y periodontal); (e) Osteosoft© + RP; (f) TBD-2™ + RP; (g) EDTA 12% + PM: 1 (tejido peri-implantario) y 2 (tejido dental y periodontal); (h) Osteosoft© + PM; (i) TBD-2™ + PM.

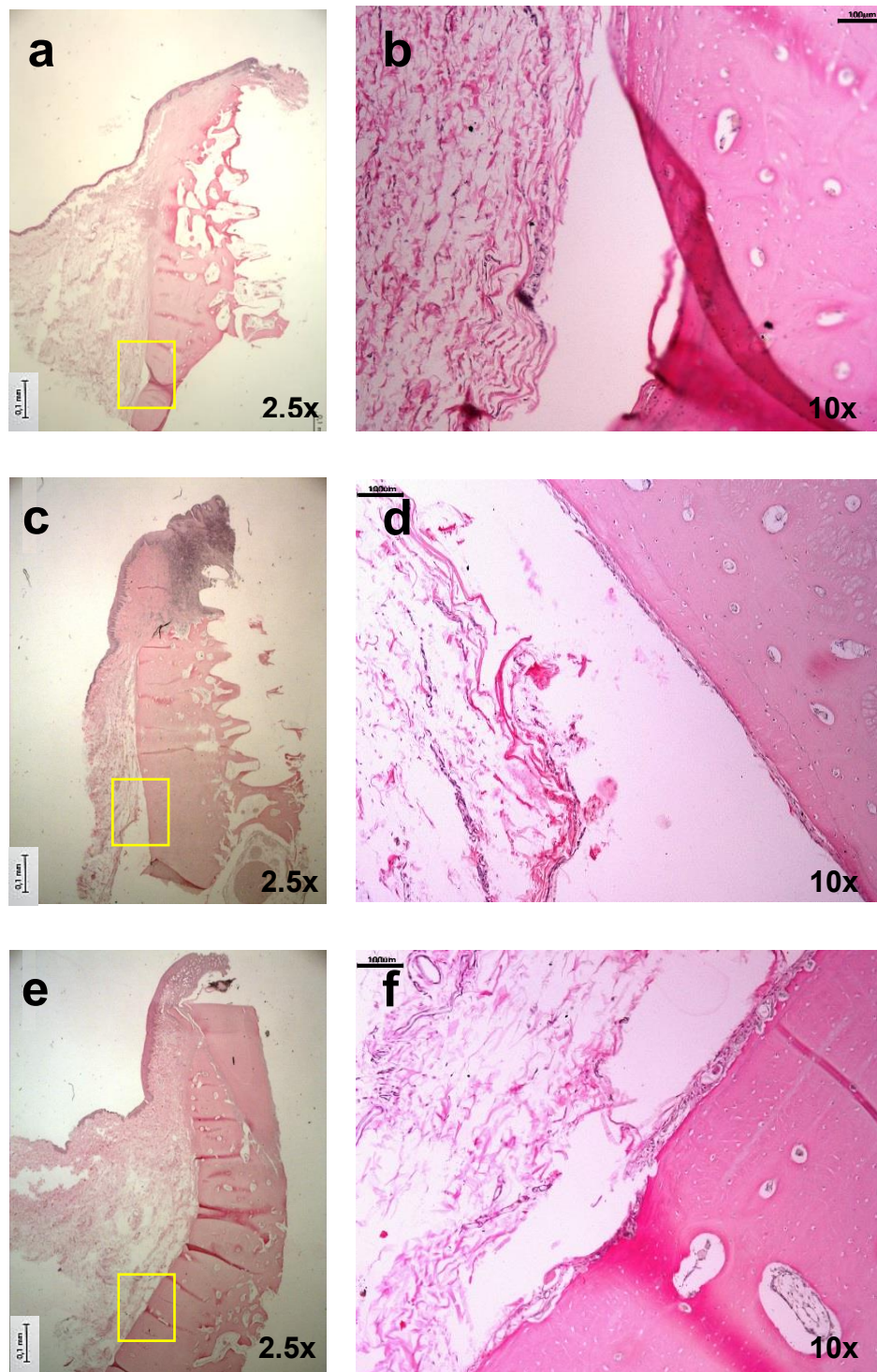


Figura 20 Colapso de la interfaz del tejido conectivo – tejido óseo.

Vista 2.5x de cortes histológicos procesados con 3 agentes descalcificadores: **(a)** EDTA 12%; **(c)** Osteosoft® y **(e)** TBD-2™. Magnificación 10x en la cual se evidencia a detalle el mayor colapso en los cortes histológicos que fueron descalcificados con **(d)** Osteosoft® y menor en **(b)** EDTA 12% y **(f)** TBD-2™.

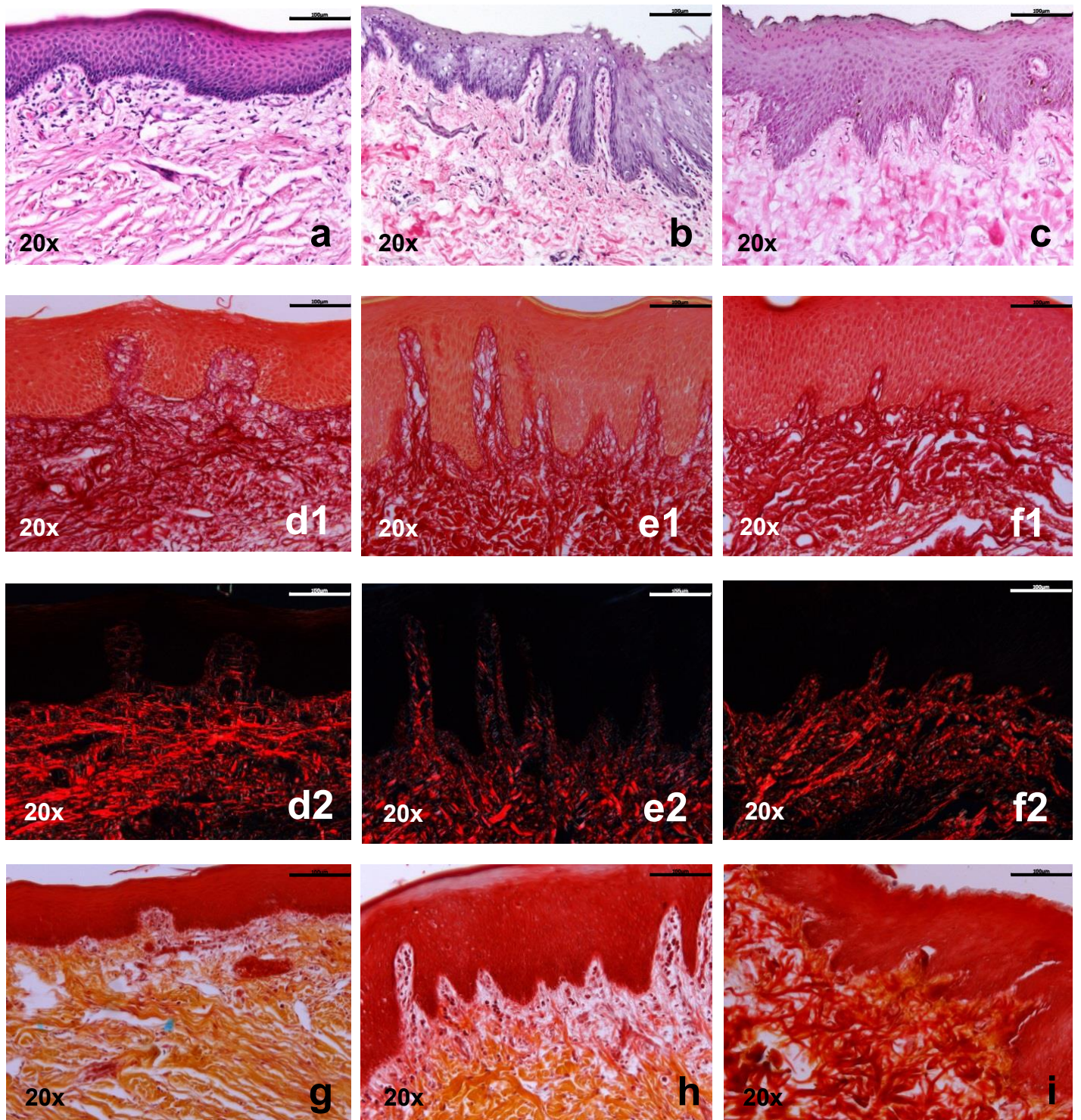


Figura 21 Comparación de cortes histológicos procesados con diferentes métodos de descalcificación y tinción a nivel de región epitelial.

