



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE BIOPATOLOGÍA

**EFECTO DEL ÁCIDO ASCÓRBICO EN ÚLCERAS  
BUCALES INDUCIDAS EN RATAS BIOU: WISTAR**

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

**Autores: Fátima Antonio**

**Gabriela Sayago**

**Tutor: Prof. Belkis Quiñonez**

**Cotutor: Prof. Rosalba Florido**

Mérida – Venezuela, agosto de 2019



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE BIOPATOLOGÍA

## **EFFECTO DEL ÁCIDO ASCÓRBICO EN ÚLCERAS BUCALES INDUCIDAS EN RATAS BIOU: WISTAR**

Trabajo Especial de Grado para optar al título de Odontólogo

**Autores: Fátima Antonio**

**Gabriela Sayago**

**Tutor: Prof. Belkis Quiñonez**

**Cotutor: Prof. Rosalba Florido**

Mérida – Venezuela, agosto de 2019

## DEDICATORIA

A Dios, quien siempre me acompaña e ilumina mi camino con todas sus bendiciones, quien nos ha dado la sabiduría necesaria para llevar a cabo esta gran etapa.

A mis padres, por su amor, apoyo y palabras de ánimo en cada día de mi vida, todo esto es por y para ustedes.

A mi tío Leo, quien no se encuentra físicamente con nosotros, pero que espero que cuando venga Jesús por segunda vez, pueda leer estas palabras y sentirse orgulloso de las metas que he podido realizar.

Fátima

A Dios, mi pilar y fuente de inspiración, gracias a su luz y a su amor que siempre me acompañan.

A mi abuelo José, siempre pensé que estaría para verme cumplir esta meta y aunque no fue así, quiero dedicar a él todo el esfuerzo y la satisfacción de haberla cumplido.

A mi mamá Hilda, mi apoyo incondicional, quien nunca me falta y a quien debo todo lo que soy.

Gabriela

## AGRADECIMIENTO

- A **Dios** por bendecir, guiar e iluminar cada etapa de este proceso y así poder culminar con éxito esta investigación.
- A **nuestros padres**, por su apoyo incondicional y por ser los principales promotores de nuestros sueños.
- A **Jorbis** y a **Andrés** por acompañarnos en este camino y estar siempre para nosotras.
- A **nuestras familias** por motivarnos y ser un apoyo invaluable.
- A nuestra tutora, **Prof. Belkis Quiñonez** por confiar en nosotras y por ser ejemplo de disciplina y excelencia. Gracias por su apoyo y por dedicarnos su tiempo para hacer posible esta investigación.
- A nuestra cotutora, **Prof. Rosalba Florido** por su tiempo y por compartir sus valiosos conocimientos con nosotras.
- Al **Prof. Elix Izarra**, por su colaboración y dedicación en la parte estadística de este trabajo.
- Al T.S.U. **Andrés Márquez**, por su colaboración y entusiasmo haciendo posible el desarrollo del experimento.
- A la **Prof. Sara Pasquale** por su colaboración en la preparación de los geles aplicados en este estudio.
- Al **Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina ULA**, por facilitarnos sus instalaciones para la ejecución de esta investigación.
- Al **Bioterio de la Universidad de Los Andes**, por proveernos los ejemplares biológicos necesarios para nuestra investigación y por instruirnos sobre el manejo de los mismos.
- A la **Facultad de Odontología de la Universidad de Los Andes (FOULA)**, por ser nuestra casa de estudio y promover la investigación científica que la convierte en una de las mejores universidades a nivel nacional e internacional.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN .....	12
INTRODUCCIÓN .....	13
CAPÍTULO I .....	15
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	15
1.1 Definición y contextualización del problema .....	15
1.2 Objetivos de la investigación .....	18
1.2.1 Objetivo general.....	18
1.2.2 Objetivos específicos .....	18
1.3 Hipótesis.....	19
1.4 Justificación.....	19
CAPÍTULO II .....	20
MARCO TEÓRICO.....	20
2.1 Antecedentes .....	20
2.1.1 Efecto del ácido ascórbico en úlceras bucales .....	20
2.1.2 Efecto del ácido ascórbico en heridas quirúrgicas .....	22
2.2 Bases conceptuales.....	24
2.2.1 Mucosa bucal .....	24
2.2.2 Organización de la mucosa bucal .....	25
2.2.3 Tejido epitelial .....	25
2.2.4 Tejido conjuntivo.....	27
2.2.5 Cicatrización de la mucosa .....	29
2.2.6 Colágeno .....	32
2.2.7 Úlceras bucales .....	35
2.2.8 Ácido Ascórbico .....	40
2.2.9 Modelo experimental de úlcera bucal inducida por ácido acético.....	43
CAPÍTULO III.....	45

MARCO METODOLÓGICO.....	45
3.1    Enfoque, alcance y diseño de investigación.....	45
3.2    Ejemplares biológicos .....	46
3.3    Sistemas de variables .....	46
3.3.1    Variable independiente .....	46
3.3.2    Variable dependiente .....	46
3.4    Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	47
3.5    Prueba piloto .....	48
3.6    Materiales, instrumental y equipos .....	50
3.6.1    Materiales.....	50
3.6.2    Instrumental .....	51
3.6.3    Equipos .....	51
3.7    Procedimiento .....	51
3.7.1    Etapa pre experimental .....	52
3.7.2    Etapa experimental .....	53
3.8    Principios bioéticos .....	58
3.9    Análisis de resultados.....	59
CAPÍTULO IV.....	60
RESULTADOS.....	60
4.1    Presentación de los resultados.....	60
4.1.1    Evolución clínica .....	60
4.1.2    Hallazgos histológicos .....	64
CAPÍTULO V.....	71
DISCUSIÓN .....	71
CAPÍTULO VI.....	75
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	75
4.2    Conclusiones .....	75

4.3 Recomendaciones.....	75
REFERENCIAS.....	77
ANEXOS .....	83

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución clínica de la cicatrización de rata control.....	49
Figura 2. Microfotografías de preparados histológicos teñidos con H-E correspondientes a epitelio con integridad y epitelio ulcerado .....	50
Figura 3. Inducción de la anestesia. Técnica anestésica intraperitoneal .....	54
Figura 4. Procedimiento de inducción de la úlcera.....	55
Figura 5. Aplicación de los tratamientos .....	55
Figura 6. Ejemplares biológicos en fase de recuperación posterior a la aplicación de los tratamientos.....	56
Figura 7. Medición clínica de la lesión.....	57
Figura 8. Eutanasia por vía inhalatoria con enflurano en cámara de vidrio.....	57
Figura 9. Biopsia excisional.....	58
Figura 10. Microfotografías de preparados histológicos teñidos con H-E correspondiente a epitelio ulcerado y a epitelio íntegro.....	67
Figura 11. Microfotografías de tejido conjuntivo teñido con H-E correspondiente al infiltrado inflamatorio .....	68
Figura 12. Microfotografías de preparados histológicos teñidos con H-E correspondiente al tejido conjuntivo .....	69
Figura 13. Microfotografías de preparados histológicos teñidos con H-E correspondiente a la cantidad de fibras de colágeno.....	70

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Cantidad de mediciones obtenidas en cada momento de observación del grupo control y del grupo experimental .....	61
Gráfico 2. Tamaño promedio del área de lesión en cada momento de observación del grupo control y del grupo experimental .....	62
Gráfico 3. Ejemplares biológicos del grupo control y del grupo experimental sometidos a eutanasia para la obtención de biopsias en cada momento de observación.....	65

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Evolución de la lesión según las mediciones obtenidas en cada momento de observación del grupo control y del grupo experimental .....	61
Tabla 2. Evolución clínica de la lesión en cada momento de observación del grupo control y del grupo experimental .....	63
Tabla 3. Cantidad porcentual de vasos sanguíneos encontrada en cada momento de observación en el grupo control y en el grupo experimental.....	65
Tabla 4. Microfotografía de preparado histológico teñido con H-E correspondientes a la cantidad de vasos sanguíneos .....	66
Tabla 5. Cantidad porcentual del tipo de infiltrado inflamatorio encontrada en cada momento de observación en el grupo control y en el grupo experimental.. .....	68
Tabla 6. Cantidad porcentual de la densidad de tejido conjuntivo encontrada en cada momento de observación en el grupo control y en el grupo experimental. ....	69
Tabla 7. Cantidad de muestras histológicas en donde se observó presencia de colágeno en el grupo control y grupo experimental .....	70



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE BIOPATOLOGÍA

## EFECTO DEL ÁCIDO ASCÓRBICO EN ÚLCERAS BUCALES INDUCIDAS EN RATAS BIOU: WISTAR

Trabajo Especial de Grado para optar al título de Odontólogo

**Autores:** Fátima Antonio  
Gabriela Sayago  
**Tutor:** Prof. Belkis Quiñonez  
**Cotutor:** Prof. Rosalba Florido  
Mérida – Venezuela, Julio 2019

### RESUMEN

**INTRODUCCIÓN:** la úlcera es la lesión más común de la mucosa bucal, su tratamiento está orientado a eliminar la causa que la origina y cuando su etiología es idiopática busca aliviar los síntomas y acelerar el proceso de cicatrización. No se ha determinado el uso de un medicamento totalmente efectivo para la curación de estas lesiones. Se ha demostrado que el ácido ascórbico (AA) resulta útil para promover la reparación tisular y la cicatrización de los tejidos, por tal motivo, se propuso la realización de este estudio con el fin de obtener mayor información sobre el efecto de esta sustancia en la cicatrización de las úlceras bucales. **OBJETIVO:** evaluar el efecto del ácido ascórbico en úlceras bucales inducida en ratas BIOU: Wistar. **METODOLOGÍA:** se emplearon 28 ratas BIOU: Wistar a las cuales se generó una úlcera en la mucosa del carrillo izquierdo mediante un papel filtro circular impregnado de ácido acético al 70% durante 60 segundos, posteriormente se dividieron en un grupo experimental y un grupo control, ambos con 14 ratas y se les aplicó el gel de AA y gel placebo respectivamente a las 24, 48, 72 y 96 horas para realizar una evaluación clínica e histológica. **RESULTADOS:** en el grupo experimental hubo retardo de la cicatrización clínica e histológica en relación al grupo control, siendo significativas las diferencias clínicas a las 48 horas (sig. bilateral= 0,036). **CONCLUSIÓN:** el gel de AA aplicado de forma tópica no favorece la cicatrización de las úlceras bucales inducidas en ratas BIOU: Wistar.

**Palabras clave:** úlceras bucales, ácido ascórbico, cicatrización, ratas Wistar.

## INTRODUCCIÓN

La úlcera es la patología más común de la mucosa bucal y se define como una lesión elemental donde existe pérdida de sustancia en tejido epitelial y en tejido conjuntivo subyacente; manifestándose como una lesión única o múltiple, dolorosa, de pequeño tamaño, bordes localizados, redondeados, aro eritematoso periférico con base amarilla o grisácea que puede persistir durante días, incluso semanas, afectando el desempeño de actividades cotidianas del individuo que las presenta.

Clínicamente las úlceras bucales son características de diversas afecciones y generalmente se pueden clasificar en agudas y crónicas dependiendo de su duración; el tratamiento para estas lesiones está orientado a eliminar el agente que las origina y en la mayoría de los casos cuando su origen es idiopático, como en el caso de la estomatitis aftosa recurrente (EAR), consiste en aliviar la sintomatología y acelerar el proceso de cicatrización. No se ha determinado el uso de un medicamento o terapia específica que resulte totalmente efectiva para la curación de estas lesiones, por lo tanto se han descrito diferentes tratamientos farmacológicos, alternativos y naturales para la resolución de las mismas.

Entre los tratamientos que se han propuesto, la literatura describe terapias multivitamínicas que contienen ácido ascórbico (AA) o vitamina C empleada de forma sistémica y tópica para tratar estas lesiones, ya que dicha sustancia es un potente antioxidante que interviene en el crecimiento y reparación celular, función inmunitaria y producción de tejido conjuntivo. Sin embargo, hasta ahora se han encontrado pocos estudios que evalúen el efecto del AA tópico en el proceso de cicatrización de úlceras bucales y algunos resultados son contradictorios. Por lo tanto, se planteó realizar esta investigación para obtener mayor información sobre los efectos tópicos de esta sustancia en la cicatrización de úlceras bucales. Con este propósito se realizó un estudio dirigido a evaluar el efecto del AA en úlceras bucales inducidas en ratas BIOU: Wistar cuyos resultados podrán ser un aporte de información para la comunidad científica.

Este Trabajo Especial de Grado está estructurado en seis capítulos:

- Capítulo I planteamiento del problema: el cual comprende la definición y contextualización del problema, objetivos y justificación de esta investigación.
- Capítulo II marco teórico: en este capítulo se describen los antecedentes y bases conceptuales que fundamentaron este trabajo.
- Capítulo III marco metodológico: este capítulo comprende el enfoque, alcance y diseño de investigación, ejemplares biológicos, sistema de variables, técnicas e instrumentos de recolección de datos, prueba piloto, materiales, instrumental y equipos, procedimiento, principios bioéticos tomados en cuenta para el desarrollo de la investigación y análisis de resultados.
- Capítulo IV: presenta los resultados obtenidos en este estudio a través de gráficos y tablas.
- Capítulo V: presenta la interpretación de los resultados así como la confrontación de éstos con la literatura.
- Capítulo VI: incluye las conclusiones y recomendaciones que surgieron en este trabajo.
- Referencias consultadas para la ejecución de esta investigación

# CAPÍTULO I

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

### 1.1 Definición y contextualización del problema

Existen lesiones y enfermedades que pueden afectar el bienestar bucal del individuo<sup>1</sup>, como aquellas que comprometen los tejidos blandos a nivel de mucosa bucal, paladar duro y blando, lengua y piso de boca, limitando las actividades cotidianas, tales como la nutrición, comunicación y expresión; generando molestias, dolor y como consecuencia el deterioro de la calidad de vida<sup>2-4</sup>.

Dentro de estas lesiones se encuentran las úlceras bucales, las cuales son muy comunes, tienen varias causas y se caracterizan por ser dolorosas y representar un riesgo de infección<sup>5</sup>. En estas lesiones existe una pérdida de sustancia que afecta tanto al epitelio como al tejido conjuntivo subyacente y se encuentran sometidas a un proceso continuo de irritación debido a la acción de la saliva y de la microbiota bucal<sup>6</sup>.

Hay diferentes clasificaciones para las úlceras bucales, aunque la más aceptada las divide en agudas, a las de instauración brusca y corta duración; y crónicas a las de instauración insidiosa y larga duración<sup>6,7</sup>. Cabe destacar que no se ha llegado a un consenso sobre la duración que determina cuándo una úlcera pasa a ser crónica; sin embargo, las lesiones que tienen una duración mayor a dos semanas pudieran considerarse úlceras crónicas<sup>8,9</sup>. Tomando en cuenta la clasificación antes mencionada, dentro de las lesiones de tipo ulcerativas de naturaleza aguda se encuentra la EAR, las úlceras traumáticas, úlceras por infecciones virales y bacterianas. Los procesos que cursan con la aparición de úlceras bucales crónicas incluyen liquen plano erosivo, carcinoma oral de células escamosas y úlceras bucales asociadas a la ingesta de fármacos, como es el caso de los pacientes que reciben radio y quimioterapia<sup>10</sup>. Por lo tanto, es importante la realización de un correcto

diagnóstico diferencial para establecer el protocolo terapéutico adecuado en cada caso<sup>6</sup>.

Se considera importante identificar la etiología de estas lesiones integrando la historia de la enfermedad con la evaluación clínica de las mismas, lo que permitirá clasificarlas en alguna de las siguientes categorías: a) traumáticas; b) recurrentes; c) infecciosas; d) asociadas con padecimientos sistémicos y e) neoplásicas<sup>11</sup>.

En la literatura científica se presta especial atención a la descripción de la EAR ya que se destaca por ser el cuadro más frecuente de úlceras bucales y se reconoce como la enfermedad más común de la mucosa bucal<sup>2,5,6,11-23</sup> constituyendo una de las urgencias en el ámbito odontológico<sup>2</sup>. Tomando en cuenta la periodicidad, la intensidad y la persistencia con que se presenta la EAR, se ha definido, desde el punto de vista clínico, como una entidad que cursa con recurrencia y de etiología no bien precisada<sup>24</sup>.

La ocurrencia de esta afección, en general benigna, es considerada elevada debido a que aporta cifras de un 5 a 66% de la población general<sup>4-6,12,13,15,18,25-27</sup>. Algunos autores refieren que las mujeres son más susceptibles que los hombres<sup>13,18,25,27</sup>. Ninguna edad está exenta de esta lesión, por lo general es más frecuente en jóvenes<sup>13,15,18,25,27-29</sup>. Esta patología posee múltiples etiologías y consiste en lesiones inflamatorias de la mucosa bucal, que se caracterizan por ser ovaladas, circunscritas y presentar un halo eritematoso con un fondo amarillo-grisáceo. Pueden ser solitarias o múltiples<sup>4,11,30,31</sup> y generalmente se presentan en zonas no queratinizadas<sup>28,30</sup>.