(a) EDTA 12% + HE; (b) Osteosoft© + HE; (c) TBD-2™ + HE; (d) EDTA 12% + RP: 1 (SLP) y 2 (CLP); (e) Osteosoft© + RP: 1 (SLP) y 2 (CLP); (f) TBD-2™ + RP: 1 (SLP) y 2 (CLP); (g) EDTA 12% + PM; (h) Osteosoft© + PM; (i) TBD-2™ + PM. Nótese las proyecciones de las papilas dérmicas y los núcleos teñidos según corresponda al tipo de tinción empleada.

SLP (sin luz polarizada); CLP (con luz polarizada).

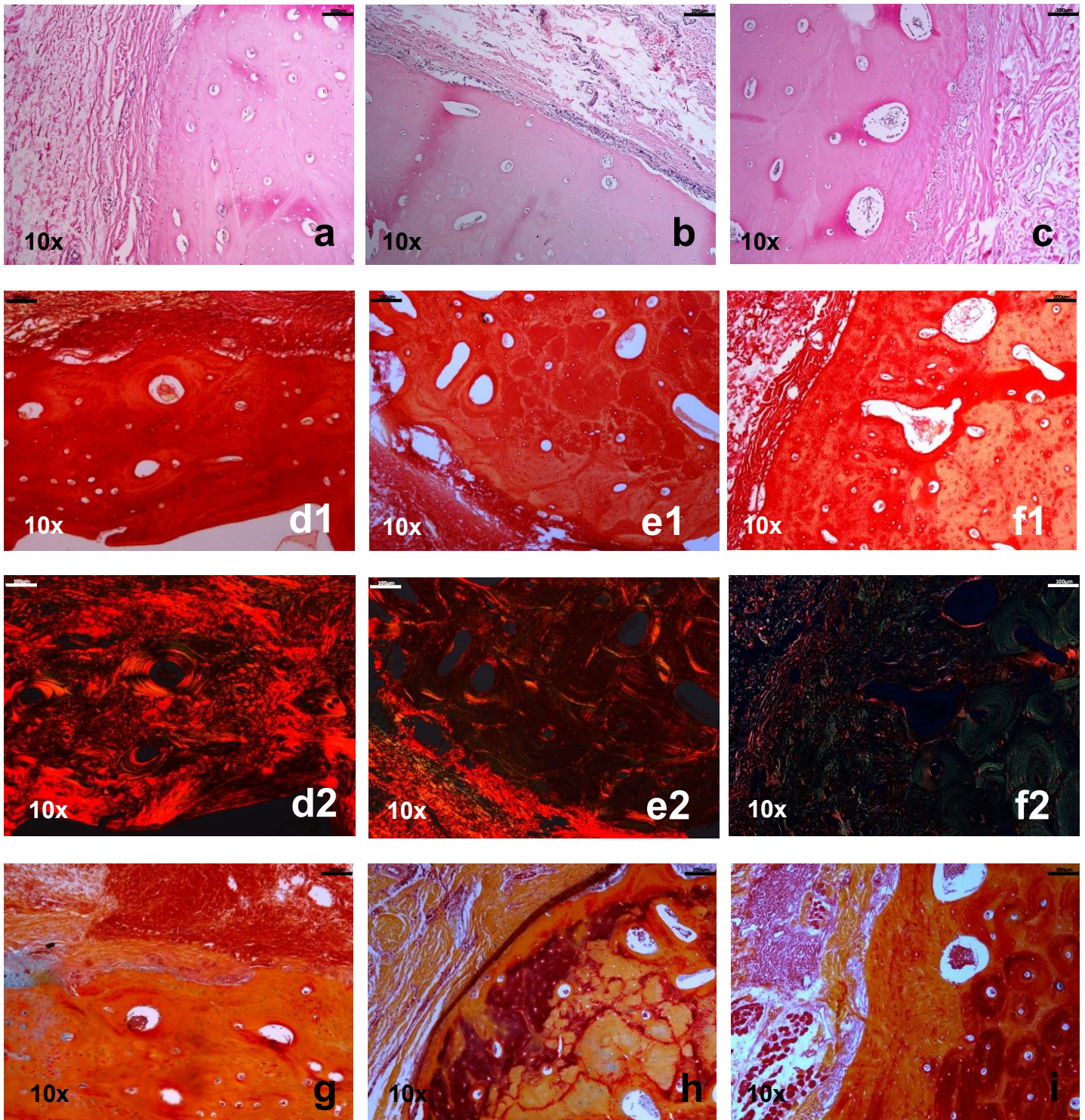


Figura 22 Comparación de cortes histológicos procesados con diferentes métodos de descalcificación y tinción a nivel de región de transición tejido conectivo - tejido óseo.

(a) EDTA 12% + HE; (b) Osteosoft® + HE; (c) TBD-2™ + HE; (d) EDTA 12% + RP: 1 (SLP) y 2 (CLP); (e) Osteosoft® + RP: 1 (SLP) y 2 (CLP); (f) TBD-2™ + RP: 1 (SLP) y 2 (CLP); (g) EDTA 12% + PM; (h) Osteosoft® + PM; (i) TBD-2™ + PM. Se observa generalmente continuidad de la interfaz tejido conectivo - tejido óseo.

SLP (sin luz polarizada); CLP (con luz polarizada).

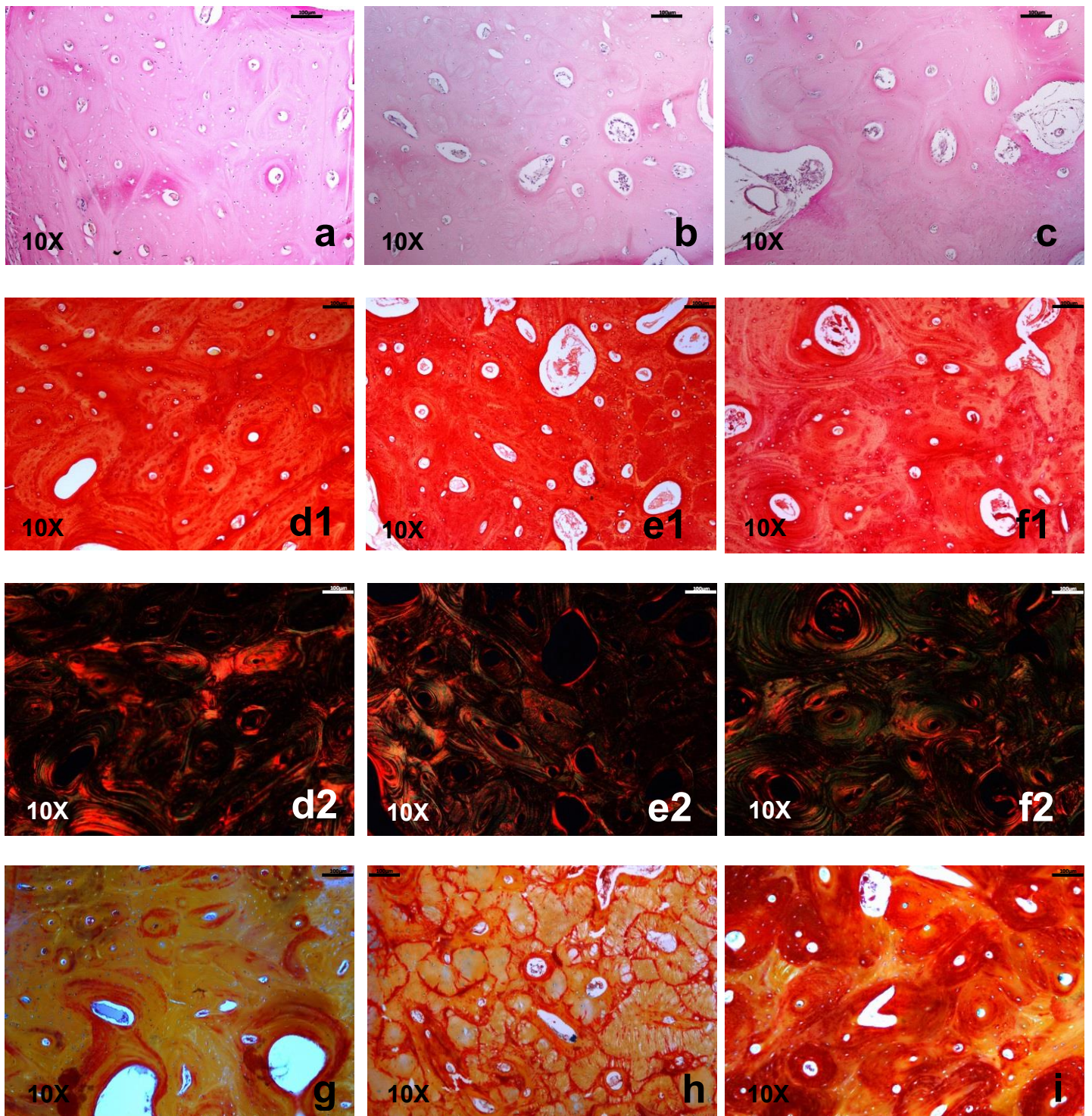


Figura 23 Comparación de cortes histológicos procesados con diferentes métodos de descalcificación y tinción a nivel de región de tejido óseo.

(a) EDTA 12% + HE; (b) Osteosoft® + HE; (c) TBD-2™ + HE; (d) EDTA 12% + RP: 1 (SLP) y 2 (CLP); (e) Osteosoft® + RP: 1 (SLP) y 2 (CLP); (f) TBD-2™ + RP: 1 (SLP) y 2 (CLP); (g) EDTA 12% + PM; (h) Osteosoft® + PM; (i) TBD-2™ + PM. Nótese la conformación de las osteonas características del tejido (HE), con RP (CLP) mediante birrefringencia roja/verde y con PM la formación de nuevos osteoides rodeados de tinción roja.

SLP (sin luz polarizada); CLP (con luz polarizada).

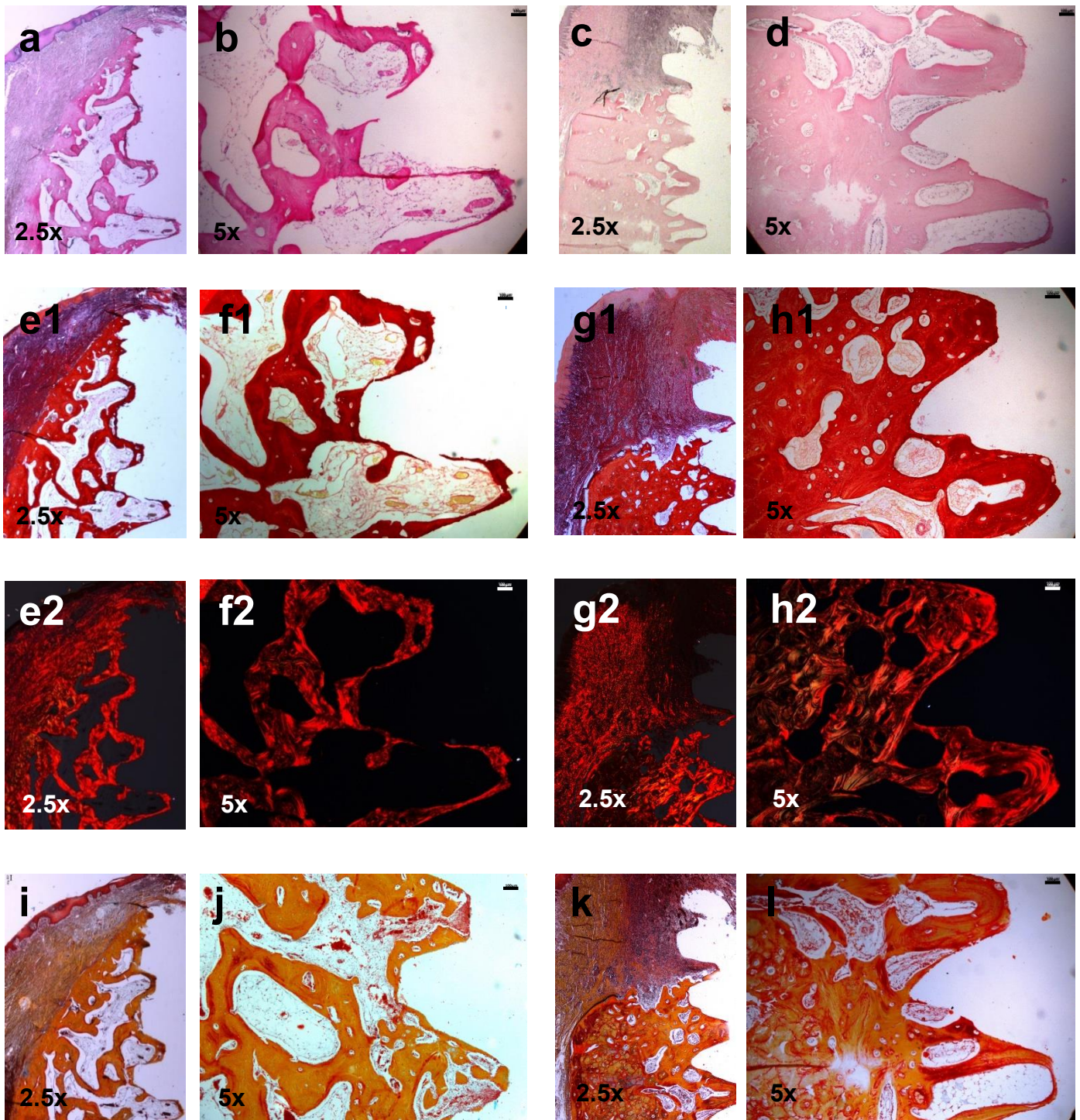


Figura 24 Comparación de cortes histológicos procesados con diferentes métodos de descalcificación y tinción a nivel de cámara de curación.

Se observa que los cortes histológicos a distintos aumentos han permitido observar el proceso de curación ósea: **(a)** EDTA 12% + HE; **(b)** Detalle de (a); **(c)** Osteosoft® + HE; **(d)** Detalle de (c); **(e)** EDTA 12% + RP: 1 (SLP) y 2 (CLP); **(f)** Detalle de (e): 1 (SLP) y 2 (CLP); **(g)** Osteosoft® + RP: 1 (SLP) y 2 (CLP); **(h)** Detalle de (g): 1 (SLP) y 2 (CLP); **(i)** EDTA 12% + PM; **(j)** Detalle de (i); **(k)** Osteosoft® + PM; **(l)** Detalle de (k). La técnica de PM ha ofrecido un análisis más detallado en comparación con HE y RP.

SLP (sin luz polarizada); CLP (con luz polarizada).