En cuanto a los tratamientos de las úlceras bucales existen diferentes alternativas de acuerdo con la causa que ocasiona la lesión. Por ejemplo, en el caso de úlcera traumática principalmente se deben evitar los factores precipitantes que pudieran contribuir a la formación o severidad de la úlcera presente en cavidad bucal. De presentar enfermedades infecciosas de etiología viral, bacteriana o fúngica, se debe tratar la lesión con el adecuado fármaco antiviral, antibiótico o antifúngico respectivamente<sup>9</sup>. En el caso de úlceras de etiología no precisada como en la EAR se han realizado ensayos clínicos donde se evaluaron diversos tratamientos<sup>20,25,32-34</sup> que

permitieron acortar el período de permanencia y prolongar la remisión; sin embargo, debido a que se requiere de varios días de tratamiento para atenuar los síntomas, existe la duda de si la mejoría es un efecto del fármaco o de la propia evolución natural de la enfermedad, por lo tanto se presume que no se dispone de un medicamento específico que logre una curación total de la EAR<sup>28</sup>.

Se han propuesto terapias farmacológicas utilizando dexametasona y clorexhidina<sup>29</sup>; terapias naturales como el propóleo<sup>25</sup> y el *Aloe vera*<sup>35</sup>; y alternativas empleando laserterapia<sup>34-38</sup>. Mientras que otros autores han destacado el uso de terapias coadyuvantes en casos de úlceras persistentes y dolorosas, recomendando la utilización de analgésicos tópicos y suplementos proteínicos y vitamínicos<sup>29</sup>. Asimismo, se ha descrito el uso de terapias multivitamínicas<sup>39</sup>, vitamina B12<sup>15,32</sup> y vitamina C<sup>40</sup>.

Las vitaminas son nutrientes orgánicos, esenciales y vitales que deben formar parte de la dieta equilibrada para permitir el desarrollo, crecimiento y mantenimiento adecuado del organismo. Las vitaminas tienen múltiples funciones como cofactores enzimáticos en gran cantidad de procesos bioquímicos en nuestro organismo, uno de los cuales está relacionado con el proceso de cicatrización de las heridas<sup>41</sup>.

Dentro del grupo de vitaminas se describe el AA, el cual es necesario para la reparación y mantenimiento de cartílago, hueso y dientes<sup>42</sup>; a su vez tiene una función antioxidante<sup>42</sup>, antiinflamatoria<sup>43</sup> y cicatrizante<sup>44</sup>. Por ende se han desarrollado modelos experimentales que brindan diversas posibilidades de evaluar el efecto de esta vitamina en el proceso de cicatrización<sup>5,30,43,45-47</sup>.

En el ámbito odontológico, el AA se ha utilizado en diferentes terapias, como por ejemplo, en el tratamiento de la enfermedad periodontal<sup>48,49</sup>, en combinación tópica con dexametasona y  $\beta$ -glicerofosfato sódico para la conservación de hueso alveolar post extracción realizada en conejos<sup>50</sup> y en la cicatrización de tejidos blandos bucales en cobayos<sup>45</sup>. Asimismo, se empleó el AA de forma tópica en úlceras traumáticas provocadas en el dorso de la lengua de cobayos promoviendo la cicatrización en las etapas iniciales y dificultando la misma en las etapas finales<sup>51</sup>.

En un estudio clínico, se utilizó como terapia la combinación de AA con lignina

de pino por vía oral para prevenir y tratar las úlceras causadas por la infección del virus herpes simple tipo 1<sup>52</sup>. También se empleó AA de forma sistémica administrado por vía oral como tratamiento de la EAR en niños<sup>40</sup>. De igual manera se evaluó sistémicamente la acción del AA como terapia cicatrizante en una incisión provocada en mucosa bucal de cobayos<sup>53</sup>. Los estudios antes mencionados sugieren que el empleo de AA para la cicatrización de las lesiones es efectivo.

Por otra parte, se utilizó la vitamina C vía oral como tratamiento postquirúrgico de la cirugía de terceros molares mandibulares incluidos, donde ésta generó un proceso de cicatrización ligeramente más rápido aunque estadísticamente no significativo con respecto al grupo control<sup>54</sup>.

Aun cuando los resultados de estas investigaciones sugieren que el AA promueve la cicatrización en cavidad bucal, las evidencias sobre la efectividad de la aplicación tópica del AA como tratamiento para las úlceras bucales son insuficientes y en algunos casos sus resultados contradictorios, por lo tanto este estudio experimental en ratas BIOU: Wistar, estuvo orientado a evaluar el efecto del AA tópico en el tratamiento de las úlceras bucales.

## **1.2 Objetivos de la investigación**

### **1.2.1 Objetivo general**

Evaluar el efecto del ácido ascórbico en úlceras bucales inducidas en ratas BIOU: Wistar.

### **1.2.2 Objetivos específicos**

- Describir la evolución clínica de las úlceras bucales en el grupo experimental y en el grupo control.
- Comparar la evolución clínica de las úlceras bucales entre el grupo experimental y el grupo control.
- Describir los hallazgos histológicos de las úlceras bucales en el grupo experimental y en el grupo control.
- Comparar los hallazgos histológicos de las úlceras bucales entre el grupo experimental y el grupo control.

### **1.3 Hipótesis**

H<sub>1</sub>: el tratamiento con AA favorece el proceso de cicatrización de úlceras bucales.

H<sub>0</sub>: el tratamiento con AA no favorece el proceso de cicatrización de úlceras bucales.

### **1.4 Justificación**

Las úlceras bucales suelen ser dolorosas y son motivo de consulta frecuente<sup>55</sup>, ya que afectan el habla, la nutrición y afectan la calidad de vida de los pacientes<sup>10</sup>. La literatura cuenta con numerosos estudios que exponen las posibles causas, describiendo así su etiología multifactorial.

Debido a que el síntoma más relevante ocasionado por este tipo de lesiones es el dolor<sup>56-58</sup> y la molestia que causa en los pacientes durante el tiempo que se da el proceso de cicatrización, resultaría beneficioso identificar y estudiar una opción terapéutica que induzca la cicatrización de las úlceras bucales en un periodo más corto.

Por lo tanto, el presente estudio resulta de gran utilidad si se tiene en cuenta que en los últimos años un número considerable de investigaciones científicas se ha encaminado hacia la búsqueda de nuevas sustancias para el tratamiento de las úlceras bucales. Es por ello que teniendo en cuenta la propiedad cicatrizante que se le atribuye al AA y las ventajas de la administración tópica, se propone su uso como una posible alternativa para la disminución de la duración de estas lesiones en boca, ya que en la literatura se han encontrado pocos estudios que empleen el AA tópico como terapia para esta lesión; además, representaría una opción económica, de bajo riesgo y fácil aplicación.

Para evaluar el efecto terapéutico de esta vitamina se empleó un modelo experimental cuya metodología puede ser útil para el diseño de estudios relacionados con el tema objeto de investigación.

## **CAPÍTULO II**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **2.1 Antecedentes**

En este capítulo se recopilan diferentes estudios citados en orden temático, los cuales están divididos según la relación que guardan con el tema en estudio y organizados por subtítulos: efecto del AA en úlceras bucales y efecto del AA en heridas quirúrgicas en mucosa bucal.

##### **2.1.1 Efecto del ácido ascórbico en úlceras bucales**

Los estudios mencionados en este apartado guardan estrecha relación con esta investigación, ya que se describe el uso del AA en diferentes tipos de úlceras bucales.

Barbosa et al.<sup>51</sup> en el año 2004, analizaron histológicamente el proceso de reparación de las úlceras provocadas en la lengua de cobayos bajo la aplicación tópica de AA. Fueron utilizados 20 cobayos machos a los cuales se les indujo una úlcera de 3 mm de diámetro, alcanzando en profundidad la capa muscular por medio de un bisturí tipo punch. Posteriormente fueron divididos en dos grupos, un grupo experimental de diez animales al que se le aplicó AA tópico en polvo sobre la lesión, en un intervalo de 24 horas durante catorce días y un grupo control el cual no recibió tratamiento sobre la lesión. Luego del sacrificio de los animales se obtuvieron dos muestras histológicas tanto del grupo control como del grupo experimental al tercer, quinto, séptimo, noveno y décimo cuarto día. Los estudios histológicos realizados al tercer día revelaron que en el grupo experimental hubo regresión del proceso inflamatorio, recomposición del epitelio superficial y organización de los fibroblastos activos, al quinto día fue evidente la disminución de la vascularización en la lámina propia, se observó mayor número de fibroblastos y fibras musculares; sin embargo, a los siete días hubo un estancamiento en la evolución de la reparación. A partir del noveno día el inicio de la remodelación estaba más adelantado en el grupo control

con respecto al experimental. Por lo tanto los autores concluyen que la aplicación tópica del AA promovió en las fases iniciales el proceso de reparación mientras que en las etapas finales dificultó la cicatrización.

En el año 2010 Yasui et. al.<sup>40</sup> realizaron un estudio que permitió evaluar el potencial de la vitamina C para reducir la frecuencia de la EAR menor y la gravedad del dolor. Para esta investigación se seleccionaron 16 pacientes con EAR menor, a los cuales se les administró una dosis oral diaria de 2000 mg/m<sup>2</sup> de vitamina C durante tres meses. Antes de aplicar el tratamiento se obtuvo muestras de sangre venosa heparinizada de cada uno de los participantes, donde los neutrófilos fueron aislados, sedimentados y centrifugados para determinar la liberación de superóxido (O<sub>2</sub>), esta reacción se llevó a cabo durante cinco minutos con N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP) o con forbol-12-miristato-13-acetato (PMA). Durante el tratamiento con AA los datos demostraron que en el 94% de los pacientes se redujo en un 50% la frecuencia de la EAR menor ( $0.63 \pm 0.78$ ). Posterior a los tres meses de tratamiento, se interrumpió el mismo y la frecuencia de la EAR menor aumentó  $1.94 \pm 1.16$ . Por otra parte, el nivel del dolor de acuerdo con la escala de calificación numérica también disminuyó durante el periodo de tratamiento. En cuanto a los resultados obtenidos de las pruebas en sangre, los neutrófilos estimulados por FMLP generaron un aumento significativo de O<sub>2</sub> en pacientes con EAR menor, en comparación con los individuos sanos. En contraste, en los estimulados por PMA la producción de O<sub>2</sub> fue similar en cada grupo. Los autores concluyen que la vitamina C parece ser efectiva pero sus hallazgos fueron preliminares y recomiendan la reevaluación de dichos hallazgos a través de ensayos clínicos aleatorizados con muestras de mayor tamaño.

Gonzales et. al.<sup>52</sup> en el año 2009, llevaron a cabo un estudio clínico piloto en el que evaluaron la actividad del tratamiento con lignina de pino y AA en pacientes con virus herpes simple tipo 1 (VHS-1). En dicho estudio incluyeron 48 pacientes de ambos sexos entre 4 - 61 años de edad con lesiones activas de VHS-1, de los cuales 16 se encontraban en periodo prodrómico, 11 con lesiones eritematosas, 1 con edema/pápula, 13 con vesícula/pústula y 7 pacientes con lesión en estadio de úlcera.

Se administró de forma oral 1mg de lignina-AA tres veces al día durante un mes. Los pacientes que iniciaron este tratamiento las primeras 48 horas luego de presentar los síntomas no desarrollaron lesiones características del VHS-1 mientras que los pacientes que comenzaron el tratamiento más tarde, experimentaron una duración más corta de estas lesiones y una disminución de los síntomas en comparación con episodios anteriores. Por lo tanto, estos autores concluyeron que la combinación de la lignina de pino y AA tiene una potente actividad antiviral, promoviendo una cicatrización más rápida, la reducción de los síntomas y de la frecuencia de episodios de VHS-1.

### **2.1.2 Efecto del ácido ascórbico en heridas quirúrgicas**

En esta sección se describen estudios en los cuales se ha evaluado el efecto cicatrizante del AA en incisiones quirúrgicas y heridas post extracción en cavidad bucal.

Alas<sup>54</sup> en el año 2015 realizó una investigación en la que se pretendió determinar la efectividad de la vitamina C vía oral (500 mg) en la cicatrización de la incisión intersulcular posterior a cirugías de terceros molares mandibulares incluidos a través de un estudio clínico aleatorizado, simple ciego con muestra por conveniencia (n1= 30 y n2= 30) en el que cada sujeto sirvió de control de sí mismo, evaluando en un primer momento los resultados de las intervenciones sin vitamina C vía oral, realizadas en un cuadrante y posteriormente se evaluó las intervenciones realizadas en el cuadrante contralateral y con medicación de vitamina C vía oral. Los resultados arrojaron que al no utilizar vitamina C vía oral, el 76.7 % de los pacientes presentaba la herida cerrada al momento de retirar la sutura y al utilizar vitamina C vía oral solamente el 80 % había cerrado la herida. La diferencia entre ambos no es significativa ( $p= 0.75$ ). Por lo tanto el autor concluye que al realizar abordajes quirúrgicos de terceros molares mandibulares incluidos con incisión intersulcular, utilizando vitamina C vía oral, ofrece un proceso de cicatrización más rápido en el periodo post quirúrgico, aunque estadísticamente no significativo.

En el año 2014 Arévalo<sup>45</sup> realizó un estudio para determinar la efectividad del AA en la cicatrización de tejidos, en el cual se emplearon 28 cobayos y la muestra se dividió en un grupo de estudio (14 cobayos) al que se administró cuatro mega dosis de AA en forma subcutánea, y un grupo control (14 cobayos) al que no se administró AA. A los dos grupos se les realizó una incisión quirúrgica de 6 mm a nivel de la línea mucogingival en la región correspondiente a los incisivos inferiores y al octavo día se efectuaron cortes histológicos de 4 mm para su análisis. Los resultados indicaron que la administración de AA fue efectiva en un 66.7% disminuyendo los niveles de inflamación, evitando la infección en un 92.9% y al evaluar el grado de cicatrización la herida estaba cerrada en un 100% en el grupo de estudio, mientras que, el grupo de control presentó un 47.6% de inflamación, continuaron los procesos infecciosos en un 52.4% y la herida quedó cerrada en apenas un 35.7%. A su vez, en la evaluación histológica se valoró que la administración de AA si tuvo influencia en la proliferación de fibras colágenas en el grupo de estudio, no siendo así en el grupo de control donde se evidenció congestión de vasos sanguíneos así como de neutrófilos. La hipótesis de esta investigación fue confirmada demostrando que la administración en mega dosis de AA mejora el tiempo de cicatrización a siete días.

Otro estudio en el que se empleó el AA tuvo lugar en el año 2015, en éste Chen et. al.<sup>50</sup> evaluaron la eficacia de un inductor osteogénico (IO) que contenía dexametasona, vitamina C y b-glicerofosfato sódico en la cicatrización de heridas post extracción. Para realizar esta investigación se extrajeron los primeros premolares mandibulares bilaterales de 75 conejos de Nueva Zelanda, dicha muestra permitió evaluar un grupo en cuyas cavidades se implantaron esponjas de gelatina con el IO, otro grupo donde las esponjas de gelatinas no contenían el IO y en el último grupo no se implantó ningún tipo de esponja. Los resultados mostraron que en el grupo IO se logró una nueva y mejor formación ósea, así como también, una mayor cicatrización de las heridas y el mantenimiento de la altura del hueso alveolar post extracción. Por lo tanto el estudio concluyó que esta combinación podría ser un material de implante prometedor para la aplicación clínica humana debido a su rentabilidad, fácil adquisición y aplicación.

López<sup>53</sup> en el año 2017 realizó una investigación donde comparó la efectividad cicatrizante del AA (administrado por vía parenteral en dosis terapéutica y en megadosis) en la mucosa masticatoria de los cobayos. El grupo de estudio estuvo conformado por 30 cobayos (*Cavia porcellus*) divididos en tres grupos (A, B, C): A: megadosis 642.6 mg/4.26 ml en tres días/ dosis diarias de 214.2 mg/1.42 ml B: Dosis terapéutica 42,75 mg/0,285 ml en tres días/ dosis diarias de 14,25 mg/0,095 ml. C: Grupo control sin recibir AA. En los 30 cobayos se realizó una incisión de 5 mm de longitud subperióstica, siendo evaluada clínicamente durante cuatro días y posteriormente se tomó la muestra para el análisis histológico. Los resultados muestran que con megadosis mejora el temperamento en un 40% ya que al inicio del experimento, los cobayos eran agresivos y luego del tratamiento se mostraron más tranquilos, mejoró la hemorragia a la tracción del labio en un 50% y la presencia de heridas abiertas al tercer día post incisión en un 40% con respecto al grupo control. Se determinó que la megadosis de AA mejora la formación de fibroblastos en un 166% analizados a 10x y en un 139% los analizados a 40x y mejora en un 75% la formación de fibras colágenas; se determinó también que la dosis terapéutica de AA mejora la formación de fibroblastos en un 67% analizados a 10x, y en un 77% los analizados a 40x y mejora en un 25% la formación de fibras colágenas. Concluyendo que la acción del AA en megadosis y dosis terapéutica disminuye la cantidad de células inflamatorias en la zona cicatrizal y la inflamación a la observación clínica.

## **2.2 Bases conceptuales**

### **2.2.1 Mucosa bucal**

La cavidad bucal está tapizada por una membrana mucosa húmeda que forma la barrera estructural entre el cuerpo y el medio externo, denominada mucosa bucal. La humedad de esta mucosa es aportada por la secreción de saliva proveniente de las glándulas salivales.