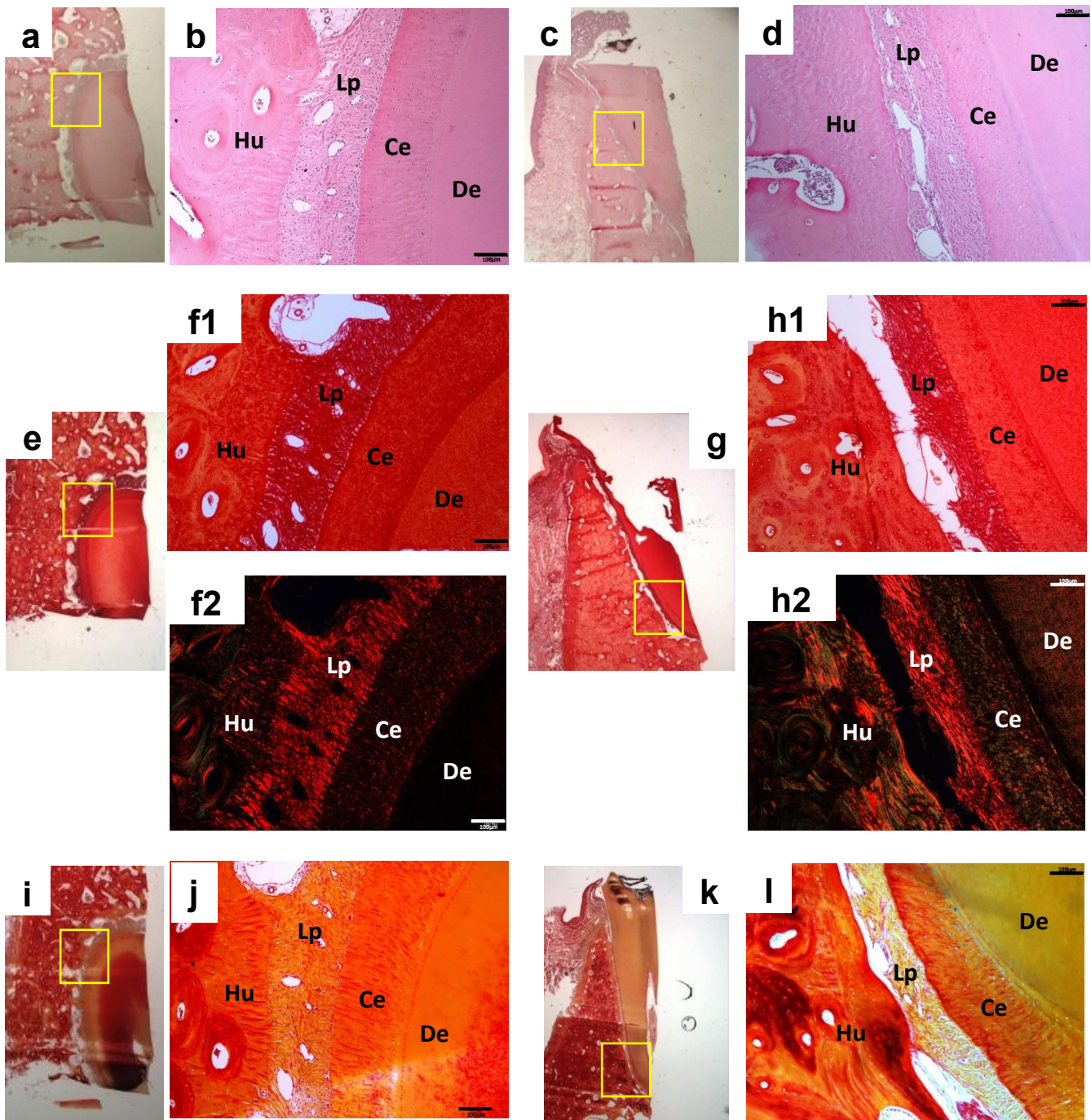


Figura 25 Comparación de cortes histológicos procesados con diferentes métodos de descalcificación y tinción a nivel de región de tejido periodontal.

Nótese que los cortes histológicos a distintos aumentos permiten observar el tejido dental y periodontal, (a) EDTA 12% + HE; (b) Detalle de (a); (c) TBD-2™ + HE; (d) Detalle de (c); (e) EDTA 12% + RP: 1 (SLP) y 2 (CLP); (f) Detalle de (e): 1 (SLP) y 2 (CLP); (g) TBD-2™ + RP: 1 (SLP) y 2 (CLP); (h) Detalle de (g): 1 (SLP) y 2 (CLP); (i) EDTA 12% + PM; (j) Detalle de (i); (k) TBD-2™ + PM; (l) Detalle de (k). Se diferencia (Ce) Cemento; (De) Dentina; (Lp) Ligamento periodontal y (Hu) Hueso teñidos según corresponda al tipo de tinción empleada. (a, c, e, g, i, k) Magnificación 2.5x y (b, d, f, h, j, l) Magnificación 10x.

**SLP (sin luz polarizada); CLP (con luz polarizada).**

## DISCUSIÓN

---

La aplicación de la técnica de procesamiento de muestra es indispensable para preparar el tejido que será evaluado en el análisis histopatológico. La literatura; al día de hoy, revela diferentes métodos que se pueden poner en práctica para lograr los objetivos requeridos.

La inclusión de la muestra en metacrilato/resina es una técnica que cada vez va ganando más adeptos, por las ventajas que ofrecen ante el tipo de muestras que se pretende trabajar, las mismas que traen consigo implantes dentales, dientes u otros fragmentos metálicos y no requieren ser descalcificadas. Sin embargo; sus desventajas como la larga duración del proceso, el impreciso control de la polimerización, el elevado costo, la obtención de pocos cortes para el procesado y la deficiencia en la tinción reportada por algunos autores como Keklikoglu y Akinci, 2013 (11) no la hacen permisible para ciertos proyectos, teniéndose que optar por la técnica tradicional de inclusión en parafina. Si bien es cierto, la parafina tiene el inconveniente de no ser miscible con agua; por este motivo, para que penetre completamente en el tejido óseo necesita que éste pase primero por un proceso de descalcificación y deshidratación. No obstante; se argumenta que la parafina, utilizada como material de inclusión para la histología del diente desmineralizado, es el mejor método para analizar la estructura histológica del diente (11), teniendo también como ventajas su uso fácil y bajo precio.

El paso inicial señalado en los protocolos de preparación de muestras, consiste en la fijación del tejido, con la finalidad de endurecerlos y retrasar la degradación (12); algunos autores como Cotoi y cols 2015, Martín Lacave y García Caballero 2014, señalan que una fijación óptima se lleva a cabo en formaldehído durante 24h. De acuerdo con estos autores, en el presente estudio también se realiza la fijación del tejido con una solución de formol tamponado al 4% con la diferencia de un tiempo de fijación mayor (1 mes) debido al tamaño de las muestras.

Al ser muestras de mandíbula de perro (hueso) es necesario someterlas a un proceso de descalcificación para su posterior inclusión en parafina. Algunos autores han reportado el uso de diferentes agentes descalcificadores como ácido fórmico (Prasad y Donoghue 2013, Singh y cols 2013, Guibas y cols 2014, Savi y cols 2017, Abrantes y cols 2017); ácido nítrico (Pitol y cols 2007, Neves y cols 2011, Prasad y Donoghue 2013, Singh y cols 2013, Savi y cols 2017, Abrantes y cols 2017); ácido nítrico formal (Prasad y Donoghue 2013, Zhai y cols 2014); ácido clorhídrico (Singh y cols 2013); ácido clorhídrico formal (Zhai y cols 2014);

ácido acético (Abrantes y cols 2017); ácido tricloroacético (Neves y cols 2011); EDTA (Pitol y cols 2007, Neves y cols 2011, Prasad y Donoghue 2013, Singh y cols 2013, Guibas y cols 2014, Zhai y cols 2014, Savi y cols 2017, Abrantes y cols 2017); algunos reactivos mixtos como solución de Washawsky (Pitol y cols 2007); líquido de Perenyi (Prasad y Donoghue 2013); solución Morse (Guibas y cols 2014, Abrantes y cols 2017), llegando en la mayoría de los casos a la conclusión que el EDTA fue la mejor opción; a pesar de ello, en ciertas situaciones por limitación de tiempo se recomienda ácido nítrico formal (Prasad y Donoghue 2013); ácido nítrico (Savi y cols 2017, Abrantes y cols 2017) o ácido fórmico (Guibas y cols 2014). En el presente proyecto, considerando la desventaja del tiempo empleado para el método de descalcificación tradicional (EDTA) en muestras de mayor grosor, se realiza un estudio de comparación de 3 agentes, uno con formulación de ácido (TBD-2™) y otros quelantes como EDTA y Osteosoft© (basado en EDTA).

Se sabe que hay factores que intervienen para una rápida descalcificación, los mismos que influyen en el tiempo y la calidad final de las muestras. Kadashetti 2017, describe que el aumento de la concentración del agente descalcificador disminuye el tiempo de descalcificación (20); en este estudio, la concentración de EDTA es preparada al 12%; en el caso de Osteosoft© y TBD-2™ las soluciones son de uso directo, comparándose las formulaciones de los productos sin alteración. Savi y cols 2017, sostienen que el aumento de temperatura acelera la velocidad a la que se lixivia el calcio de un tejido mineralizado (16); frente a ello, se señala que la presente investigación realiza un proceso de descalcificación a través de un método convencional (T° ambiente) y no por microondas. Gül y cols 2014, la agitación aumenta la interacción entre el objeto y la solución de descalcificación y proporciona una tinción uniforme al eliminar los minerales disueltos del tejido (22), en este estudio, la descalcificación con los 3 agentes fue sometida a agitación constante.

La descalcificación permite la sección del tejido por “Fracture technique” reportada por Donath y Breuner 1982, Berglundh 1991 y Vignoletti 2009 para el retiro del implante de las muestras; esta técnica, es empleada en el estudio actual con el mismo objetivo pero adicionalmente para la determinación del punto de descalcificación; sin embargo, se revela que no logra indicar de manera acertada la descalcificación de la zona interna del tejido; reafirmando este resultado el gran reto que representa la descalcificación del tamaño de muestras utilizadas.

En los estudios de Gül y cols 2014, Kapila y cols 2015, Abrantes y cols 2017; se añade a la determinación del punto de descalcificación, la realización de técnicas químicas (test de oxalato) comprobando la descalcificación total a través de la ausencia de precipitados. La presente investigación, considerando el tamaño de muestras empleadas, discrepa con los autores nombrados, y se obvia la realización de dicho test, apoyado en experiencias pasadas en la práctica diaria del laboratorio, donde los resultados al igual que la técnica física empleada, no reflejaron el verdadero estado de descalcificación de la zona interna del tejido.

Entonces, bajo la experiencia de esta investigación, la determinación del punto de descalcificación no resulta precisa para el tamaño de muestras empleadas, siendo necesario, durante el proceso de corte, sumergir el bloque de parafina las veces que sea requerido en solución de Histofix® (contiene EDTA), esta solución actúa como un agente de descalcificación para muestras pequeñas, rápido pero muy agresivo (máximo 2-3 h). Por este motivo; en caso de muestras de mayor tamaño, como son las muestras de este estudio, no se consideran como agente para una descalcificación inicial.

El TBD-2™ como producto comercial basado su formulación en ácido fórmico, se muestra como un agente eficiente, en cuanto al tiempo de descalcificación y calidad de las muestras. Se atribuye esta ventaja, al hecho de estar basado en un ácido orgánico débil, descrito en la investigación de Abrantes y cols 2017 como agentes que actúan más rápidamente que los agentes quelantes; no obstante, según estos mismos autores, los agentes quelantes ofrecen una mayor conservación de las estructuras histológicas (21), hecho que es observado en este estudio con el EDTA 12% pero con la diferencia que el TBD-2™ (formulación ácida) también refleja un nivel adecuado de conservación similar al EDTA 12%.

El segundo lugar, en tiempo de descalcificación, lo obtuvo Osteosoft®, se podría atribuir a ello, la formulación creada que mejora la velocidad de descalcificación de un agente EDTA puro, presentando una moderada integridad o conservación del tejido.

En este sentido, los resultados del estudio de validez de un método de descalcificación ratifican las afirmaciones de Zhai y cols 2014, Guibas y cols 2014 al mencionar la mayor velocidad de descalcificación de un ácido frente a agentes quelantes, usados en este estudio EDTA y Osteosoft®. Por consiguiente, se coincide con Neves y cols 2011, Prasad y Donoghue 2013 para recomendar el uso del EDTA; pero según los resultados obtenidos,

solo en casos que el factor tiempo sea poco importante; debido a que este estudio refleja que el producto comercial TBD-2™ y en segundo lugar el Osteosoft© no han ocasionado daño o han producido un daño mínimo al tejido, obteniendo similares características de conservación morfológica atribuidas al EDTA. En virtud de ello, formulación basada en ácido fórmico TBD-2™ otorga un equilibrio entre la calidad de la sección teñida y el tiempo de descalcificación.

La detección de artefactos en las muestras pueden ser asociadas a los efectos producidos por el tipo de agente descalcificador, al tiempo de descalcificación, a una inclusión deficiente en parafina o podría coincidir debido al uso de prueba física para la determinación del punto de descalcificación, que en afirmaciones de Savi y cols 2017 este tipo de prueba conllevaría a desventajas como la generación de artefactos, destrucción de detalles celulares y lecturas falsas positivas (16).

Por otro lado; actualmente, resulta razonable la búsqueda de técnicas de tinción que permitan visualizar de forma específica los distintos elementos tisulares de acuerdo al objetivo del estudio. Se han venido comparando diferentes tinciones para tejidos calcificados como tricrómico de Mason (Li y cols 2005, Belaldavar y cols 2014, Rentsch y cols 2014); tricrómico Ponceau mejorado (Li y cols 2005); RP (Li y cols 2005); HE (Gupta y cols 2012, Belaldavar y cols 2014, Rentsch y cols 2014, Kunche y cols 2017); PM (Rentsch y cols 2014); azul de Alcían (Rentsch y cols 2014); verde luz naranja G (Kunche y cols 2017); señalando que la tinción rutinaria de HE brinda una visión general de las estructuras morfológicas y formación ósea, lo que también es reportado en los resultados de esta investigación. Así mismo, el estudio de validez de un método de tinción evidencia la eficacia de la técnica de PM, al aportar una mejor coloración para evaluar el proceso de curación ósea mediante la demarcación clara de nuevos osteoides y hueso mineralizado, coincidiendo con lo informado por Rentsch y cols 2014. De este mismo modo, la tinción con RP permite el estudio de redes de colágeno en diferentes tejidos y podrían usarse en estudios de formación ósea, lo que también fue señalado por Li y cols 2005.

En resumen, el actual estudio de investigación ha logrado demostrar la eficiencia de los nuevos métodos empleados frente a los sistemas tradicionales que incluye el uso de EDTA como agente descalcificador y HE en la tinción histológica a diferencia de los resultados publicados por Guibas y cols 2014, Zhai y cols 2014, Abrantes y cols 2017 que señalan el uso del EDTA como la mejor opción.

## CONCLUSIONES

---

La elección del protocolo de procesamiento de muestras se encuentra en función al tipo de tejido calcificado, la urgencia y el objetivo del estudio. Por tanto; los resultados conducen a las siguientes conclusiones:

1. El producto comercial TBD-2™ refleja la combinación más eficiente para cumplir con los requisitos básicos de un agente descalcificador ideal, permitiendo la descalcificación de un fragmento de 10 mm de tejido óseo en un tiempo de 7 semanas, con una buena integridad o conservación de la morfología.
2. El menor tiempo de descalcificación de las muestras se obtiene con TBD-2™, formulación basada en ácido fórmico, con un tiempo de 7 semanas; seguido de Osteosoft®, basado en EDTA, con un tiempo de 7 meses y por último; el mayor tiempo de descalcificación se da con el EDTA 12%, 14 meses.
3. La determinación del punto final de descalcificación no resulta precisa en ninguno de los casos; siendo necesario, durante la fase de sección o corte, sumergir las muestras en una solución de Histofix® (contiene EDTA) por un tiempo de 1h.
4. La conservación morfológica mantiene una buena integridad de las estructuras en los cortes histológicos previamente descalcificados con TBD-2™ y EDTA 12%; mientras que se halla una moderada integridad en las muestras descalcificadas con Osteosoft®.
5. El PM y RP mostraron gran eficacia como técnicas de tinción histológica para la diferenciación de las estructuras morfológicas, visualización de redes de colágeno y estudio del progreso de curación ósea.
6. Es necesario aplicar los resultados obtenidos a un mayor número de muestras para la obtención de resultados cuantitativos que permitan valorar la significación estadística del estudio.
7. Se recomienda, continuar con la búsqueda de protocolos eficientes de procesamiento de muestras, a través de la comparación de otros agentes también empleados para la descalcificación y tinción histológica en Odontología, manteniendo el objetivo de brindar un procesamiento eficiente, preciso y menos complejo, sin pérdida de calidad en las muestras.