La mucosa bucal está integrada por dos capas de tejido estructural y embriológicamente diferentes, el tejido epitelial, de origen ectodérmico y el tejido conjuntivo, de origen mesenquimatoso (lámina propia, corion o estroma).

Las dos capas están conectadas por una membrana basal, donde el tejido conjuntivo emite prolongaciones hacia el epitelio, denominadas papilas coriales, que son invaginaciones; mientras que el epitelio emite proyecciones hacia la lámina propia en forma de evaginaciones que reciben el nombre de crestas epiteliales. Esta disposición facilita la nutrición del epitelio avascular a partir del tejido conjuntivo que es de carácter vascular<sup>59</sup>.

### **2.2.2 Organización de la mucosa bucal**

La mucosa bucal, de acuerdo a su estructura, se clasifica en tres tipos: de revestimiento, masticatoria y especializada.

- La mucosa de revestimiento, es no queratinizada, flexible, de color rosado y reviste la parte interna de los carrillos, los labios, el paladar blando, la cara ventral de la lengua y el piso de la boca. La mucosa de la cara ventral de la lengua y del piso de la boca es la más vascularizada y delgada de toda la mucosa bucal.
- La mucosa masticatoria cubre estructuras inmóviles como las encías y el paladar duro, es paraqueratinizada, de color rosa pálido, es firme y gruesa debido a que se encuentra expuesta a las fuerzas compresivas y abrasivas de la masticación.
- La mucosa especializada es paraqueratinizada, se localiza en el dorso de la lengua y se encuentra asociada a la función gustativa gracias a las papilas localizadas en toda su superficie<sup>60</sup>.

### **2.2.3 Tejido epitelial**

El epitelio es un tejido avascular compuesto por células que recubren las superficies externas del cuerpo y revisten las cavidades internas cerradas (incluido el aparato cardiovascular) y los “tubos” que comunican con el exterior (aparatos digestivo, respiratorio y genitourinario).

El epitelio también forma la porción secretora (parénquima) de las glándulas y sus conductos excretores. Además, hay células epiteliales especializadas que funcionan como receptores sensoriales (olfato, gusto, oído y visión)<sup>61</sup>.

#### 2.2.3.1 Clasificación del tejido epitelial

La clasificación de los epitelios tiene su fundamento en dos factores: la cantidad de estratos celulares y la forma de las células más superficiales.

Los estratos celulares pueden ser:

- Simple: cuando tiene un solo estrato celular de espesor.
- Estratificado: cuando posee dos estratos celulares o más.

Las células individuales que componen el epitelio se describen como:

- Planas: cuando el ancho y la profundidad de la célula son mayores que su altura.
- Cúbicas: cuando el ancho y la profundidad son más o menos iguales que la altura.
- Cilíndricas: cuando la altura de las células es apreciablemente mayor que las otras dimensiones.

Un epitelio dado puede tener una función o más, según la actividad de los tipos celulares que contenga: secreción, absorción, transporte, protección, función receptora.

La cavidad bucal esta tapizada por epitelio estratificado plano, al igual que el esófago, epidermis y vagina; este epitelio cumple la función de barrera y protección<sup>61</sup> y puede ser clasificado desde el punto de vista histológico en tres tipos fundamentales.

- Epitelio estratificado plano ortoqueratinizado: en este epitelio se encuentra la capa basal, espinosa, granulosa y cornea.
- Epitelio estratificado plano paraqueratinizado: presenta características similares al epitelio ortoqueratinizado a nivel de los estratos basal, espinoso y granuloso, aunque este último presenta gránulos poco desarrollados. La diferencia fundamental está en los elementos celulares

del estrato corneo en el cual las células conservan sus núcleos y algunas organelas.

- Epitelio estratificado plano no queratinizado: en este epitelio no existe una capa cornea superficial y carece de estrato granuloso aunque se pueden formar gránulos incompletos<sup>59</sup>.

#### 2.2.3.2 Células del tejido epitelial

El epitelio de la mucosa bucal está constituido por dos poblaciones celulares:

1. Población intrínseca o propia del epitelio: formada por los queratinocitos los cuales constituyen alrededor del 90% de la población celular total del epitelio de la mucosa bucal y están destinados a queratinizarse en mayor o menor grado.

Los queratinocitos se pueden disponer en el epitelio formando cuatro capas o estratos: basal, espinoso, granuloso y corneo.

2. Población extrínseca: se subdivide de acuerdo con las células que la conforman.

- Población extrínseca permanente: representa el 9% de la población celular del epitelio y está constituida por los melanocitos, células de Merkel y células de Langerhans.
- Población extrínseca transitoria: representa alrededor del 1% del epitelio y está constituida por granulocitos, linfocitos y monocitos sanguíneos que pueden infiltrarse ocasionalmente en el epitelio bucal<sup>59</sup>.

#### 2.2.4 Tejido conjuntivo

El tejido conjuntivo está compuesto por células y una matriz extracelular que contiene fibras, sustancia fundamental y líquido hístico. Forma un compartimento vasto y continuo por todo el cuerpo que está separado por láminas basales de los diversos epitelios y por las láminas externas de las células musculares y de las células de sostén del sistema nervioso periférico<sup>61</sup>.

El tejido conjuntivo está formado por abundantes fibras colágenas, fibroblastos, vasos sanguíneos, glándulas salivales menores y glándulas sebáceas<sup>62</sup>.

#### 2.2.4.1 *Clasificación del tejido conjuntivo*

El tejido conjuntivo en el adulto se divide en dos subtipos:

- Tejido conjuntivo laxo
- Tejido conjuntivo denso, que además puede subclasificarse en dos tipos básicos según la organización de las fibras colágenas: tejido conjuntivo denso no modelado y tejido conjuntivo denso modelado<sup>61</sup>.

##### 2.2.4.1.1 *Tejido conjuntivo laxo*

El tejido conjuntivo laxo es un tejido conjuntivo celular con fibras colágenas delgadas y relativamente escasas. Presenta, además, abundante sustancia fundamental que ocupa mayor volumen que las fibras. Se encuentra principalmente debajo de los epitelios que tapizan la superficie externa del cuerpo y revisten cavidades internas.

Este tipo de tejido es el primer sitio donde los agentes patógenos que han penetrado a través de una superficie pueden ser atacados y destruidos por células del sistema inmunitario. La mayor parte de los tipos celulares presentes en el tejido conjuntivo laxo son células transitorias que migran desde los vasos sanguíneos locales en respuesta a estímulos específicos. En consecuencia, este tejido es el sitio de las reacciones inflamatorias e inmunitarias<sup>61</sup>.

##### 2.2.4.1.2 *Tejido conjuntivo denso no modelado*

El tejido conjuntivo denso no modelado o irregular se caracteriza por presentar abundantes fibras colágenas, escasez de sustancia fundamental y células. Las células que contiene son generalmente fibroblastos. Lo típico es que las fibras de este epitelio estén dispuestas en haces orientados en direcciones diferentes, que resisten las fuerzas tensoras que actúan sobre los órganos y estructuras<sup>61</sup>.

#### 2.2.4.1.3 Tejido conjuntivo denso modelado

El tejido conjuntivo denso modelado o regular se caracteriza por tener células y fibras ordenadas en haces paralelos muy juntos. Este tejido es el principal componente funcional de los tendones, ligamentos y las aponeurosis<sup>61</sup>.

#### 2.2.4.2 Células del tejido conjuntivo

Las células del tejido conjuntivo pueden ser de dos tipos:

1. Población celular residentes (fijas): son relativamente estables, es típico que se muevan un poco y pueden considerarse residentes permanentes del tejido. Entre estas células se encuentran: fibroblastos, miofibroblastos, macrófagos, adipocitos, mastocitos y células madre mesenquimáticas.
2. Población celular transitoria (libre o errante): consiste en células que han emigrado al tejido desde la sangre en respuesta a estímulos específicos. Estas células son: linfocitos, plasmocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y monocitos<sup>61</sup>.

#### 2.2.5 Cicatrización de la mucosa

Cuando el tejido sufre una injuria, el cuerpo reacciona generando nuevo tejido y da origen a lo que se conoce como cicatriz, esta puede variar en su aspecto clínico y el tiempo que tarde en formarse. El proceso de cicatrización depende de diversos factores como la edad del paciente, estado nutricional y enfermedades sistémicas. Clínicamente se considera una cicatriz normal o sin alteraciones si presenta las siguientes características: color semejante a la misma coloración de la piel o mucosa, herida lisa con bordes regulares y ausencia de procesos infecciosos<sup>63</sup>.

La cicatrización es un proceso dinámico mediado por proteínas solubles (citocinas y factores de crecimiento) y células encargadas de la proliferación celular para el restablecimiento del tejido lesionado. Normalmente la cascada de eventos que producen la reparación del tejido lesionado, se conduce por factores de crecimiento generados por las células implicadas en el proceso como queratinocitos, fibroblastos y células inflamatorias. Estos factores de crecimiento regulan la proliferación y la diferenciación celular y son importantes en el desarrollo embrionario, la regeneración

tisular y la reparación. Muchos de estos factores actúan en cada una de las etapas del proceso de cicatrización<sup>64</sup>.

El proceso de cicatrización se lleva a cabo a través de 3 fases principalmente; fase inflamatoria, fase proliferativa y fase de remodelación.

Fase inflamatoria: esta fase se inicia por medio de la hemostasia, la cual induce la inflamación mediante la permeabilidad vascular y quimiotaxis, en la cual participan las proteínas encargadas de la regularización y duración de la respuesta inflamatoria e inmunológica ante una injuria. La formación del tampón plaquetario, obtenido con la fibronectina, permite la llegada de neutrófilos, macrófagos, linfocitos, células endoteliales y fibroblastos; además permite el contacto entre el colágeno y las plaquetas, alcanzando un máximo a las 24 o 48 horas<sup>63</sup>. A su vez, los monocitos acuden mediante la señal de quimiotaxis, los cuales están encargados de sustituir a los polimorfonucleares en la herida tras las 48 horas de haber ocurrido la lesión convirtiéndose en macrófagos, produciendo la liberación de factores de crecimiento lo cual favorece la fase de granulación<sup>65</sup>; entre los factores de crecimiento, se destacan por su actividad el TGF- $\beta$ , PDGF y factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), junto con interleucinas implicadas en la inflamación<sup>64</sup>. Una fase inflamatoria insuficiente, aumentada o prolongada en el tiempo puede provocar el retraso del cierre de la herida y aumentar el riesgo de infección<sup>66</sup>.

Fase proliferativa: luego de 2 ó 3 días de haberse producido la herida los fibroblastos actúan determinando el inicio de la fase proliferativa, aun antes que la fase inflamatoria haya concluido. Todos los pasos que ocurren en esta fase no son sucesivos pues ocurren simultáneamente<sup>67</sup>. Los fibroblastos y las células endoteliales son las últimas poblaciones que infiltran las heridas; las citocinas y los factores de crecimiento que inducen la proliferación de estos grupos de célula, provienen de las plaquetas y macrófagos<sup>63</sup>, sobresaliendo el factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento de los queratinocitos (KGF), factor de crecimiento de los fibroblastos básico (bFGF), factor de necrosis tumoral (TNF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento nervioso (NGF) y factor de crecimiento insulínico (IGF)<sup>64</sup>.

Fase de remodelación: en esta etapa se reemplazan las fibras de colágeno depositadas al azar por nuevas fibras de colágeno, orientadas de modo tal que resisten mejor las fuerzas de tracción que caen sobre la herida, pero no alcanza la resistencia de un tejido sano. Conforme el metabolismo de la herida disminuye la vascularización también lo hace, por lo que el eritema va redimiendo. La contracción de la herida inicia terminando la fase proliferativa y continúa hasta poco después de iniciada la etapa de remodelación. La contracción consiste en que los bordes de la herida migran uno hacia el otro por lo que la herida disminuye su tamaño<sup>68</sup>. La fase de remodelación es conducida por factores como: factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF), KGF, EGF, bFGF, TGF- $\beta$  y PDGF<sup>64</sup>.

#### 2.2.5.1 *Cicatrización por primera intención*

La cicatrización por primera intención ocurre durante las primeras 12-24 horas después de haber sido cerrada la herida, al aproximar sus bordes con suturas o algún dispositivo mecánico<sup>64</sup>. Los márgenes de la herida están en contacto, es decir, tiene los planos cerrados, estando suturada o no, por lo tanto los bordes de la herida en la cual no ha ocurrido pérdida de tejido son colocados en la posición anatómica exacta en que se encontraban antes de la lesión. La herida se repara con una mínima formación de cicatriz<sup>69</sup>.

Este proceso de cicatrización requiere de una menor epitelización, depósito de colágeno, contracción y remodelación. Por lo tanto, la cicatrización ocurre mucho más rápido, con un bajo riesgo de infección y con una menor formación de cicatriz que en las heridas que lo hacen por segunda intención<sup>69</sup>.

#### 2.2.5.2 *Cicatrización por segunda intención*

La cicatrización por segunda intención ocurre cuando los bordes de la herida no han sido afrontados y aparece en este caso un tejido de granulación que no es más que la proliferación conjuntiva y vascular. En este proceso la epitelización se efectúa de una manera más lenta a través de dos vías: centrípeta es decir, de los bordes de la herida hacia el centro partiendo de los islotes epiteliales, y centrífuga de los islotes hacia la periferia<sup>69</sup>.

En este tipo de cicatrización existe pérdida de tejido por lo que hay una brecha entre los bordes de la herida, esta cicatrización se da regularmente en tejidos poco flexibles, cuyos bordes no se pueden aproximar, en este caso se requiere de la migración de gran cantidad de epitelio, deposición de colágeno, contracción y remodelación. Su evolución es muy lenta y genera una cicatriz de mayor tamaño que en el caso de la cicatrización por primera intención existiendo un mayor riesgo de infección en la herida<sup>69</sup>.

En síntesis, independientemente de la aproximación o no de los bordes, el proceso de reparación es igual, se puede resumir como la formación y maduración del tejido de granulación con migración de los bordes epiteliales, la diferencia radica en que por primera intención se acelera el proceso en cuanto al tiempo de curación, al ser menor el espacio entre los márgenes de la herida<sup>69</sup>.

## **2.2.6 Colágeno**

### *2.2.6.1 Fibras colágenas*

Las fibras colágenas son las más abundantes del tejido conjuntivo, son flexibles y tienen una resistencia tensora notable. Con la microscopía electrónica de transmisión las fibras colágenas aparecen como haces de subunidades filamentosas finas. Estas subunidades son las fibrillas colágenas, las cuales exhiben un patrón de bandas transversales con una periodicidad de 68 nm. Este patrón de bandas es un reflejo de la estructura en subunidades de la fibrilla y, específicamente del tamaño y la forma de la molécula de colágeno y la disposición de las moléculas que forman la fibrilla. La molécula de colágeno mide alrededor de 300 nm de longitud y 1,5 nm de diámetro y tiene una cabeza y una cola. Al formar la fibrilla las moléculas de colágeno se alinean cabeza con cola en hileras que se superponen con brechas entre las moléculas de cada hilera y un desfase de un cuarto de molécula entre hileras continuas<sup>61</sup>.

### *2.2.6.2 Molécula de colágeno*

La molécula de colágeno individual está formada por tres cadenas polipeptídicas (cadenas  $\alpha$ ) que se enroscan y dan origen a una triple hélice. Cada tercer aminoácido de la cadena es una glicina, excepto en los extremos de las cadenas  $\alpha$ . Una molécula de

hidroxiprolina o una hidroxilisina con frecuencia precede a cada glicina de la cadena y cada glicina suele ser seguida por una prolina.

Las cadenas  $\alpha$  no son todas iguales, hasta ahora se han podido categorizar hasta 27 tipos de colágeno teniendo en cuenta las combinaciones de cadenas  $\alpha$  que contienen. Según el tipo específico de molécula de colágeno, esta puede ser homotrimétrica (compuesta por tres cadenas  $\alpha$  idénticas) o heterotrimétrica (formada por dos o hasta tres cadenas  $\alpha$  distintas)<sup>61</sup>.

Entre los tipos de colágeno se describen el colágeno tipo I, que se encuentra en tejidos conjuntivos laxo y denso, es heterotrimétrico y el colágeno tipo II el cual, está presente en los cartílagos hialino elástico, en donde aparece en la forma de fibrillas muy finas y es homotrimétrico<sup>61</sup>.

#### 2.2.6.3 Biosíntesis de colágeno

La síntesis de colágeno fibrilar comprende una serie de acontecimientos dentro del fibroblasto que conduce a la generación de procolágeno, el precursor de la molécula de colágeno. Estos acontecimientos ocurren en orgánulos limitados por membrana dentro de la célula. La formación de la fibrilla propiamente dicha se produce fuera de la célula y comprende actividad enzimática en la membrana plasmática para producir la molécula de colágeno<sup>61</sup>.

##### 2.2.6.3.1 Acontecimientos intracelulares

Los pasos de la biosíntesis de casi todos los colágenos fibrilares son semejantes pero los del colágeno de tipo I son los que se han estudiado con más detalle. Las características singulares de la biosíntesis de colágeno están expresadas en las etapas de procesamiento postraduccionales que son necesarias con el fin de preparar la molécula para el proceso de armado extracelular.