# IMPLEMENTACIÓN

## 1. RECURSOS Y LOGÍSTICA

|   | Unidades | Precio unitario | Precio total €    | Precio total \$    |
|---|----------|-----------------|-------------------|--------------------|
| <b>MATERIAL DE BIOSEGURIDAD</b>                     |          |                 |                   |                    |
| Bata de laboratorio                                 | 2        | 26.23 €         | 52.46 €           | \$ 58.76           |
| Gafas de seguridad graduadas                        | 1        | 51.00 €         | 51.00 €           | \$ 57.12           |
| Gorros de laboratorio (100 unids./caja)             | 2        | 7.53 €          | 15.06 €           | \$ 16.87           |
| Guantes de laboratorio de nitrilo (200 unids./caja) | 2        | 8.35 €          | 16.70 €           | \$ 18.70           |
| Mascarillas (50 unids./caja)                        | 4        | 1.68 €          | 6.72 €            | \$ 7.53            |
| Scrubs  | 2        | 29.50 €         | 59.00 €           | \$ 66.08           |
| Zapatos sanitarios                                  | 1        | 29.56 €         | 29.56 €           | \$ 33.11           |
| <b>RECURSOS METODOLÓGICOS</b>                       |          |                 |                   |                    |
| Atlas de inmunohistoquímica (libro)                 | 1        | 90.25 €         | 90.25 €           | \$ 101.08          |
| Immunohistochemistry: Basics and Methods (libro)    | 1        | 118.99 €        | 118.99 €          | \$ 133.27          |
| Artículos científicos                               | 5        | 15.00 €         | 75.00 €           | \$ 84.00           |
| Seminarios  | 5        | 50.00 €         | 250.00 €          | \$ 280.00          |
| Congresos   | 1        | 125.00 €        | 125.00 €          | \$ 140.00          |
| Fotocopias  | 60       | 0.10 €          | 6.00 €            | \$ 6.72            |
| Impresión y anillado TFM                            | 4        | 15.00 €         | 60.00 €           | \$ 67.20           |
| Servicio revisión lingüística                       | 1        | 70.00 €         | 70.00 €           | \$ 78.40           |
| Asesoramiento estadístico                           | 1        | 50.00 €         | 50.00 €           | \$ 56.00           |
| <b>RECURSOS TECNOLÓGICOS</b>                        |          |                 |                   |                    |
| Impresora   | 1        | 99.00 €         | 99.00 €           | \$ 110.88          |
| Memoria externa                                     | 1        | 57.99 €         | 57.99 €           | \$ 64.95           |
| Ordenador Notebook                                  | 1        | 429.00 €        | 429.00 €          | \$ 480.48          |
| Cámara fotográfica                                  | 1        | 174.00 €        | 174.00 €          | \$ 194.88          |
| Microsoft Office (software ofimática)               | 1        | 52.99 €         | 52.99 €           | \$ 59.35           |
| Traductor para Microsoft Office                     | 1        | 89.21 €         | 89.21 €           | \$ 99.92           |
| <b>OTROS</b>  |          |                 |                   |                    |
| Material de oficina                                 | 10       | 3.00 €          | 30.00 €           | \$ 33.60           |
| Cartuchos de tinta                                  | 3        | 96.99 €         | 290.97 €          | \$ 325.89          |
| Gastos generales e imprevistos                      | 1        | 50.00 €         | 50.00 €           | \$ 56.00           |
| <b>TOTAL</b>  |          |                 | <b>2,348.90 €</b> | <b>\$ 2,630.77</b> |

**Fuente de Financiamiento: BECA DEL MINISTERIO DE EDUCACIÓN DEL PERÚ – PRONABEC**

## 2. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

| ACTIVIDADES                            | ENERO |   |   |   | FEBRERO |   |   |   | MARZO |   |   |   | ABRIL |   |   |   | MAYO |   |   |   | JUNIO |   |   |   | JULIO |   |   |   | AGOSTO |   |   |   | SEPTIEMBRE |   |   |   |
|--|-------|---|---|---|---------|---|---|---|-------|---|---|---|-------|---|---|---|------|---|---|---|-------|---|---|---|-------|---|---|---|--------|---|---|---|------------|---|---|---|
|  | 1     | 2 | 3 | 4 | 1       | 2 | 3 | 4 | 1     | 2 | 3 | 4 | 1     | 2 | 3 | 4 | 1    | 2 | 3 | 4 | 1     | 2 | 3 | 4 | 1     | 2 | 3 | 4 | 1      | 2 | 3 | 4 | 1          | 2 | 3 | 4 |
| Antecedentes                           | ■     | ■ | ■ | ■ | ■       | ■ |   |   |       |   |   |   |       |   |   |   |      |   |   |   |       |   |   |   |       |   |   |   |        |   |   |   |            |   |   |   |
| Planteamiento del problema             |       |   |   |   |         |   | ■ |   |       |   |   |   |       |   |   |   |      |   |   |   |       |   |   |   |       |   |   |   |        |   |   |   |            |   |   |   |
| Justificación                          |       |   |   |   |         |   | ■ | ■ |       |   |   |   |       |   |   |   |      |   |   |   |       |   |   |   |       |   |   |   |        |   |   |   |            |   |   |   |
| Hipótesis y objetivos                  |       |   |   |   |         |   |   |   | ■     |   |   |   |       |   |   |   |      |   |   |   |       |   |   |   |       |   |   |   |        |   |   |   |            |   |   |   |
| Marco teórico                          |       |   |   |   |         |   |   |   | ■     | ■ | ■ | ■ | ■     |   |   |   |      |   |   |   |       |   |   |   |       |   |   |   |        |   |   |   |            |   |   |   |
| Metodología                            |       |   |   |   |         |   |   |   |       |   |   |   | ■     | ■ |   |   |      |   |   |   |       |   |   |   |       |   |   |   |        |   |   |   |            |   |   |   |
| Experimentación y recolección de datos |       |   |   |   |         |   |   |   |       |   |   |   |       |   |   |   | ■    | ■ | ■ | ■ | ■     | ■ | ■ | ■ | ■     |   |   |   |        |   |   |   |            |   |   |   |
| Análisis de datos                      |       |   |   |   |         |   |   |   |       |   |   |   |       |   |   |   |      |   |   |   | ■     | ■ | ■ | ■ | ■     | ■ |   |   |        |   |   |   |            |   |   |   |
| Elaboración del informe                |       |   |   |   |         |   |   |   |       |   |   |   |       |   |   |   |      |   |   |   |       |   |   |   | ■     | ■ | ■ | ■ |        |   |   |   |            |   |   |   |
| Revisión                               |       |   |   |   |         |   |   |   |       |   |   |   |       |   |   |   |      |   |   |   |       |   |   |   |       |   |   |   | ■      | ■ | ■ | ■ |            |   |   |   |
| Preparación                            |       |   |   |   |         |   |   |   |       |   |   |   |       |   |   |   |      |   |   |   |       |   |   |   |       |   |   |   |        |   |   |   | ■          | ■ | ■ | ■ |
| Presentación Facultad                  |       |   |   |   |         |   |   |   |       |   |   |   |       |   |   |   |      |   |   |   |       |   |   |   |       |   |   |   |        |   |   |   | ■          |   |   |   |
| Sustentación                           |       |   |   |   |         |   |   |   |       |   |   |   |       |   |   |   |      |   |   |   |       |   |   |   |       |   |   |   |        |   |   |   |            |   |   | ■ |

\* Actividades de experimentación en laboratorio: Abril 2019 – Julio 2019

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

1. Vignoletti F, Nuñez J, Discepoli N, De Sanctis F, Caffesse R, Muñoz F, et al. Clinical and histological healing of a new collagen matrix in combination with the coronally advanced flap for the treatment of Miller class-I recession defects: an experimental study in the minipig: Histological outcome of Mucograft®. *Journal of Clinical Periodontology*. septiembre de 2011;38(9):847-55.
2. Mooney JB, Barrancos PJ. *Operatoria Dental/ Dental Operation: Integración Clínica/ Clinical Integration*. Ed. Médica Panamericana; 2006. 1348 p.
3. Gómez de Ferraris ME, Campos Muñoz A. *Histología y Embriología Bucodental* [Internet]. 2da Ed. Madrid, SPAIN: Editorial Médica Panamericana; 1999 [citado 4 de julio de 2019]. Disponible en: [https://www.academia.edu/8172519/Histologia\\_y\\_Embriologia\\_Bucodental\\_Gomez\\_de\\_Ferraris](https://www.academia.edu/8172519/Histologia_y_Embriologia_Bucodental_Gomez_de_Ferraris)
4. Bancroft JD. *Theory and Practice of Histological Techniques*. Elsevier Health Sciences; 2008. 742 p.
5. Lindhe J, Lang NP, Karring T. *Periodontología Clínica e Implantología Odontológica*. 5ta Ed. España: Editorial Médica Panamericana; 2011.
6. Newman, Takei, Carranza. *Periodontología Clínica*. 9na Ed. Editorial McGraw-Hill; 2003.
7. Iturriaga Tapia, Sharon Yadzaré; Vizcaíno Villalobos, María Adelita; Moreno Fernández, Carlos Guillermo; El tejido óseo - ClinicalKey MedEd [Internet]. 2015 [citado 4 de enero de 2019]. Disponible en: <https://www.clinicalkey.com/meded/content/book/3-s2.0-B9788490228814000108>
8. Fernández-Tresguerres Hernández-Gil I, Alobera Gracia MA, Canto Pingarrón M del, Blanco Jerez L. Bases fisiológicas de la regeneración ósea I: Histología y fisiología del tejido óseo. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal* (Internet). febrero de 2006;11(1):47-51.

9. Bogoevski K. A comprehensive evaluation of a rapid decalcification method for bones: A histological analysis [Internet] [masters\_by\_research]. Queensland University of Technology; 2016 [citado 27 de diciembre de 2018]. Disponible en: <https://eprints.qut.edu.au/95917/>
10. SEPA Sociedad Española de Periodoncia y Osteointegración, Echevarría JJ, Blanco Carrión J. Manual SEPA de Periodoncia y Terapéutica de Implantes. España: Editorial Médica Panamericana; 2005.
11. Keklikoglu N, Akinci S. Comparison of three different techniques for histological tooth preparation. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 2013;51(4):286-91.
12. Alturkistani HA, Tashkandi FM, Mohammedsaleh ZM. Histological Stains: A Literature Review and Case Study. *Glob J Health Sci*. marzo de 2016;8(3):72-9.
13. Cotoi OS, Suciu M, Pacurar M, Ormenisan A. Chemical and Biochemical Principles Applied in the Histological Processing of Maxillary and Mandibular Bone. *REV CHIM*. 2015;(2):5.
14. Martín Lacave I, García Caballero T. Atlas de inmunohistoquímica: caracterización de células, tejidos y órganos normales [Internet]. Madrid, SPAIN: Ediciones Díaz de Santos; 2014 [citado 3 de enero de 2019]. Disponible en: <http://ebookcentral.proquest.com/lib/universidadcomplutense-ebooks/detail.action?docID=3227134>
15. González-Chávez SA, Pacheco-Tena C, Macías-Vázquez CE, Luévano-Flores E. Assessment of different decalcifying protocols on Osteopontin and Osteocalcin immunostaining in whole bone specimens of arthritis rat model by confocal immunofluorescence. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013;6(10):1972-83.
16. Savi FM, Brierly GI, Baldwin J, Theodoropoulos C, Woodruff MA. Comparison of Different Decalcification Methods Using Rat Mandibles as a Model. *J Histochem Cytochem*. diciembre de 2017;65(12):705-22.
17. Srinivasyaiah A, Nitin P, Hegde U. Comparison of Microwave Versus Conventional Decalcification of Teeth Using Three Different Decalcifying Solutions. *J Lab Physicians*. 2016;8(2):106-11.

18. Hatta H, Tsuneyama K, Nomoto K, Hayashi S, Miwa S, Nakajima T, et al. A simple and rapid decalcification procedure of skeletal tissues for pathology using an ultrasonic cleaner with D-mannitol and formic acid. *Acta Histochem.* junio de 2014;116(5):753-7.
19. Salazar L, Moreno F. Comparación de tres tipos de tinciones histoquímicas en secciones histológicas de paladar y lengua de rata Wistar. diciembre de 2016;13.
20. Kadashetti. A quantitative study of comparing the routine decalcification and microwave decalcification methods by using different decalcifying agents [Internet]. 2017 [citado 4 de enero de 2019]. Disponible en: <http://www.ijmdent.com/article.asp?issn=2229-6360;year=2017;volume=7;issue=2;spage=94;epage=100;aulast=Kadashetti>
21. Abrantes AAA, Rafacho A, Rivero ERC, Mariano FV, Siqueira FM, Gondak RO. Tissue integrity, costs and time associated with different agents for histological bone preparation. *Microsc Res Tech.* abril de 2017;80(4):344-9.
22. Gül M, Bayat N, Gül S, Hüz M, Yıldız A, Otlı A. A Comparison of Three Different Agents of Decalcification for a Histological Examination of Bone Tissues. *Journal of Turgut Ozal Medical Center.* abril de 2014;6.
23. Descalcificadores para diagnóstico clínico - PanReac AppliChem IP-0010 [https://www.itwreagents.com/download\\_file/info\\_point/IP-010/es/IP-010\\_es.pdf](https://www.itwreagents.com/download_file/info_point/IP-010/es/IP-010_es.pdf) [Internet]. [citado 27 de diciembre de 2018]. Disponible en: [https://www.itwreagents.com/download\\_file/info\\_point/IP-010/es/IP-010\\_es.pdf](https://www.itwreagents.com/download_file/info_point/IP-010/es/IP-010_es.pdf)
24. Ficha\_Osteosoft © 2018 Merck KGaA, Darmstadt, Alemania y/o sus filiales [http://www.merckmillipore.com/ES/es/product/OSTEOSOFT,MDA\\_CHEM-101728](http://www.merckmillipore.com/ES/es/product/OSTEOSOFT,MDA_CHEM-101728).
25. Ficha Shandon™ TBD-2™ Decalcifier, Thermo Scientific <https://ca.vwr.com/store/product/en/18492997/shandon-tbd-2-decalcifier-thermo-scientific>.
26. Rabiei AA, Esfandiary E, Hajian M, Shamosi A, Mardani M, Rashidi B, et al. Plastination of decalcified bone by a new resin technique. *Adv Biomed Res* [Internet]. 9 de enero de 2014 [citado 27 de diciembre de 2018];3. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3929099/>

27. Raj AT, Patil S, Rao RS. A Comparison of Conventional and Microwave Decalcification and Processing of Tooth and Mandibular Bone Specimens. *J Clin Diagn Res.* octubre de 2016;10(10):ZC121-6.
28. Pitol DL, Caetano FH, Lunardi LO. Microwave-induced fast decalcification of rat bone for electron microscopic analysis: an ultrastructural and cytochemical study. *Braz Dent J.* 2007;18(2):153-7.
29. Sanjai K, Kumarswamy J, Patil A, Papaiah L, Jayaram S, Krishnan L. Evaluation and comparison of decalcification agents on the human teeth. *J Oral Maxillofac Pathol.* mayo de 2012;16(2):222-7.
30. Pavlič A, Vrecl M, Jan J, Bizjak M, Nemec A. Case report of a molar-root incisor malformation in a patient with an autoimmune lymphoproliferative syndrome. *BMC Oral Health.* 22 de marzo de 2019;19(1):49.
31. Belhassen S, Alzahrani M, Nader M-E, Gaboury L, Saliba I. Study of Methylene Blue Ototoxicity in the Guinea Pig. *J Clin Med Res.* noviembre de 2017;9(11):900-6.
32. Kim JM, Kim MH, Kang SS, Kim G, Choi SH. Comparable bone healing capacity of different bone graft matrices in a rabbit segmental defect model. *Journal of Veterinary Science.* 1 de junio de 2014;15(2):289-95.
33. Martínez-Sanz E, Varghese OP, Kisiel M, Engstrand T, Reich KM, Bohner M, et al. Minimally invasive mandibular bone augmentation using injectable hydrogels. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine.* 2012;6(S3):s15-23.
34. Mudhiraj PV, Vanje MM, Reddy BN, Ahmed SA, Suri C, Taveer S, et al. Nature of Hard Tissues in Oral Pathological Lesions -Using Modified Gallego's Stain. *J Clin Diagn Res.* abril de 2017;11(4):ZC13-5.
35. Belaldavar C, Hallikerimath S, Angadi PV, Kale AD. Comparison of tetrachromic VOF stain to other histochemical staining techniques for characterizing stromal soft and hard tissue components. *Biotech Histochem.* noviembre de 2014;89(8):545-51.
36. Gartner LP, Hiatt JL. *Tratado de Histología.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999.