Los polirribosomas del retículo endoplasmático (RER) sintetizan las cadenas  $\alpha$  de colágeno en forma de precursores con propéptidos globulares grandes en los extremos aminoterminal y carboxiloterminal, llamadas cadenas pro- $\alpha$  (moléculas de procolágeno). Dichas cadenas polipeptídicas pasan a las cisternas del RER, en donde comienza el procesamiento intracelular que consiste en:

- La escisión de la secuencia de señal aminoterminal.
- La hidroxilación de residuos de prolina y lisina. El AA es un cofactor necesario para la adición de grupos hidroxilo a los residuos de prolina y lisina en las cadenas pro- $\alpha$  por las enzimas prololhidroxilasa y lisilhidroxilasa; sin la hidroxilación postraducional de la prolina y la lisina no pueden formarse los enlaces de hidrógeno indispensables para alcanzar la estructura definitiva de la molécula de colágeno. Esto explica por qué las heridas no curan y la osificación está alterada en el escorbuto (deficiencia de vitamina C).
- La adición de grupos sacáridos a algunos residuos de hidroxilisina (glucosilación) y a las dos posiciones terminales.
- La formación de la estructura globular en el extremo carboxiterminal, la cual asegura la alineación correcta de las tres cadenas  $\alpha$  durante el armado de la hélice triple.
- La formación (con inicio en el extremo carboxiterminal) de una hélice triple por tres cadenas  $\alpha$ , excepto en los extremos terminales en donde las cadenas polipeptídicas permanecen sin enrollarse.
- La formación de enlaces de hidrógeno y disulfuro que ejercen influencia sobre la forma de la molécula.
- La estabilización de la molécula helicoidal triple (molécula de procolágeno).
- El embalaje del procolágeno en vesículas de secreción en el aparato de Golgi.
- El movimiento de las vesículas hacia la membrana plasmática asistidas por microfilamentos y microtúbulos.
- La exocitosis del procolágeno<sup>61,70</sup>.

#### 2.2.6.3.2 Acontecimientos extracelulares

El procolágeno es convertido en una molécula de colágeno madura para posteriormente ser aglomeradas y alineadas para formar las fibrillas colágenas

definitivas en un proceso conocido como fibrilogénesis. La célula controla la disposición ordenada de las fibrillas neo-formadas al dirigir las vesículas de secreción hacia un sitio focalizado de la superficie celular para que ocurra la exocitosis. Al mismo tiempo, la célula forma en su superficie una indentación o receso para permitir que las moléculas se concentren en el sitio donde ocurrirá el armado. En este receso de la superficie celular las moléculas de colágeno se alinean en hileras y se autoensamblan longitudinalmente cabeza con cola. También se aglomeran lateralmente, escalonadas en un cuarto de molécula. Luego las moléculas de colágeno establecen enlaces cruzados entre sí por medio de uniones covalentes que se forman entre los grupos aldehído de la lisina y la hidroxilisina. La biogénesis del colágeno determina la formación de polímeros muy bien organizados que reciben el nombre de fibrillas<sup>61</sup>.

#### 2.2.6.4 *Interacciones complejas de la cicatrización*

La mayoría de las moléculas de colágeno son sintetizadas por las células del tejido conjuntivo y las moléculas de colágeno de la membrana basal son producidas por las células epiteliales. La síntesis del colágeno es regulada por interacciones complejas entre factores de crecimiento, hormonas y citocinas. Por ejemplo, el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) estimulan la síntesis de colágeno por los fibroblastos mientras que las hormonas corticoides (glucocorticoides) la inhiben<sup>61</sup>.

#### 2.2.7 **Úlceras bucales**

Las úlceras son lesiones que se manifiestan por destrucción del epitelio o el corion, de tamaño y profundidad variables<sup>71</sup>, son lesiones elementales en las que hay una pérdida de sustancia que afecta tanto al epitelio como al tejido conjuntivo subyacente<sup>6</sup>, son motivo de consulta frecuente y suelen localizarse en la mucosa bucal (labios, lengua, piso de la boca, paladar blando, úvula, etc.) y faríngea. La lesión primitiva no es ni una vesícula ni una ampolla, sino directamente la pérdida de tejido debida a una necrosis epitelial que sobrepasa la membrana basal, exponiendo

terminaciones nerviosas lo que provoca molestias o dolor. Si alcanzan gran tamaño, pueden dejar una cicatriz después de su curación<sup>55</sup>

Clínicamente cursan como lesiones dolorosas, de tamaños variables, redondos u ovalados y de bordes limpios, el fondo necrótico está cubierto por un exudado fibrinoso blanco-amarillento.<sup>55</sup> y su periferia está enmarcada por un ribete o halo rojo de origen inflamatorio<sup>72</sup>.

Una vez que se forma una úlcera estará sujeta a un proceso continuo de irritación debido a la acción de la saliva y de la microbiota bucal, lo cual favorece que una lesión inflamatoria aguda se cronifique<sup>6</sup>.

#### 2.2.7.1 Etiología

La etiología de la ulceración bucal puede estar relacionada con distintos procesos infecciosos, enfermedades mucocutáneas, neoplasias, enfermedades gastrointestinales, alteraciones sanguíneas, enfermedades reumatológicas, consumo de fármacos, traumatismos y de origen idiopático (EAR.)<sup>72</sup>.

#### 2.2.7.2 Clasificación

Se han descrito diversas clasificaciones de úlceras bucales, dentro de las cuales se puede mencionar la realizada por Ortiz y Chimenos<sup>11</sup> quienes toman en cuenta las posibles etiologías de dichas lesiones para agruparlas en:

- Traumática
- Neoplásica
- Aftas recurrentes: EAR, síndrome de Behçet, síndrome de Sweet, síndrome MAGIC, síndrome de fiebre periódica, faringitis, adenitis cervical y neutropenia cíclica
- Sistémica: enfermedades mucocutáneas (liquen plano, pénfigo, penfigoide, eritema multiforme, epidermolisis bullosa, dermatitis herpetiforme)
- Enfermedades del tejido conjuntivo y otras enfermedades (lupus eritematoso, síndrome de Reiter)
- Enfermedades gastrointestinales (enfermedad celíaca, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn)
- Alteraciones psicológicas (estrés o ansiedad)

- Procesos fisiológicos (menstruación, embarazo, menopausia)
- Alergias alimentarias
- Reacciones adversas a medicamentos

Las úlceras bucales también pueden clasificarse en agudas, es decir, aquellas de instauración brusca y corta duración; y crónicas, de instauración insidiosa y larga duración. Bascones et al.<sup>6</sup> clasifican las úlceras bucales de la siguiente manera.

Úlceras bucales agudas:

- Úlcera traumática
- Estomatitis aftosa recurrente
- Infecciones virales
- Infecciones bacterianas
- Sialometaplasia necrosante

Úlceras bucales crónicas:

- Liquen plano erosivo
- Úlceras asociadas a la ingesta de fármacos
- Carcinoma de células escamosas
- Penfigoide mucoso
- Pénfigo vulgar
- Gingivitis descamativa

A continuación se hace referencia al tipo de úlcera más frecuente de la mucosa bucal, como lo es la EAR:

#### 2.2.7.2.1 *Estomatitis Aftosa Recurrente*

La estomatitis aftosa recurrente es la enfermedad ulcerosa más común de la mucosa bucal. Se caracteriza por la aparición de una o varias úlceras (aftas) dolorosas, inicialmente necróticas, cubiertas por una pseudomembrana blanca o grisácea y rodeadas por un halo eritematoso bien definido.

Las lesiones suelen afectar a la mucosa bucal no queratinizada, pueden persistir durante días o semanas y recurren después de periodos muy variables. La EAR afecta aproximadamente a 20% de la población general, aunque algunos estudios indican

una prevalencia de 5 a 60%, dependiendo del grupo étnico y socioeconómico. Son lesiones comunes en pacientes entre los 10 y 40 años de edad; tienen predilección por el sexo femenino y por individuos de nivel socioeconómico alto.

La respuesta inmunitaria en la EAR se caracteriza por la estimulación antigénica de los queratinocitos, que favorece la activación de los linfocitos T, y la participación de inmunoglobulinas, inmunocomplejos circulantes, citocinas y moléculas de adhesión. Lo antes mencionado da lugar a la acumulación de linfocitos y al desarrollo de una respuesta citotóxica que induce la aparición de úlceras en la mucosa bucal<sup>73</sup>.

La EAR es considerada un proceso multifactorial en el que se unen diversos factores desencadenantes y una alteración inmunológica de base. Actualmente la etiopatogenia de la EAR no es completamente conocida, aunque su aparición ha sido relacionada con diversos factores, destacando los factores genéticos con antecedentes familiares asociados a esta enfermedad. Otros factores relacionados son alergia alimentaria, trauma local, cambios hormonales, estrés, ansiedad, deficiencias nutricionales, agentes infecciosos y diversas enfermedades sistémicas<sup>73</sup>.

#### 2.2.7.3 *Hallazgos histológicos de la úlcera bucal*

El fondo de la ulceración está cubierto de un exudado fibrinopurulento. En su periferia se observa un infiltrado celular, compuesto por polimorfonucleares, neutrófilos y linfocitos. El infiltrado inflamatorio denso, en el corion subepitelial, está compuesto de linfocitos, monocitos y macrófagos. Los vasos están dilatados y el infiltrado perivascular presenta células mononucleadas<sup>74</sup>.

#### 2.2.7.4 *Fisiopatología de la úlcera bucal*

Un estímulo antigénico puede desencadenar una reacción citotóxica contra las células epiteliales de la mucosa, como consecuencia, puede producir la muerte de los queratinocitos y una reacción inflamatoria en la que estarían implicadas células como polimorfonucleares, neutrófilos, macrófagos, mastocitos, linfocitos T CD y citocinas como la interleucina (IL) 2, el interferón-c (IFN-c) y el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )<sup>74</sup>.

En los pacientes que padecen úlceras, el estudio de las citocinas IL2, IFN-c y TNF- $\alpha$  muestra diferencias significativas con los controles: las concentraciones

plasmáticas de IL2 y la expresión de los receptores de esta citocina están aumentados en los linfocitos periféricos activados. A su vez, se ha podido demostrar que la síntesis de IFN- $\gamma$  es producida por los linfocitos T CD estimados y los monocitos sanguíneos periféricos estimulan la secreción de TNF- $\alpha$ , por lo tanto esta citocina se encuentra presente en las células del infiltrado inflamatorio y en los vasos de la mucosa lesionada<sup>74</sup>.

#### 2.2.7.5 *Estrés oxidativo y su relación con las úlceras bucales*

La ruptura del equilibrio que se establece entre sustancias antioxidantes y oxidantes a beneficio de los radicales libres es el factor llamado estrés oxidativo. De manera que es necesario saber que el exceso de oxígeno resulta potencialmente peligroso debido a la formación de sustancias reactivas del oxígeno<sup>75</sup>.

En las células aerobias existen diferentes vías que conducen a la formación de radicales libres derivados del oxígeno, basados en sus fuentes principales asociadas al metabolismo del ácido araquidónico, ciclooxigenasa, lipoxigenasa y el citocromo P-450. La presencia de enzimas superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasas elimina productos secundarios de la vía univalente en las células aerobias, y sugiere que los aniones superóxidos y el peróxido de hidrógeno son productos metabólicos importantes del metabolismo oxidativo, que en su conjunto producen lesión de macromoléculas como el ADN, los hidratos de carbono y las proteínas<sup>75,76</sup>.

En los pacientes que cursan con úlceras de tipo EAR, se ha realizado determinación en suero y en saliva para medir el nivel de peroxidación lipídica y el estado de las vitaminas antioxidantes. El grado de peroxidación lipídica, medido a través de los niveles de malondialdehído está aumentado en los sujetos con aftas y enfermedad periodontal<sup>75,76</sup>.

Por consiguiente es necesario evitar las causas que desencadenan o promueven la inflamación, tales como el trauma y la sepsis oral, a su vez considerar la administración de antioxidantes como coadyuvantes en la terapéutica de esta patología<sup>76</sup>.

### 2.2.8 Ácido Ascórbico

El AA es una vitamina hidrosoluble y esencial, sintetizada químicamente a partir de glucosa, mediante una serie de reacciones catalizadas por enzimas, siendo la L-gulonolactona oxidasa (GLO) la última enzima involucrada en su síntesis. Los cobayos, murciélagos frugívoros, algunas aves (bulbul de orejas rojas), ciertos primates y los hombres no poseen la capacidad de sintetizar AA debido a la ausencia de GLO<sup>77</sup>.

El AA (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>) tiene un peso molecular de 176,13 Da, es hidrosoluble y posee propiedades ácidas y fuertemente reductoras. Tales propiedades se deben a su estructura enediol y a la posibilidad de ionizar el hidroxilo situado sobre el carbono 3, formando un anión que queda estabilizado por resonancia. Eventualmente, puede disociarse el hidroxilo del carbono 2, formando un dianión, aunque no adquiere la misma estabilidad que la del carbono 3. La forma natural de la vitamina es el isómero L que posee propiedades nutricionales; el isómero óptico del carbono 4 D- tiene alrededor de 10% de la actividad del isómero L- pero sin fines vitamínicos al igual que el isómero óptico del carbono 5, el ácido iso-ascórbico<sup>77</sup>.

De forma natural el AA puede obtenerse a partir de frutas cítricas, tomates, fresas, vegetales verdes, repollo, papas, entre otros. Los jugos de naranja y limón son fuentes con alto contenido de esta vitamina y contienen alrededor de 0.5 mg/ml. El AA se destruye con facilidad por calor, oxidación y álcalis. Además de su participación en la nutrición, el AA suele utilizarse como un antioxidante para proteger el sabor y color natural de muchos alimentos<sup>54</sup>.

#### 2.2.8.1 Absorción del ácido ascórbico

El AA se absorbe en el intestino delgado por un proceso activo dependiente de sodio, siendo SVTC-1 (*sodium-dependent vitamin C transporter 1*) el transportador que tiene selectividad para el isómero L del AA y el ácido L-dehidroascórbico (ADA), pero no para glucosa. Debido a su estructura química el AA es muy sensible a la degradación. Numerosos factores influyen en los mecanismos degradativos, entre ellos el pH, la concentración de oxígeno, las enzimas, los catalizadores metálicos, la concentración inicial del ácido y la relación AA - ADA<sup>77</sup>.

#### 2.2.8.2 *Degradación del ácido ascórbico*

La degradación del AA se lleva a cabo mediante procesos oxidativos que resultan de la transferencia de dos electrones. Primeramente se origina el monoanión ascorbato (AH<sup>-</sup>), el cual, con la pérdida adicional de un segundo electrón, forma el ADA, altamente inestable y susceptible a la hidrólisis del anillo lactona que se hidroliza con gran facilidad para producir ácido 2,3-dicetogulónico (DCG), que posteriormente se degrada por decarboxilación, con la consiguiente pérdida del valor nutricional del AA. Hay tres vías de degradación del AA, la vía oxidativa catalizada, la vía oxidativa no catalizada y la vía bajo condiciones anaeróbicas. La vía oxidativa catalizada está influenciada por la presencia de oxígeno e iones metálicos como hierro (Fe<sup>3+</sup>) y cobre (Cu<sup>2+</sup>) que actúan acelerando la velocidad de la reacción. El AA se degrada fundamentalmente vía su monoanión (AH<sup>-</sup>), rindiendo ADA. La velocidad de esta reacción depende de la concentración del catalizador metálico en presencia de oxígeno. Si la presión parcial de oxígeno disminuye, la reacción se estabiliza y posiblemente exista una oxidación directa por radicales hidroperóxidos (HO<sub>2</sub>·) o peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)<sup>77</sup>.

#### 2.2.8.3 *Funciones del ácido ascórbico*

El AA es una conocida vitamina hidrosoluble a la que se le han atribuido múltiples efectos y aplicaciones, tanto a través de su uso tópico como sistémico<sup>78</sup>. El AA es un nutriente esencial para la síntesis de colágeno del tejido conjuntivo, ayuda en la absorción de hierro proveniente de alimentos de origen animal, interviene en el metabolismo de las proteínas y tiene una función antioxidante y cicatrizante<sup>44</sup>.

Su acción antioxidante se considera importante en la prevención de la lesión celular que se produce cuando el organismo consume oxígeno, además ayuda al mantenimiento de los vasos sanguíneos e interviene en centenares de procesos corporales esenciales, entre ellos el crecimiento y la reparación de las células y la producción de tejido conjuntivo<sup>45</sup>. Asimismo, al interactuar con otros micronutrientes ayuda a revertir el daño potencial causado por los radicales libres a nivel celular y modula funciones de las células inmunes a través de la regulación de factores de

transcripción sensibles a redox y afecta a la producción de citocinas y prostaglandinas, que mantienen una respuesta inmune efectiva<sup>79</sup>.

Por otra parte, también se han descrito situaciones en que se comporta como un peligroso compuesto pro-oxidante, ya que en determinadas condiciones fisiológicas puede generar radicales libres; en tal sentido, se ha observado que la vitamina C tiene la propiedad de reaccionar con metales de transición como el cobre y el hierro, a través de un proceso que comprende la formación de compuestos intermedios los que posteriormente conducen a la formación de radicales hidroxilos que son moléculas de elevada reactividad conforme lo refiere su vida media que es aproximadamente  $1 \times 10^9$  segundos; es decir, participa en reacciones controladas por difusión y tienen la propiedad de dañar proteínas, lípidos y ácidos nucleicos<sup>80</sup>.

Se ha demostrado que la vitamina C es necesaria para la síntesis de hidroxiprolina, el cual es un elemento indispensable para la formación de colágeno tipo I, proteína fundamental para la cicatrización de heridas<sup>81</sup>, así mismo participa en el metabolismo de la noradrenalina, transformación del triptófano en serotonina, metabolismo del ácido fólico y en la protección de vitaminas A y E, cambio de hierro férrico en hierro ferroso, prevención de infecciones, respiración intracelular, metabolismo de la tirosina, estructuras intercelulares de huesos, dientes y cartílagos<sup>54</sup>. Tal es la importancia del AA en la síntesis del colágeno tipo 1 que su disminución sérica por debajo de 300 mg/L causa un déficit de tejido conjuntivo y una deficiente cicatrización de heridas<sup>81</sup>

Asimismo, esta vitamina resulta esencial para el buen funcionamiento del sistema inmunológico por su participación en la actividad de los linfocitos, neutrófilos, fagocitos, anticuerpos y en la producción de interferón. Además actúa en las reacciones inflamatorias ayudando a sintetizar inmunoglobulina para controlarlas<sup>82</sup> y se ha descrito que inhibe los efectos de las citocinas pro inflamatorias como el VEGF y el TNF- $\alpha$ <sup>81</sup>.

#### 2.2.8.4 *Vía de administración*

El AA puede ser administrado tanto por vía parenteral como por vía oral, pero esta última pudiera presentar efectos adversos como náuseas, diarrea y vómito, por

ello se prefiere su administración parenteral, mejorando también la concentración sérica que supera en 30 a 70 veces la concentración alcanzada por vía oral aumentando su efecto terapéutico<sup>81</sup>. Asimismo, en situaciones que evitan la absorción adecuada a partir del tubo digestivo, pueden proporcionarse soluciones por vía parenteral<sup>54</sup>.

#### 2.2.8.5 *Déficit de ácido ascórbico*

Una forma severa de deficiencia de AA se conoce como escorbuto, donde el problema se produce en la síntesis del colágeno, ya que el AA es un cofactor esencial en este proceso, donde hay una disminución en la síntesis de pro-colágeno y una reducida hidroxilación de los residuos prolina y lisina<sup>77</sup>.

La ingesta recomendada de esta vitamina es de 75 a 90 mg/día y su deficiencia prolongada podría ocasionar escorbuto, cuyo cuadro clínico denota gingivitis, dolor e inflamación de articulaciones, debilidad muscular, fragilidad de los vasos capilares, micro hemorragias, por consiguiente anemia y podría tener consecuencias mortales si el requerimiento vitamínico no es compensado<sup>44</sup>.

#### 2.2.8.6 *Interacción con otros fármacos*

Al interactuar la vitamina C con warfarina esta última disminuye su actividad anticoagulante, por ello es que se recomienda que la administración de vitamina C se reduzca a 1 g/día para evitar así trastornos de la coagulación. En cuanto a su eliminación se sabe que cuando se administra más de 3 g por vía intravenosa el riñón elimina su exceso a través de la orina lo cual se relaciona con una mayor incidencia de cálculos renales<sup>81</sup>.

### 2.2.9 **Modelo experimental de úlcera bucal inducida por ácido acético**

Fujisawa et al. en el año 1998 fueron los primeros en diseñar un modelo animal para la inducción de úlceras bucales empleando ácido acético<sup>83</sup>. Con base en ese modelo algunos estudios han utilizado esta sustancia de forma tópica para generar la lesión<sup>5,10,30,46,47,84</sup> y en otras investigaciones una inyección de ácido acético en la mucosa<sup>10,85-88</sup>; ambos métodos de inducción han sido usados en diferentes ejemplares biológicos, como conejos<sup>5,30,46,47,84</sup>, hámsteres<sup>87,88</sup>, ratas<sup>10,86,89,90</sup> y ratones<sup>85</sup>.

El ácido acético es capaz de producir úlceras en mucosa bucal<sup>86,89,90</sup> y algunos de los modelos anteriormente descritos han llegado a simular lesiones como estomatitis<sup>87</sup> y mucositis<sup>85,88</sup>. La úlcera producida por el ácido acético se manifiesta con el aumento de células proinflamatorias, producción de citocinas, exceso de óxido nítrico, generación de prostaglandinas y aumento de apoptosis de las células epiteliales<sup>89</sup>.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## **CAPÍTULO III**

### **MARCO METODOLÓGICO**

Una vez enunciado el problema de investigación, establecidos los objetivos y conceptualizadas las bases teóricas que fundamentaron el estudio, se presenta la metodología empleada con el fin de alcanzar los objetivos propuestos. En esta sección se describen los tópicos relacionados con la metodología de este trabajo, tales como, enfoque, alcance y diseño de investigación. De igual forma se mencionan los ejemplares biológicos que fueron utilizados, las variables, técnica e instrumentos de recolección de datos, materiales, procedimiento, cronograma de actividades y el análisis estadístico realizado.

#### **3.1 Enfoque, alcance y diseño de investigación**

Este estudio tiene un enfoque cuantitativo debido a que se utilizaron métodos de recolección y análisis de datos para responder las preguntas de investigación, utilizando medición numérica, conteo y uso de la estadística<sup>91</sup>. En esta investigación se midió la aproximación de los bordes de la úlcera inducida y se realizó un estudio histológico para evaluar el grado de cicatrización.

El alcance de esta investigación es explicativo debido a que se expresaron las causas de relación entre las variables por medio de la descripción de las mismas<sup>91</sup>, en este sentido se evaluó el efecto cicatrizante del AA en las úlceras bucales.

Por su parte, el diseño de esta investigación es experimental debido a que se estableció el posible efecto de una variable que se manipula, se considera experimento puro ya que para lograr el control y validez interna, se establecieron grupos de comparación y se evaluó la equivalencia de los mismos<sup>91</sup>. En este experimento se conformaron de forma aleatoria un grupo de estudio tratado con AA y un grupo control al que se le aplicó un placebo y de esta manera se evaluó el efecto del tratamiento propuesto en esta investigación.

## 3.2 Ejemplares biológicos

Se emplearon 30 ratas machos adultas sanas de la línea BIOU: Wistar (*Rattus norvegicus*) con un peso comprendido entre 350 g y 450 g, provistas por el Bioterio de la Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela, las cuales fueron divididas en un grupo experimental conformado por 15 ratas a las que se les aplicó gel de AA y un grupo control de 15 ratas a las que se les suministró un gel placebo.

## 3.3 Sistemas de variables

### 3.3.1 Variable independiente

Tratamiento:

- Gel de AA.
- Gel placebo.

### 3.3.2 Variable dependiente

- Cicatrización de la mucosa bucal de ratas BIOU: Wistar determinada por dos dimensiones: la clínica y la histológica.

Dimensión clínica: clínicamente la cicatrización se evaluó mediante el siguiente indicador:

Área elíptica de la lesión:  $A = \pi \cdot a \cdot b$  (a= medida de mayor amplitud de la lesión, b= medida de menor amplitud de la lesión), la cual se expresó en  $\text{mm}^2$ .

Dimensión histológica: el análisis histopatológico fue realizado por la profesora Rosalba Florido, especialista en Anatomía Patológica, quien reportó cualitativamente los siguientes indicadores:

Integridad del tejido epitelial (integridad o discontinuidad).

Cantidad de vasos sanguíneos (ausencia, escaso, moderado o abundante).

Infiltrado inflamatorio (ausencia, mononucleares, polimorfonucleares o mixto).

Densidad de tejido conjuntivo (laxo o denso).

Cantidad de colágeno (escaso o abundante).

### 3.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

La técnica de recolección de datos que se empleó para llevar a cabo este estudio, fue la observación directa, que consiste en visualizar o captar mediante la vista, en forma sistemática, cualquier hecho que se produzca en función de los objetivos de investigación preestablecidos<sup>92</sup>. Se empleó la observación técnicamente asistida para evaluar la úlcera bucal inducida, utilizando un instrumento de medición (sonda periodontal de Williams Hu-friedy®) con la finalidad de medir la aproximación de los bordes, determinando la medida de mayor longitud (a) y la medida de menor longitud (b) durante el proceso de cicatrización. Por su parte, para la realización de las pruebas histológicas se empleó el método de observación técnicamente asistida por medio del microscopio.

Se utilizaron como instrumentos fichas de registro que permitieron evaluar las características clínicas e histológicas del área de estudio al momento de inducir la úlcera bucal y durante el proceso de cicatrización del tejido. Para el registro clínico se utilizó como guía el instrumento utilizado por Cabezas y Yuconsa<sup>93</sup> (Anexo A y B) y para el registro histológico el de Contreras<sup>94</sup> (Anexo C); ambos con modificaciones, adaptándolas a las variables de estudio del presente trabajo. La ficha de registro para la evaluación clínica se basó en la aproximación de los bordes de la lesión tomando dos medidas en cada tiempo de observación (una en sentido horizontal y otra en sentido vertical) para determinar el área de la lesión y obtener un valor para “a” correspondiente a la medida de mayor amplitud y uno para “b” correspondiente a la medida de menor amplitud. Para llevar a cabo esta evaluación se utilizó una sonda periodontal de Williams Hu-friedy® la cual tiene una medida de 1 mm a 10 mm y para aumentar la capacidad de visualización de la medida se empleó una lupa. Se utilizaron las siguientes medidas como indicadores:

- 4 mm
- 3 mm
- 2 mm
- 1 mm
- <1mm

### 3.5 Prueba piloto

Para asegurar la viabilidad y confiabilidad de esta investigación y cumplir con las normas bioéticas requeridas para el trabajo con animales de laboratorio se llevaron a cabo dos pruebas pilotos, las cuales estuvieron constituidas por un total 7 ratas adultas, machos, sanas de la línea BIOU: Wistar, con un peso comprendido entre 350 g y 450 g. Las pruebas se desarrollaron en las instalaciones del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Los Andes durante el mes de Julio de 2018.

Las pruebas piloto se realizaron con el propósito de adquirir las destrezas necesarias para la correcta manipulación de los animales, explorar y conocer la mucosa bucal y establecer la dosis anestésica apropiada para lograr la anestesia general requerida en el experimento. A su vez, permitieron validar el modelo de inducción de la úlcera, verificar la pertinencia de los instrumentos de recolección de datos, practicar la medición, determinar el tiempo de cicatrización clínica del tejido, definir los parámetros para la aplicación del AA, precisar los límites del corte de tejido para el estudio histológico y observar los hallazgos histológicos en la zona de estudio, sin la aplicación del tratamiento.

Para cumplir con lo anteriormente descrito se realizó en primera instancia una prueba piloto donde se utilizaron cuatro animales anestesiados con pentobarbital (50 mg/kg) administrado por vía intraperitoneal<sup>30,46,47</sup>; este fármaco generó la sedación de los mismos más no la anestesia profunda requerida para la evaluación de los tejidos y la inducción de la lesión. Es por ello que se probó la administración de una dosis más alta (55 mg/kg) de pentobarbital, lo cual generó la muerte de dos de los ejemplares.

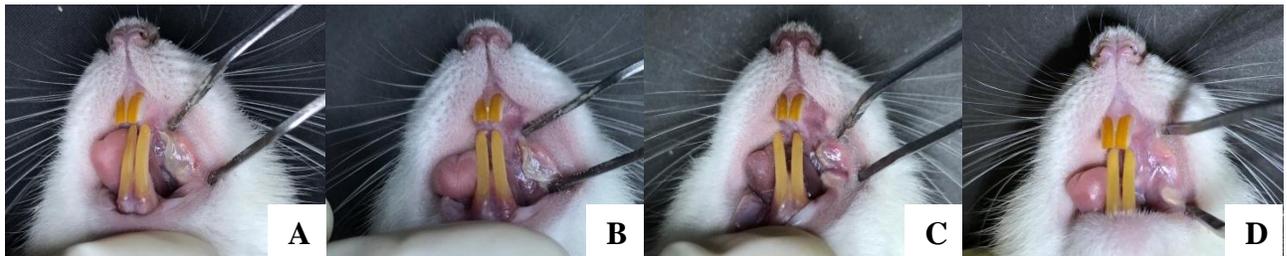
Por consiguiente, se realizó una segunda prueba piloto donde se incluyeron las 2 ratas restantes de la prueba anterior, complementándose este grupo con 3 animales más para un total de 5 ejemplares con el fin de probar el efecto de otro fármaco anestésico, la ketamina (75 mg/kg) en combinación con xilacina (5 mg/kg) generando

una anestesia profunda que permitió llevar a cabo el modelo experimental para la inducción de la úlcera.

Para la inducción de la lesión se empleó el modelo animal experimental desarrollado por Fujisawa et al.<sup>47</sup> en los cinco ejemplares previamente anestesiados, en donde se utilizó un papel filtro circular de 4 mm de diámetro impregnado con solución de ácido acético en una concentración de 50%, el cual se posicionó en el carrillo derecho de cada rata con una pinza algodонера durante 60 segundos. Luego de evaluar la mucosa al cabo de dos días no se evidenció la formación de la úlcera.

Debido a esto se decidió aumentar la concentración del ácido acético al 70% con base en la modificación propuesta por Lee et al.<sup>84</sup> en el modelo descrito anteriormente; generando la úlcera en el carrillo contralateral de uno de los ejemplares, siendo identificada como rata control (RC). En cuanto al posicionamiento del papel filtro se decidió emplear de manera inactiva una fresa de diamante en forma de rueda colocada en una turbina para lograr presionar uniformemente el papel filtro en el área durante 60 segundos.

La úlcera se evidenció al cabo de 2 días, coincidiendo con otros estudios<sup>10,84</sup> y a partir de su aparición clínica se comenzó a evaluar diariamente la evolución de la cicatrización y la aproximación de los bordes de la herida a las 24, 48, 72 y 96 horas, resultando que en la última observación ya había cicatrizado (Figura 1).

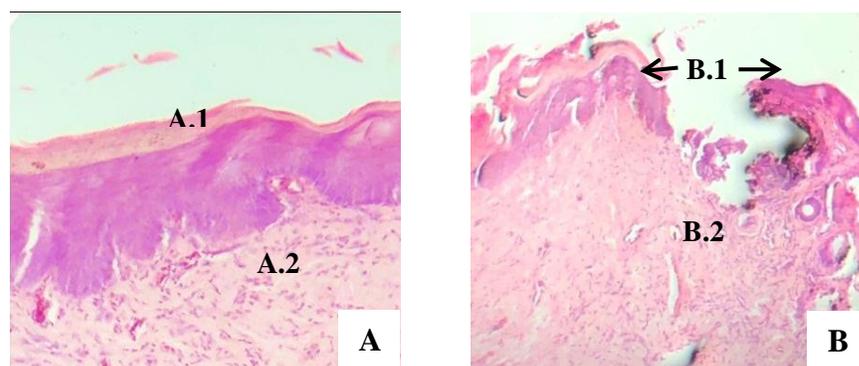


**Figura 1.** Evolución clínica de la cicatrización de rata control. A: 24 horas. B: 48 horas. C: 72 horas. D: 96 horas.

Tomando en cuenta que desde el punto de vista clínico se observó la cicatrización completa a las 96 horas en la RC, se realizó el mismo procedimiento para inducir la úlcera en los cuatro ejemplares restantes, identificados como R1, R2,

R3, R4, lo cual previa eutanasia, permitió la realización de la biopsia excisional de la lesión a las 24, 48, 72 y 96 horas respectivamente para poder realizar el análisis histológico de cada muestra.

A través de la prueba piloto histológica se corroboró la formación de la úlcera en la mucosa, por lo tanto se validó el modelo experimental para la inducción de esta lesión (Figura 2). A su vez se logró observar que histológicamente el tejido cicatrizó a las 96 horas.



**Figura 2.** Microfotografías de preparados histológicos teñidos con H-E correspondientes a epitelio con integridad y epitelio ulcerado. A: microfotografía donde se observa mucosa sana de rata BIOU; Wistar. A.1: continuidad del tejido epitelial. A.2: corion. B: microfotografía donde se observa discontinuidad del tejido epitelial en mucosa de rata Wistar. B.1: epitelio ulcerado. B.2: corion.

### 3.6 Materiales, instrumental y equipos

En esta sección se mencionan los materiales, instrumental y equipos que fueron necesarios para la realización de este estudio.

#### 3.6.1 Materiales

##### 3.6.1.1 *Fármacos*

- Ketamina 50 mg/ml
- Xilacina 2%
- Enflurano
- Ácido ascórbico 15%
- Gel placebo

##### 3.6.1.2 *Materia prima*

- Ácido acético (Fluka® 99,8%)
- Agua destilada

- Metilparabeno (Nipagin®)
- Propilparabeno (Nipasol®)
- Carboximetilcelulosa
- Bisulfito de sodio
- Papel filtro (Xinxing®)
- Formol al 10%
- Parafina
- Xilol
- Hematoxilina
- Eosina

### **3.6.2 Instrumental**

- Sonda periodontal de Williams (Hu-friedy®)
- Envases de vidrio color ámbar de 360 ml con tapa de baquelita
- Pinza
- Jeringa de insulina
- Lupa
- Espátula metálica
- Bandejas
- Portaobjetos

### **3.6.3 Equipos**

- Balanza (Mettler® tara 2500 g)
- Agitadores de vidrio
- Estufa (horno de secado)
- Balanza manual para pesar animales de laboratorio (Ohaus®)
- Microscopio (Olympus®)

## **3.7 Procedimiento**

Esta investigación constó de dos etapas, la pre experimental que estuvo conformada por la elaboración del gel de AA y el gel placebo; y la etapa experimental

que a su vez estuvo dividida en siete fases: fase de adaptación, fase de conformación de grupos, fase de inducción de la anestesia, fase de inducción de la úlcera, fase de aplicación de los tratamientos, fase de recuperación y la fase de evaluación del efecto de los tratamientos aplicados que incluyó la evaluación clínica e histológica.