37. Cristina E, Jardim G, Rodrigues G, de JCG. Technical analysis histological and immunohistochemical in dentistry. 2013;10.
38. Bolintineanu SL, Puscasiu DA, Petrescu CI, Tatu RF, Pop E, Tatu CS, et al. Injected and Colouring Substances Largely Used in Processing Microscopic Anatomical Structures. *MATERIALE PLASTICE*. 2017;(3):5.
39. Rentsch C, Schneiders W, Manthey S, Rentsch B, Rammelt S. Comprehensive histological evaluation of bone implants. *Biomater*. 1 de enero de 2014;4(1):e27993.
40. Lattouf R, Younes R, Lutomski D, Naaman N, Godeau G, Senni K, et al. Picrosirius Red Staining: una herramienta útil para evaluar las redes de colágeno en tejidos normales y patológicos. *J Histochem Cytochem*. 1 de octubre de 2014;62(10):751-8.
41. Berglundh T, Lindhe J, Ericsson I, Marinello CP, Liljenberg B, Thorsen P. The soft tissue barrier at implants and teeth. *Clinical Oral Implants Research*. 1991;2(2):81-90.
42. Donath K, Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues\*. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 1 de julio de 1982;11(4):318-26.
43. Vignoletti F, Johansson C, Albrektsson T, De Sanctis M, San Roman F, Sanz M. Early healing of implants placed into fresh extraction sockets: an experimental study in the beagle dog. De novo bone formation. *Journal of Clinical Periodontology*. marzo de 2009;36(3):265-77.
44. Rehfeld A, Nylander M, Karnov K. *Compendium of Histology: A Theoretical and Practical Guide*. Springer; 2017. 670 p.
45. de Mayer H. Ficha de Datos de Seguridad Según Reglamento (UE) 830/2015. :8.
46. PanReac AppliChem. Eosina Amarillenta (C.I. 45380) para diagnóstico clínico - ITW Reagents [Internet]. [citado 15 de junio de 2019]. Disponible en: <https://www.itwreagents.com/italy/es/product/eosina+amarillenta+%28c.i.+45380%29+para+diagn%C3%B3stico+cl%C3%ADnico/251299>
47. Anderson J. *An Introduction to Routine and Special Staining*. 31 de mayo de 2012 [citado 4 de enero de 2019]; Disponible en:

<https://www.leicabiosystems.com/pathologyleaders/an-introduction-to-routine-and-special-staining/>

48. scytek.com. Movat Pentachrome Stain Kit (Modified Russell-Movat) - MPS-2 (713) (Histology, Special Stains) [Internet]. [citado 15 de junio de 2019]. Disponible en: [https://www.scytek.com/products/170.23-MPS-2-Movat-Pentachrome-Stain-Kit-\(Modified-Russell-Movat\).asp](https://www.scytek.com/products/170.23-MPS-2-Movat-Pentachrome-Stain-Kit-(Modified-Russell-Movat).asp)
49. Abcam. Picro Sirius Red Stain Kit (Connective Tissue Stain). :3.

## ANEXOS

## ANEXO N° 1



XUNTA DE GALICIA  
DELEGACIÓN TERRITORIAL  
DE LUGO  
Xefatura Territorial da Consellería  
do Medio Rural e do Mar

Ronda da Muralla, 70  
LUGO

galicia

MR110250

D. Luis Felipe de la Cruz Palomino  
Fundación Rof Codina  
Estrada da Granxa, s/n  
27002 Lugo

**Asunto: Comunicación de autorización de proxecto.**

Remítolle resolución de autorización do proxecto: **“Perimplantitis inducida arredor de implantes con diferentes características de superficie. Un estudo experimental no can Beagle”**, do que é responsable o investigador D. Fernando M<sup>o</sup> Muñoz Guzón e que se vai levar a cabo no centro usuario de animais de experimentación da Fundación Rof Codina( AE-LU-001).

Lugo, 8 de xaneiro de 2016  
O xefe do servizo provincial de

P.A.

Asdo.: Belén Ferrero Fernández



REXISTRO XERAL DA XUNTA DE GALICIA  
REXISTRO DO EDIFICIO ADMINISTRATIVO DE LUGO  
LUGO

Data 11/01/2016 12:40:48

SAÍDA 1315 / RX 25516





**XUNTA DE GALICIA**  
 DELEGACIÓN TERRITORIAL  
 DE LUGO  
 Xefatura Territorial da Consellería  
 do Medio Rural e do Mar

Ronda da Muralla, 70  
 LUGO



## RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DE PROXECTOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Expediente núm.:04/16/LU-001

Interesado:Fernando M<sup>a</sup> Muñoz Guzón

Procedemento: RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DE PROXECTOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Data de inicio: 1 de febreiro de 2016

Forma de inicio: solicitude do interesado

### ANTECEDENTES

O interesado, como responsable do proxecto, presentou con data 15 de decembro de 2015, rexistro de entrada 142854/RX 2568054 de 18 de decembro de 2015, solicitude para a realización do proxecto de experimentación animal cuxos datos detállanse a continuación:

- Denominación do proxecto: **Perimplantitis inducida arredor de implantes con diferentes características de superficie. Un estudo experimental no can Beagle"**
- Nome do centro usuario: Fundación Rof Codina(AE-LU-001).
- Persoa responsable do proxecto: Fernando M<sup>a</sup> Muñoz Guzón.
- Establecemento onde se realizarán os procedementos do proxecto (ou lugar xeográfico no caso de traballos de campo): Fundación Rof Codina(AE-LU-001).
- Clasificación do proxecto : **Tipo II.**

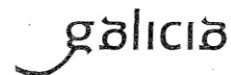
### CONSIDERACIÓNS LEGAIS E TÉCNICAS

- I. Real decreto 53/2013, de 1 de febreiro (B.O.E. nº 34, do 8 de febreiro), polo que se establecen as normas básicas aplicables para a protección dos animais utilizados en experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia, establece no seu artigo 33 as condicións de autorizacións dos proxectos con animais de experimentación.
- II. Artigo 89 da Lei 30/1992, de 26 de novembro, do réxime xurídico das Administracións Públicas e do procedemento administrativo común (B.O.E. núm. 285, 27 de novembro de 1992), modificada pola Lei 4/1999, de 14 de xaneiro, establece que a resolución que poña fin o procedemento decidirá todas as cuestións expostas polos interesados e aquelas outras derivadas do mesmo.



**XUNTA DE GALICIA**  
 DELEGACIÓN TERRITORIAL  
 DE LUGO  
 Xefatura Territorial da Consellería  
 do Medio Rural e do Mar

Ronda da Muralla, 70  
 LUGO



Esta xefatura territorial é competente para ditar resolución de conformidade co artigo 11 do Decreto 245/2009 de 3/ de abril, polo que se regulan as delegacións territoriais da Xunta de Galicia e o Decreto 166/2015, de 13 de novembro, polo que establece a estrutura orgánica da Consellería do Medio Rural.

Revisada por parte do Servizo Provincial de Gandería de Lugo a documentación achegada na solicitude e e visto o informe **favorable** da avaliación do proxecto, de data 4 de novembro de 2015 emitido polo órgano habilitado Comité de Ética do Hospital Veterinario Rof Codina, este Departamento Territorial resolve, **AUTORIZAR** o proxecto solicitado.

A autorización deste proxecto terá unha **duración de 5 ANOS**, transcorridos os cales, deberá renovar a autorización do mesmo.

A autorización é unicamente válida nas condicións que figuran no expediente. Ante calquera cambio significativo no proxecto que poida ter efectos negativos sobre o benestar dos animais, deberá solicitar a confirmación da autorización ao Servizo Provincial de Gandería.

Esta autorización poderá ser suspendida no caso de que o proxecto non se leve a cabo de acordo coas condicións de autorización e retirala previo expediente tramitado ao que se lle dará audiencia.

Contra a presente resolución, que non pon fin á vía administrativa, poderá interpor **recurso de alzada** ante o conselleiro de Medio Rural da Xunta de Galicia no prazo **dun mes** contado a partir da recepción da notificación da presente resolución, conforme coa Lei 30/1992, do 26 de novembro, (B.O.E. núm. 285, 27 de novembro de 1992), de Réxime Xurídico das Administracións Públicas e do Procedemento Administrativo Común na súa redacción dada pola Lei 4/1999, do 13 de xaneiro.

Lugo, 8 de xaneiro de 2016

O xefe do Departamento Territorial de Medio Rural de Lugo

Asdo.: José Ramón Losada Fernández