### **3.7.1 Etapa pre experimental**

#### *3.7.1.1 Elaboración del gel de AA y gel placebo*

Para la elaboración de ambos geles se utilizó una base de carboximetilcelulosa y agua destilada para formar una película que se adhiriera mejor a la mucosa del carillo y no se eliminara con facilidad. Como conservantes o antimicrobianos se utilizó nipasol® (propilparabeno), contra los mohos y las levaduras y nipagin® (metilparabeno) para crear una mezcla sinérgica, de esta manera se conformaron tanto el gel placebo como el gel de AA.

La concentración óptima del AA depende de su formulación y en la mayoría de los casos para que tenga efecto biológico un producto con vitamina C debe tener una concentración mayor al 8%; algunos estudios han demostrado que una concentración superior a 20% no aumenta su acción biológica y pudiera causar cierta irritación, por lo tanto los productos con esta sustancia disponibles en la actualidad están en el rango de 10 a 20%<sup>95</sup>. Tomando en cuenta lo descrito anteriormente se utilizó una concentración de 15% de AA.

Este gel fue elaborado por la Prof. Sara Pascuale en el Departamento de Farmacia Galénica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Los Andes.

##### *3.7.1.1.1 Técnica de elaboración del gel placebo*

Se mezcló 100 cc de agua destilada con 0,18 g de nipagin® y 0,02 g de nipasol®, la mezcla obtenida se disolvió y se dejó enfriar. Posteriormente se agregó 2 g de carboximetilcelulosa, seguidamente se dejó dispersar e hidratar durante 24 horas para luego ser envasada y rotulada en un frasco de vidrio color ámbar.

#### *3.7.1.1.2 Técnica de elaboración del gel de AA*

Se mezcló 100 cc de agua destilada con 0,18 g de nipagin® y 0,02 g de nipasol®, la mezcla obtenida se disolvió y se dejó enfriar. Seguidamente se agregó 1 g de bisulfito de sodio (agente antioxidante) y 15 g de AA y por último se adicionó 2 g de carboximetilcelulosa. La sustancia obtenida se hidrató y dejó reposar durante 24 horas en un lugar oscuro, protegido del aire y la luz para posteriormente ser envasada y rotulada en un frasco de vidrio color ámbar.

### **3.7.2 Etapa experimental**

#### *3.7.2.1 Fase de adaptación*

Los animales fueron suministrados por el Bioterio de la Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela. Ocho días antes del inicio del experimento fueron trasladados al Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Los Andes, donde se alojaron y alimentaron según las normas éticas establecidas para el cuidado y uso de los animales de laboratorio en el Código de Ética para la Vida<sup>96</sup>. Durante este período los animales se adaptaron a las condiciones del laboratorio (luz, humedad, ventilación, ruidos y temperatura), y fueron alimentados con perrarina y agua a libre demanda.

#### *3.7.2.2 Fase de conformación de los grupos*

Los 30 animales fueron distribuidos aleatoriamente en dos grandes grupos (A y B) de 15 ejemplares cada uno y a su vez se hizo necesario dividir dichos grupos en subgrupos para facilitar el manejo de los ejemplares. El grupo A o grupo control se subdividió en A1 - 24 horas, A2 - 48 horas, A3 - 72 horas (4 animales cada uno) y A4 - 96 horas (3 animales); y el grupo B o grupo experimental en B1 - 24 horas, B2 - 48 horas, B3 - 72 horas (4 animales cada uno) y B4 - 96 horas (3 animales); los cuales fueron pesados e identificados con una marca de color en la cola dependiendo del grupo al que pertenecían. Se ubicaron las ratas pertenecientes a cada grupo mencionado, en jaulas separadas para un total de ocho jaulas.

### 3.7.2.3 Fase de inducción de la anestesia

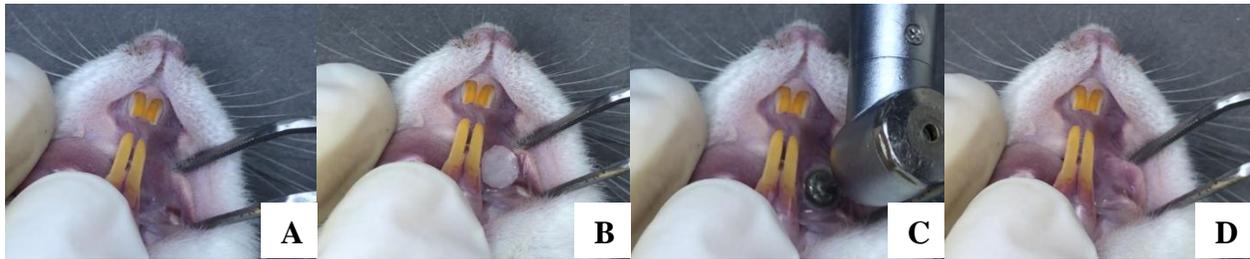
Los animales fueron anestesiados con inyección de una solución de ketamina (75 mg/kg), en asociación con xilacina (5 mg/kg), por vía intraperitoneal (Figura 3). En esta fase murieron dos animales, uno perteneciente al subgrupo A2 y otro al subgrupo B3, dichos grupos quedaron conformado por 3 animales cada uno por lo tanto el experimento se realizó finalmente con 28 ejemplares (14 animales del grupo control y 14 del experimental).



**Figura 3.** Inducción de la anestesia. Técnica anestésica intraperitoneal.

### 3.7.2.4 Fase de inducción de la úlcera

Para inducir la lesión se utilizó como referencia el modelo experimental de Fujisawa et al<sup>47</sup> en combinación con el descrito por Lee et al<sup>84</sup>. Se empleó papel filtro circular de 4 mm de diámetro impregnado de ácido acético en una concentración de 70%. El papel filtro se llevó a la cavidad bucal de la rata con una pinza algodona, la cual permitió posicionarlo y se utilizó una fresa de diamante en forma de rueda colocada en una turbina para lograr presionar uniformemente el papel filtro durante 60 segundos en el área donde se causó la lesión. La zona donde se colocó el papel y se indujo la úlcera estuvo delimitada por la encía y la piel del animal, específicamente se ubicó en la mucosa del carrillo izquierdo (Figura 4).



**Figura 4.** Procedimiento de inducción de la úlcera. A: mucosa previa a la inducción. B: colocación de papel filtro impregnado con ácido acético. C: presión uniforme del papel filtro con fresa en forma de rueda. D: mucosa después de la inducción.

#### 3.7.2.5 Fase de aplicación de los tratamientos

Una vez evidenciada la lesión se procedió a la aplicación del gel placebo al grupo A y del gel de AA al 15% al grupo B, se repitió este procedimiento cada 24 horas hasta las 72 horas, el cuál fue el último momento en el que se realizó la aplicación de los tratamientos. Se realizó una aplicación directa y tópica utilizando una jeringa de insulina de 1 ml con una punta fina dosificadora que facilitó la administración de la cantidad de gel necesaria para cubrir la superficie de la úlcera (Figura 5).



**Figura 5.** Aplicación de los tratamientos.

#### 3.7.2.6 Fase de recuperación

Luego de realizar la aplicación de los geles, los animales se colocaron en sus respectivas jaulas en posición decúbito lateral durante aproximadamente 1 hora hasta que finalizara el efecto de la anestesia y de esta manera se garantizaba durante ese periodo el contacto del gel con la mucosa (Figura 6).

Se evaluaron las condiciones adecuadas del microambiente de las jaulas tales como temperatura, humedad, ventilación, iluminación, agua y alimento para su adecuada recuperación. Además se evaluó el comportamiento de los animales para detectar la posible presencia de algún signo de estrés.



**Figura 6.** Ejemplares biológicos en fase de recuperación posterior a la aplicación de los tratamientos.

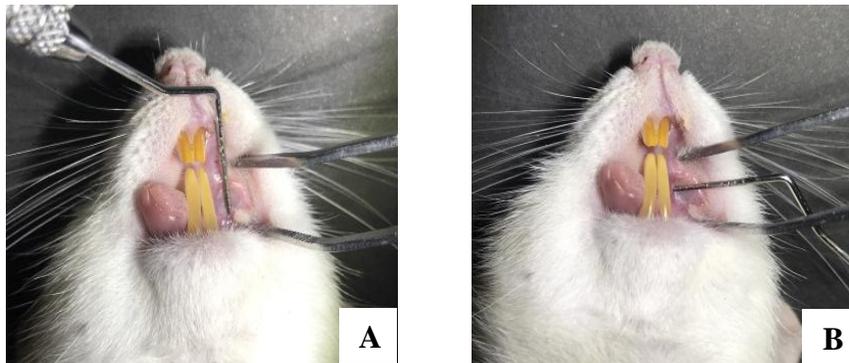
### 3.7.2.7 Fase evaluación del efecto de los tratamientos aplicados

Esta fase comprendió la evaluación clínica e histológica.

#### 3.7.2.7.1 Evaluación clínica

Se realizó un seguimiento clínico postoperatorio diario luego de las 48 horas post inducción de la lesión hasta que el tejido cicatrizó. La primera medición se realizó previo a la aplicación del tratamiento (PT), posteriormente fueron aplicados los geles y se procedió a medir la lesión a las 24 horas, de igual forma se repitió este procedimiento hasta cumplir 96 horas. En cada observación se realizó la evaluación de la aproximación de los bordes de la úlcera, utilizando la sonda periodontal de Williams Hu-Friedy®, colocándola sobre la lesión para obtener la medición de la misma (Figura 7).

La información fue recolectada en el instrumento diseñado para tal fin donde se utilizaron las medidas a y b para calcular el área elíptica de la lesión y de esta manera se obtuvieron los datos necesarios para la realización del análisis estadístico de los resultados.



**Figura 7.** Medición clínica de la lesión. A: medición vertical. B: medición horizontal.

#### 3.7.2.7.2 *Evaluación histológica*

El estudio histológico se realizó en diferentes tiempos, para ello, se practicó la eutanasia por medio de una sobredosis de anestesia general con enflurano (Figura 8) a los animales de cada subgrupo: A1 y B1 a las 24 horas; A2 y B2 a las 48 horas; A3 y B3 a las 72 horas, A4 y B4 a las 96 horas . Se tomó una muestra de tejido mediante una biopsia excisional, abarcando el tejido lesionado en su totalidad y tejido sano circundante (Figura 9). Las muestras fueron sumergidas en envases que contenían formol al 10%, luego fueron embebidas y bloqueadas en parafina para posteriormente cortarlas en el micrótopo con un espesor promedio de 3 micras y colorearlas con Hematoxilina-Eosina (HE). El estudio histológico fue realizado por un especialista en Anatomía Patológica.



**Figura 8.** Eutanasia por vía inhalatoria con enflurano en cámara de vidrio.



**Figura 9.** Biopsia excisional.

### **3.8 Principios bioéticos**

Los estudios basados en experimentos con animales son de gran importancia, ya que proporcionan información relevante para diseñar pruebas en humanos. Los códigos de ética nacionales e internacionales establecen que cualquier investigación realizada en seres humanos debe ser diseñada con base en los resultados de investigaciones correlativas hechas en animales de experimentación.

Asimismo, los experimentos con animales tienen su base en el hecho de considerar a otras especies como modelos en miniatura de los problemas humanos; sin embargo, no se puede olvidar que se trata de seres vivos, por lo que se ha de procurar el mejor cuidado para los animales, reduciendo el número de prácticas experimentales innecesarias.

Los aspectos éticos deben ir más allá de no causarle daño físico innecesario al animal, proporcionándole un adecuado bienestar físico y psíquico, lo cual se logra cuando se cumplen los principios establecidos en el Código de Ética para la Vida del Ministerio del Poder Popular para la Ciencia y Tecnología e Industrias Intermedias-Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación<sup>96</sup>.

Dentro de los aspectos éticos que se tomaron en cuenta están:

- Fue utilizada la cantidad mínima necesaria de animales para obtener datos estadísticos válidos.

- Los animales fueron alojados en un ambiente apropiado con cierto grado de libertad de movimiento, alimento, agua y cuidados adecuados para asegurar su salud y bienestar.
- La fase experimental de la investigación fue realizada en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Los Andes, bajo la supervisión de docentes y empleados con experiencia en el manejo de animales de laboratorio.
- El Proyecto de este Trabajo Especial de Grado fue evaluado y avalado por el Comité de Ética del Bioterio de la Universidad de Los Andes CEBIOULA / 115 (Anexo D).
- Las autoras realizaron y aprobaron el Curso de Manipulación de Animales de Laboratorio en el Bioterio de la Universidad de Los Andes (Anexo E).

### **3.9 Análisis de resultados**

Para describir el comportamiento de las variables clínicas e histológicas de este estudio se utilizaron tablas y herramientas gráficas.

Para establecer las condiciones homogéneas del experimento se realizó una asignación aleatoria de los animales de experimentación verificando la igualdad de condiciones de los grupos a través de la prueba de T de Student para muestras independientes.

Para analizar y comparar la evolución clínica (cicatrización) de las úlceras bucales entre ambos grupos de estudio se aplicó la prueba estadística T de Student en cada momento de observación (24, 48, 72 y 96 horas) donde se evaluó el tamaño del área elíptica de la lesión.

Para el procesamiento de los datos se utilizó el software Microsoft Excel y el software estadístico IBM SPSS. Versión 19.

## **CAPÍTULO IV**

### **RESULTADOS**

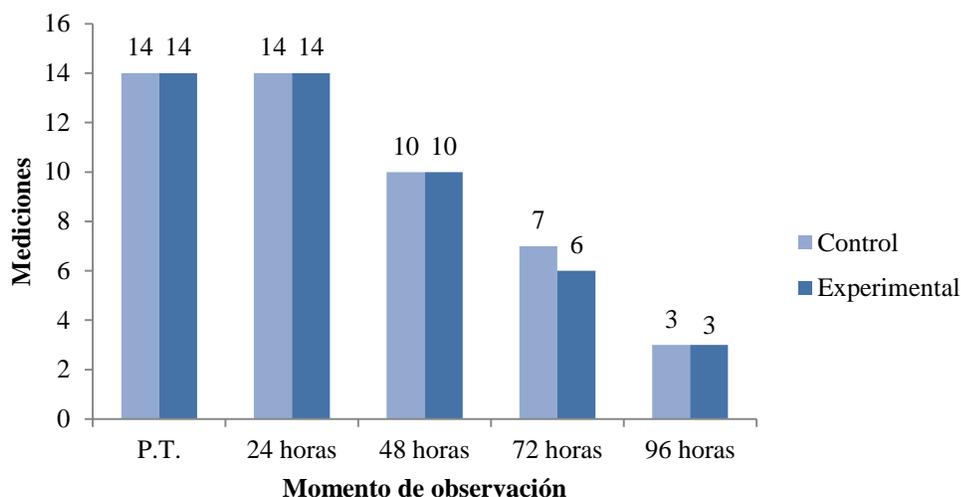
#### **4.1 Presentación de los resultados**

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos en función de los objetivos específicos planteados en la investigación, para ello se muestra el análisis descriptivo y comparativo de la evolución clínica de la lesión en cada grupo de estudio, tomando en cuenta las mediciones realizadas en cada momento de observación, así como el análisis de los hallazgos histológicos con base en las fotografías tomadas a los cortes de las muestras obtenidas durante el experimento.

##### **4.1.1 Evolución clínica**

Para evaluar el efecto del AA en úlceras bucales inducidas en ratas BIOU: Wistar se analizaron 28 ejemplares biológicos, cuyas lesiones fueron observadas y medidas clínicamente en distintos momentos. Posterior a esto se procedió a inducir de forma progresiva la eutanasia de los ejemplares de cada grupo con la finalidad de obtener las muestras que luego fueron histológicamente analizadas.

En el Gráfico 1 se presenta la cantidad de mediciones obtenidas por grupos de estudio en cada momento de observación.



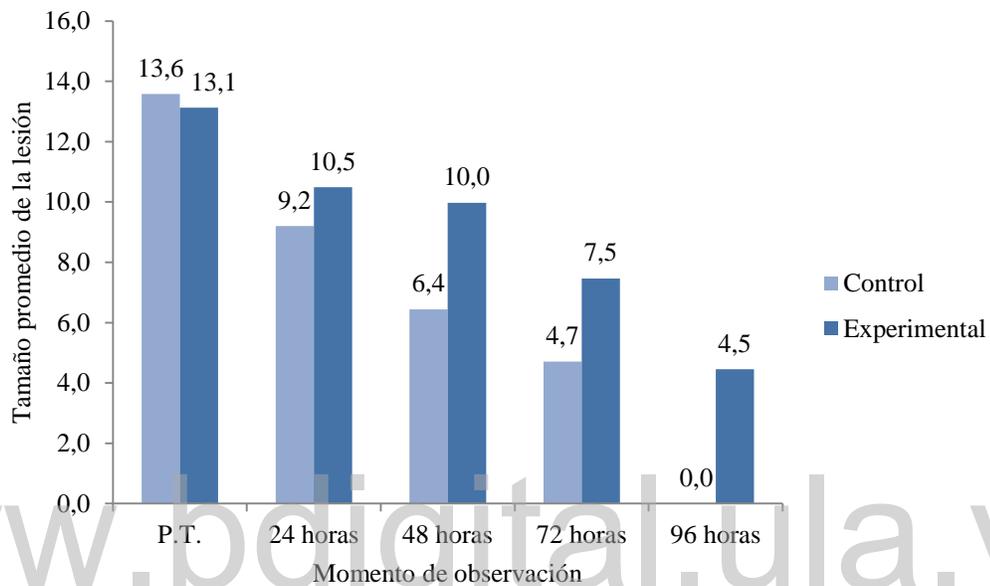
**Gráfico 1.** Cantidad de mediciones obtenidas en cada momento de observación del grupo control y del grupo experimental.

Para describir la evolución clínica de las úlceras inducidas, se consideró que la lesión adoptó una forma elíptica y se estimó su tamaño a partir de las mediciones en milímetros, a: mayor amplitud y b: menor amplitud ( $A = \pi \cdot a \cdot b$ ). La Tabla 1 resume los resultados obtenidos en cada momento del experimento para cada grupo, destacándose la disminución progresiva del tamaño de la lesión en ambos grupos.

**Tabla 1.** Evolución de la lesión según las mediciones obtenidas en cada momento de observación del grupo control y del grupo experimental.

		N	Media	Desv. típ.
Control	PT	14	13,6343	3,03711
	24 horas	14	9,2071	4,13679
	48 horas	10	6,2100	2,90763
	72 horas	7	4,7000	3,25013
	96 horas	3	,0000	,00000
Experimental	PT	14	13,1500	2,69237
	24 horas	14	10,5000	4,02874
	48 horas	10	9,9900	4,40365
	72 horas	6	7,4667	1,76257
	96 horas	3	4,4333	2,30940

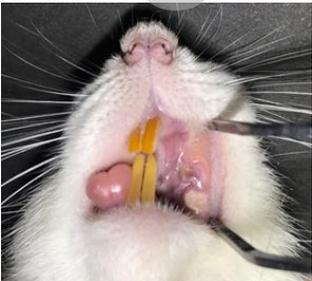
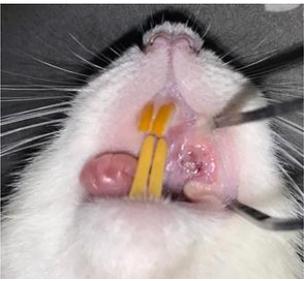
Gráficamente se puede observar el tamaño promedio de la lesión y su disminución a medida que evolucionó el experimento donde a las 96 horas las lesiones del grupo control habían desaparecido, por lo cual, no se tomaron las mediciones correspondientes (Gráfico 2).



**Gráfico 2.** Tamaño promedio del área de lesión en cada momento de observación del grupo control y del grupo experimental.

A continuación se muestran imágenes fotográficas donde se observan las úlceras bucales en la mucosa del carrillo izquierdo de las ratas BIOU: Wistar tanto en el grupo control como en el grupo experimental y su evolución clínica en cada momento de observación (24, 48, 72 y 96 horas).

**Tabla 2.** Evolución clínica de la lesión en cada momento de observación del grupo control y del grupo experimental

Momento de observación	Grupo Control	Grupo experimental
24 horas		
48 horas		
72 horas		
96 horas		

Para comparar cada momento de la evolución clínica de las lesiones (estimadas por el tamaño del área elíptica formada) en los grupos de estudio, se utilizó la prueba estadística T de Student para muestras independientes. Se observó que en el momento previo a la aplicación del tratamiento las condiciones de las mediciones del área eran homogéneas en varianza (prueba de Levenne, significancia 0,561) y en promedio (prueba T de Student, significancia 0,845) cumpliendo con condiciones homogéneas al inicio del experimento.

A las 24 horas, se aprecia un menor tamaño en el grupo control; sin embargo, al compararse con el grupo experimental, las diferencias en el tamaño de la lesión resultaron no significativas (prueba T de Student, significancia bilateral = 0,410).

A las 48 horas, se observó menor tamaño de la lesión en el grupo control que en el grupo experimental resultando significativas las diferencias (prueba T de Student, significancia bilateral = 0,036).

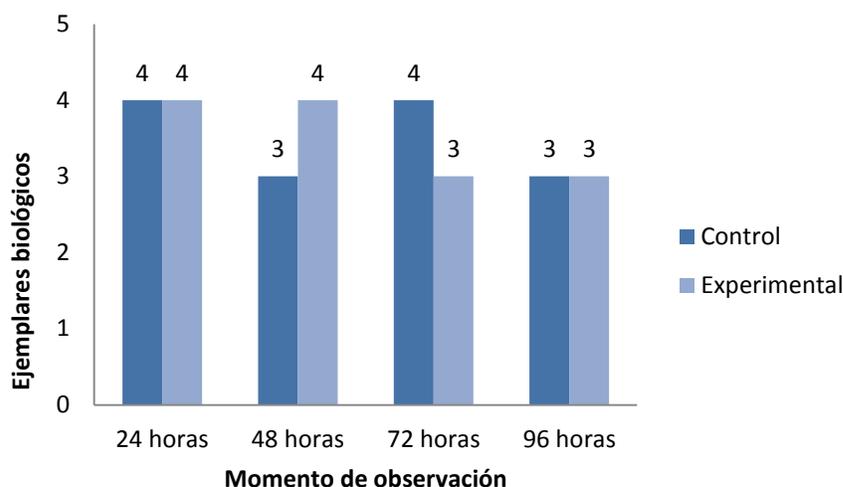
A las 72 horas, el grupo control presenta menor tamaño de la lesión que el grupo experimental; sin embargo las diferencias no resultaron significativas (prueba T de Student, significancia bilateral = 0,090).

A las 96 horas, no se realizaron comparaciones estadísticas debido a que en el grupo control desaparecieron las lesiones; sin embargo, en el grupo experimental aún se observaron ejemplares con lesiones cuya área elíptica promedio era de 4,4 mm y una desviación típica de 2,3 mm.

Realizando un análisis de varianza para evaluar el efecto de la combinación entre el factor “grupo experimental” y el factor “momento de medición” y una vez validado el supuesto de igualdad de varianzas (significancia 0,774) se observó que no existe diferencia significativa en las combinaciones de factores (significancia 0,255) lo que indica que los comportamientos son homogéneos para las distintas combinaciones.

#### **4.1.2 Hallazgos histológicos**

En el siguiente gráfico se describe la cantidad de ejemplares biológicos sacrificados en cada momento de observación para la obtención de las muestras necesarias para el estudio histológico (Gráfico 3).



**Gráfico 3.** Ejemplares biológicos del grupo control y del grupo experimental sometidos a eutanasia para la obtención de biopsias en cada momento de observación.

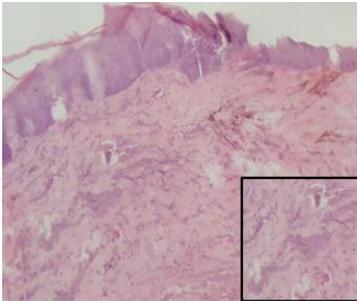
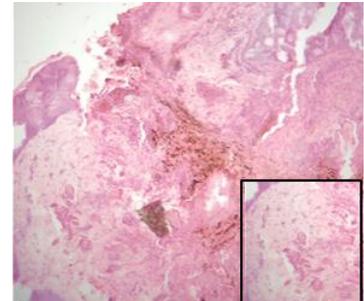
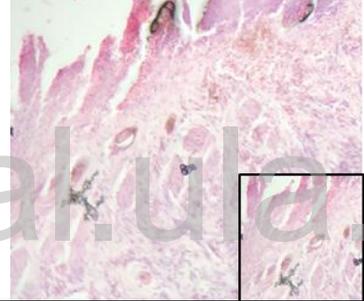
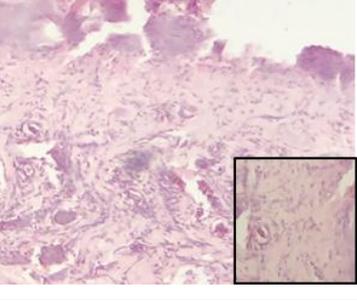
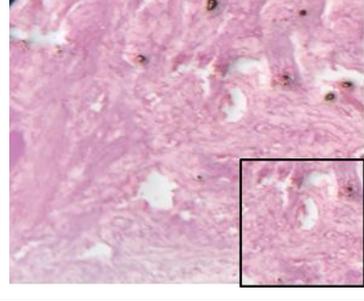
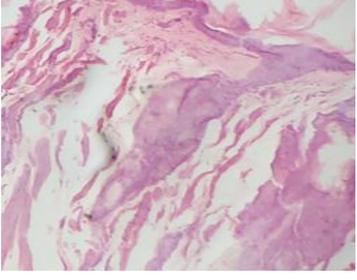
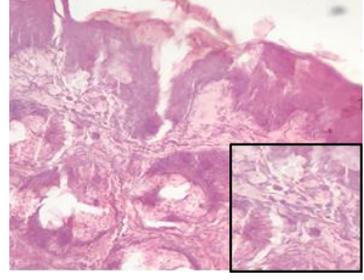
#### 4.1.2.1 Vasos sanguíneos

En la Tabla 3 se describe la cantidad porcentual de vasos sanguíneos presentes en los cortes histológicos analizados en ambos grupos de estudio, donde se destaca que a las 48 horas el grupo control presentaba vasos sanguíneos de forma abundante y a las 96 horas se observó su ausencia en la mayoría de las lesiones; por su parte en el grupo experimental se evidenciaron vasos sanguíneos en cantidad moderada hasta las 72 horas y escasos a las 96 horas. En la Tabla 4 se presentan microfotografías de los vasos sanguíneos visualizados en cada momento de observación tanto en el grupo control como en el grupo experimental.

**Tabla 3.** Cantidad porcentual de vasos sanguíneos encontrada en cada momento de observación en el grupo control y en el grupo experimental.

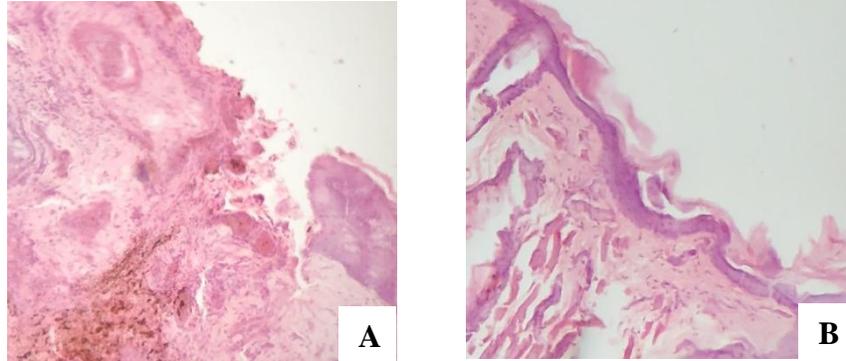
Observación	Grupo	Abundante (%)	Moderado (%)	Escaso (%)	Ausencia (%)
24 horas	Control		25	75	
	Experimental	25	75		
48 horas	Control	66,7	33,3		
	Experimental		100		
72 horas	Control			100	
	Experimental		66,7	33,3	
96 horas	Control			33,3	66,7
	Experimental			100	

**Tabla 4.** Microfotografías de preparados histológicos teñidos con H-E correspondientes a la cantidad de vasos sanguíneos encontrada en el grupo control y en el grupo experimental (10x de aumento). En los recuadros se delimita la zona en la cual se observan los vasos sanguíneos.

Momento de observación	Grupo Control	Grupo experimental
24 horas		
48 horas		
72 horas		
96 horas		

#### 4.1.2.2 *Integridad del tejido epitelial*

Durante la evolución de las lesiones en ambos grupos se observó histológicamente discontinuidad del tejido epitelial en cada momento de observación, exceptuando las muestras pertenecientes al grupo de 96 horas del grupo control, en el cual se evidenció integridad del epitelio y afección del tejido conjuntivo (Figura 10).



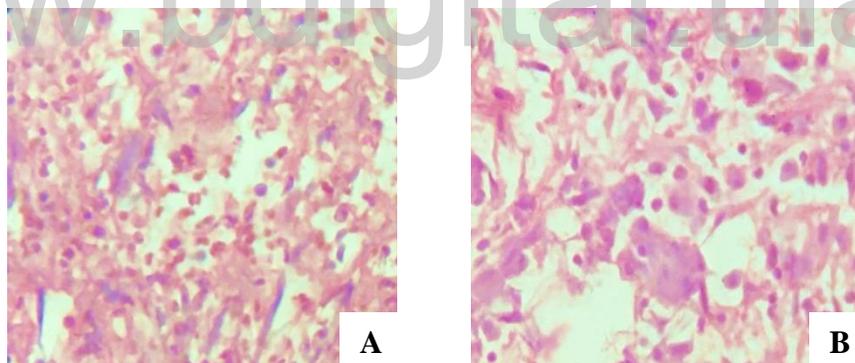
**Figura 10.** Microfotografías de preparados histológicos teñidos con H-E correspondientes a epitelio ulcerado y a epitelio íntegro. A. Microfotografía donde se observa una úlcera (grupo experimental-24 horas). B. Microfotografía donde se observa integridad del epitelio (grupo control-96 horas).

#### 4.1.2.3 *Infiltrado inflamatorio*

En las muestras analizadas se evidenció la presencia de infiltrado inflamatorio mixto y moderado hasta las 48 horas en ambos grupos, mientras que a las 72 horas se observó que todas las muestras del grupo control presentaban células mononucleares de forma escasa y este comportamiento se observó en el grupo experimental a las 96 horas (Tabla 5). A través de microfotografías se muestra los tipos de infiltrado inflamatorio observados en el experimento (Figura 11).

**Tabla 5.** Cantidad porcentual del tipo de infiltrado inflamatorio encontrada en cada momento de observación en el grupo control y en el grupo experimental. E: escaso, M: moderado y A: abundante.

Momento de observación	Grupo	Tipo de infiltrado inflamatorio						
		Ausencia (%)	Mixto (%)			Mononuclear (%)		
			E	M	A	E	M	A
24 horas	Control		75		25			
	Experimental		75		25			
48 horas	Control		66,6		33,3			
	Experimental		50		50			
72 horas	Control						100	
	Experimental				33,3		66,6	
96 horas	Control	33,3					66,6	
	Experimental						100	



**Figura 11.** Microfotografías de tejido conjuntivo teñidos con H-E correspondientes al infiltrado inflamatorio. A. Microfotografía donde se observa infiltrado inflamatorio mixto (grupo experimental-72 horas). B. Microfotografía donde se observa infiltrado inflamatorio mononuclear (grupo control-72 horas).

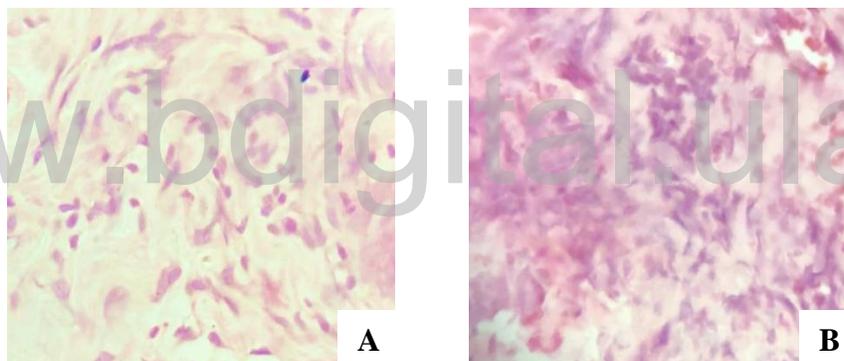
#### 4.1.2.4 Densidad de tejido conjuntivo

En la Tabla 6 se aprecia que inicialmente la densidad del tejido conjuntivo era laxo en ambos grupos de estudio, siendo diferente a las 72 horas, donde en la totalidad de las muestras correspondiente al grupo control se observó tejido

conjuntivo denso, mientras que en el grupo experimental aún se observaba tejido conjuntivo laxo (Figura 12).

**Tabla 6.** Cantidad porcentual de la densidad de tejido conjuntivo encontrada en cada momento de observación en el grupo control y en el grupo experimental.

Momento de observación	Densidad de Tejido Conjuntivo			
	Control		Experimental	
	Laxo (%)	Denso (%)	Laxo (%)	Denso (%)
24 horas	50		50	
48 horas	29	14	57	
72 horas		57	29	14
96 horas		50		50



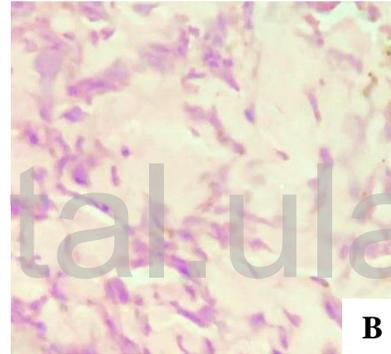
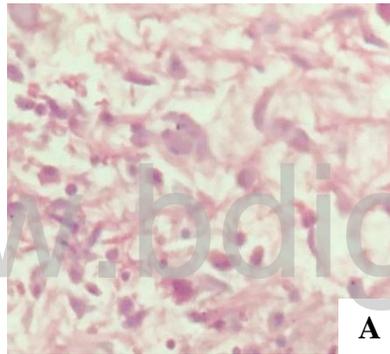
**Figura 12.** Microfotografías de preparados histológico teñidos con H-E correspondientes al tejido conjuntivo. A. Microfotografía donde se observa tejido conjuntivo laxo (grupo experimental-72 horas). B. Microfotografía donde se observa tejido conjuntivo denso (grupo control-72horas).

#### 4.1.2.5 *Fibras de colágeno*

A continuación se presenta la Tabla 7 en la que se aprecia la cantidad de muestras histológicas donde se observaron fibras de colágeno. A las 24 horas había ausencia de estas fibras ya que predominaban las células transitorias del tejido conjuntivo; por su parte, existía abundante colágeno en el grupo control a las 72 horas, mientras que en el grupo experimental se evidenció predominio de éste a las 96 horas de forma escasa (Figura 13).

**Tabla 7.** Cantidad de muestras histológicas en donde se observó presencia de colágeno en el grupo control y grupo experimental.

Momento de observación	Fibras de colágeno				Total
	Control		Experimental		
	Abundante	Escaso	Abundante	Escaso	
24 horas					—
48 horas		1			1
72 horas	4		1	5	10
96 horas	3			3	6
<b>Total</b>	3	5		4	12



**Figura 13.** Microfotografías de preparados histológicos teñidos con H-E correspondientes a la cantidad de fibras de colágeno. A. Microfotografía donde se observa fibras de colágeno escasas (grupo experimental-72 horas). B. Microfotografía donde se observa fibras de colágeno abundantes (grupo control-72 horas).

## **CAPÍTULO V**

### **DISCUSIÓN**

Las úlceras bucales constituyen una de las patologías más comunes de la cavidad bucal, su etiología multifactorial ha motivado el desarrollo de diversas investigaciones orientadas a eliminar la posible causa y favorecer la cicatrización de las mismas. Numerosos tratamientos han sido propuestos para aliviar la sintomatología causada por esta lesión y acelerar su curación; sin embargo, aún no se ha identificado un medicamento o terapia específica que resulte totalmente efectiva para tratar estas lesiones.

Con el propósito de obtener mayor información sobre el efecto del AA en úlceras bucales se realizó esta investigación, utilizando un modelo animal que permitió la inducción de úlceras bucales en ratas BIOU: Wistar, mediante la aplicación tópica de ácido acético a una concentración de 70% durante 60 segundos para evaluar de manera clínica e histológica la cicatrización en estas lesiones.

A pesar de la variación metodológica realizada en esta investigación al modelo propuesto por Fujisawa et al.<sup>47</sup>, se determinó que la aplicación de ácido acético permitió inducir una lesión que histológicamente generó discontinuidad del epitelio y afección del tejido conjuntivo, hallazgos histológicos que confirman la presencia de una úlcera bucal y coinciden con los estudios de diferentes autores quienes al aplicar ácido acético en la mucosa bucal de animales de experimentación reportaron la presencia de lesiones ulcerosas similares a las observadas en el presente estudio<sup>89,90</sup> demostrado que estas úlceras inician con la aparición de un proceso inflamatorio caracterizado por el aumento de citocinas proinflamatorias (como la interleucina-1b), óxido nítrico, prostaglandinas y apoptosis de las células epiteliales<sup>97</sup>.

Este modelo de inducción experimental de úlceras bucales es comúnmente utilizado en estudios animales para evaluar el efecto de diferentes tratamientos <sup>5,10,30,46,47,84</sup> debido a que sus características histopatológicas, tanto en la evolución del proceso patológico como en la cicatrización, imitan las úlceras bucales humanas<sup>98</sup>.

En el presente estudio se pretendió evaluar el efecto del AA en la cicatrización de úlceras bucales, tomando en cuenta las propiedades beneficiosas de esta vitamina descritas en la literatura, como su acción antioxidante y la participación en la síntesis de colágeno del tejido conjuntivo; sin embargo, en esta investigación se observó clínicamente un retardo en la cicatrización de las úlceras del grupo experimental al compararlas con las del grupo control, evidenciándose que el proceso de cicatrización de las úlceras tratadas con AA fue más lento, puesto que las lesiones presentaron mayor tamaño que las pertenecientes al grupo control en los diferentes momentos de observación, aunque la diferencia fue estadísticamente significativa solo a las 48 horas. Estos resultados difieren de los obtenidos en otros estudios en los que el AA fue clínicamente efectivo e intervino positivamente en el proceso de cicatrización de lesiones inducidas en cavidad bucal como en diferentes estudios donde se realizaron heridas quirúrgicas en animales de experimentación<sup>45,50,53</sup> y en pacientes<sup>54</sup>.

En concordancia con los hallazgos clínicos, en esta investigación histológicamente se observó que el AA no promovió la cicatrización ya que durante el experimento la evolución de este proceso fue ligeramente más rápida en el grupo control, en el que se observaron fenómenos propios de una cicatrización más avanzada tales como la disminución de vasos sanguíneos y células inflamatorias; mayor proliferación de fibras de colágeno y tejido conjuntivo denso en los periodos de observación previos a las 96 horas; mientras que para ese momento en el grupo experimental todavía se apreciaba histológicamente la permanencia de vasos sanguíneos e infiltrado inflamatorio, presencia de tejido conjuntivo laxo y escasa cantidad de colágeno.

Resultados similares reportaron Barbosa et al.<sup>51</sup>, quienes emplearon AA de forma tópica en una úlcera provocada en lengua de cobayos y observaron que aunque en las fases iniciales esta sustancia promovió el proceso de cicatrización; en la etapa

posterior se evidenció histológicamente un estancamiento en la evolución de la reparación y el inicio de la remodelación estaba más adelantado en el grupo control que en el grupo experimental.

En contraste, Lima et al.<sup>99</sup> reportaron que el uso tópico de ácido ascórbico en heridas inducidas en la piel de ratas disminuyó el número de macrófagos, aumentó la cantidad de fibroblastos y promovió la deposición de colágeno y la organización de las heridas, lo cual resultó en una mejor reparación del tejido y disminución del tiempo de cicatrización.

La discrepancia entre la ausencia de efecto cicatrizante del AA hallado en la presente investigación y la efectividad de esta vitamina en la curación de heridas, ampliamente documentada en la literatura, podría atribuirse a que existe variación en la metodología aplicada en los diferentes estudios. En este sentido, la vía utilizada para la administración del AA pudiera influir en el efecto observado, puesto que en los estudios que reportan efecto cicatrizante en cavidad bucal<sup>40,52,54</sup>, el AA fue administrado por vía oral, lo que sugiere que la administración sistémica del AA podría ser más efectiva que la aplicación tópica, debido posiblemente a que como lo describen Mariaca et al.<sup>100</sup> el AA es inestable de manera innata y se desconoce si permanece intacto en la piel después de su aplicación. En consecuencia, la inestabilidad química del AA puede haber afectado la acción del gel en contacto con la mucosa bucal de los animales implicados en este estudio.

No obstante, recientemente Gemalmaz et al.<sup>101</sup>, no observaron ventajas con la administración oral durante tres semanas de un suplemento compuesto por vitamina C, mucopolisacáridos y colágeno en la cicatrización de lesiones inducidas en el tendón de Aquiles de ratas. Con base en la contradicción de los resultados de diferentes investigaciones, para determinar si la vía de administración del AA influye sobre el efecto que este produce en la cicatrización de heridas sugiriendo que es necesario realizar otros estudios.

Por otra parte, si bien el efecto cicatrizante del AA se atribuye principalmente a su propiedad antioxidante, se debe tener en cuenta que esta vitamina puede ejercer una acción dual, por lo que puede comportarse como antioxidante o como pro-

oxidante<sup>100</sup>, dependiendo del potencial redox del entorno celular, las concentraciones locales de ascorbato, la presencia/ausencia de metales de transición, las dosis administradas y las concentraciones alcanzadas<sup>102</sup>. Se ha demostrado que a altas concentraciones, el AA actúa como pro-oxidante, bien sea por generar especies reactivas del oxígeno o por inhibir los sistemas antioxidantes, mediante su interacción con metales de transición como el cobre y el hierro<sup>80</sup>. Asimismo, Yoshino et al<sup>97</sup> hallaron aumento del malondialdehído, un marcador de estrés oxidativo, en úlceras bucales inducidas por la combinación de ácido acético y 5-fluorouracilo en hámsteres.

Tomando en cuenta que para la elaboración de los geles aplicados en este estudio se utilizaron el metil y propilparabeno, en cuya degradación se han encontrado concentraciones de hierro<sup>103</sup>, es posible plantear la interacción entre estos parabenos y el AA como causa de estrés oxidativo aunado al provocado por la inducción de la úlcera, generando radicales libres y por ende daño tisular, lo cual podría explicar el retardo en el proceso de cicatrización observado en el grupo tratado con el gel de AA en este estudio. No obstante, se requiere realizar otras investigaciones que permitan comprobar esta teoría.

De acuerdo con las condiciones metodológicas aplicadas en este estudio, el tratamiento con AA administrado por vía tópica no favorece el proceso de cicatrización de las úlceras bucales inducidas con ácido acético, por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula planteada en esta investigación.

## **CAPÍTULO VI**

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

#### **4.2 Conclusiones**

- El gel de ácido ascórbico aplicado de forma tópica no favoreció la cicatrización clínica en las úlceras bucales inducidas en ratas BIOU: Wistar, efecto que fue estadísticamente significativo a las 48 horas.
- Desde el punto de vista histológico el gel de ácido ascórbico prolongó la presencia de vasos sanguíneos, infiltrado inflamatorio y tejido conjuntivo laxo, por lo tanto la producción de colágeno fue tardía.
- La aplicación de ácido acético al 70% durante 60 segundos constituye un modelo animal que permite la inducción de úlceras bucales en la mucosa de ratas BIOU: Wistar y resulta útil para el estudio de la fisiopatología de estas lesiones y para la investigación de tratamientos orientados a la curación de las mismas.

#### **4.3 Recomendaciones**

- En estudios posteriores similares a este se recomienda incrementar el número de ejemplares biológicos utilizados y aumentar el tiempo de observación de la lesión.
- Se sugiere evaluar el efecto del ácido ascórbico en la cicatrización de úlceras bucales administrando el tratamiento de forma sistémica.

- Estudiar diferentes concentraciones de ácido ascórbico que permitan identificar la concentración ideal de esta sustancia para su uso tópico en mucosa bucal.
- Evaluar en futuras investigaciones la posible interacción de los productos del metil y propilparabeno con el ácido ascórbico.
- Realizar estudios que permitan evaluar el efecto pro-oxidante del ácido ascórbico en mucosa bucal.
- Dar continuidad a la línea de investigación de úlceras bucales con la finalidad de encontrar una sustancia que permita acortar su periodo de permanencia acelerando la cicatrización de las mismas.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## REFERENCIAS

1. Abid A, Maatouk F, Berrezouga L, Azodo C, Uti O, El-Shamy H, et al. Prevalence and Severity of Oral Diseases in the Africa and Middle East Region. *Advances in Dental Research*. 2015;27(1):10-7.
2. Díaz S. Impacto de lesiones orales sobre la calidad de vida en pacientes adultos. *Avances en Odontoestomatología*. 2016;32(1):11-20.
3. Miarachi C, Espinoza I. Utilidad de las mediciones de la calidad de vida relacionada con la salud. *Rev Dent Chile*. 2005;96(2):28-35.
4. Toche P, Salinas J, Guzmán M, Afani A, Jaude N. Úlceras orales recurrentes: Características clínicas y diagnóstico diferencial. *Revista Chilena de Infectología*. 2007;24(3):215-9.
5. Lim Y, Kwon S, Park J, Cho C, Park S, Kim W. Enhanced mucosal healing with curcumin in animal oral ulcer model. *The Laryngoscope*. 2016;126(2):E68-73.
6. Bascones A, Figuero E, Esparza G. Úlceras Orales. *Medicina Clínica*. 2005;125(15):590-7.
7. Paleri V, Staines K, Sloan P, Douglas A, Wilson J. Evaluation of oral ulceration in primary care. *BJM*. 2010;340:c2639.
8. Muñoz M, Esparza G, Gonzáles M, Bascones A. Oral ulcers : clinical aspects . A tool for dermatologists . Part II. Chronic ulcers. *Clin Exp Dermatol*. 2009;34:456-61.
9. Muñoz M, Esparza G, Gonzáles M, Bascones A. Oral ulcers : clinical aspects . A tool for dermatologists . Part I. Acute ulcers. *Clin Exp Dermatol*. 2009;34:289-94.
10. Nodai T, Hitomi S, Ono K, Masaki C, Harano N, Morii A, et al. Endothelin-1 Elicits TRP-Mediated Pain in an Acid-Induced Oral Ulcer Model. *Journal of dental research*. 2018;0(0):2-6.
11. Ortiz A, Chimenos E. Diagnóstico diferencial de las úlceras orales. *Piel*. 2002;17(3):119-27.
12. Raissouni T. Estudio comparativo de la eficacia de varios tratamientos tópicos de la estomatitis aftosa recurrente. [Tesis doctoral]. Granada: Universidad de Granada; 2007.
13. Salinas Y, Millán R, León J. Estomatitis aftosa recidivante. *Conducta Odontológica*. *Acta Odontológica Venezuela*. 2008;46(2):1-16.
14. Millán F, Quecedo E, Gimeno E. Tratamiento de la estomatitis aftosa recidivante. *Piel*. 2010;25(8):463-9.
15. Brocklehurst P, Tickle M, Glenny A, Lewis M, Pemberton M, Taylor J, et al. Systemic interventions for recurrent aphthous stomatitis (mouth ulcers). *Cochrane Libr*. 2012;9(9).
16. Baccaglioni L, Lalla R, Bruce A, Sartori-Valinotti J, Latortue M, Carrozzo M, et al. Urban legends: Recurrent aphthous stomatitis. *Oral diseases*. 2011;17(8):755-70.
17. Iisástigui A, Iisástigui Z, Pérez A. Características de la estomatitis aftosa recurrente en la Clínica Estomatológica Docente Hermanos Gómez: Municipio

- 10 de Octubre. Revista habanera ciencias médicas. 2009;8(4).
18. Troya E, Martínez J, Padilla E, Iglesias N, Ramos A. La estomatitis aftosa recurrente y las situaciones de estrés como factor de riesgo. Revista médica electrónica. 2014;36(6):799-812.
  19. Sánchez Z, Martínez B, Gato I. El estrés como factor de riesgo de la estomatitis aftosa recurrente. Revista médica electrónica. 2011;33(1):39-44.
  20. Pacheco M, Fleites Y, Trujillo B. Efectividad del tratamiento con fitofármaco y técnicas de acupuntura de la estomatitis aftosa. Acta médica del centro. 2015;9(2):21-9.
  21. Belenguer I, Jiménez Y, Claramunt A. Treatment of recurrent aphthous stomatitis. A literature review. Journal of clinical and experimental dentistry. 2014;6(2):68-74.
  22. Nasry S, El Shenawy H, Mostafa D, Ammar N. Different modalities for treatment of recurrent aphthous stomatitis. A randomized clinical trial. Journal of clinical and experimental dentistry. 2016;8(5):e517-22.
  23. Zhou P, Mao Q, Hua H, Liu X, Yan Z. Efficacy and safety of Chinese patent medicines in the treatment of recurrent aphthous stomatitis. The Journal of the American Dental Association. 2017;148(1):17-25.
  24. Pacho J, Piñol F. Estomatitis aftosa recurrente. Actualización. Revista Cubana de Estomatología. 2005;42(1).
  25. Bedos D, Rodríguez D, García V, Hernández H. Efectividad del uso del propóleos en el tratamiento de la enfermedad aftosa recurrente en pacientes con afecciones reumáticas. Revista Cubana de Reumatología. 2015;17(2):158-65.
  26. Pardías L, Silveira C, González M, Fernández G, Llibre A. Eficacia y seguridad del Tisuacryl® en el tratamiento de la estomatitis aftosa. Multimed. 2015;19(1).
  27. Martínez M, Jiménez A, Navarro J, González Y, Rodríguez Z. Estomatitis aftosa recurrente según factores locales y generales. Medisan. 2013;17(9):5028-35.
  28. Rodríguez A, Ramires Y, Crespo M, Ocaña C, López A. Eficacia de la crema Vimang® en el tratamiento de la estomatitis aftosa recurrente. Medisan. 2012;16(5):710-6.
  29. Rioboo M, Bascones A. Aftas de la mucosa oral. Avances en Odontoestomatología. 2011;27(2):63-74.
  30. Karavana S, Gökçe E, Rençber S, Özbal S, Pekçetin C, Güneri P, et al. A new approach to the treatment of recurrent aphthous stomatitis with bioadhesive gels containing cyclosporine A solid lipid nanoparticles : in vivo / in vitro examinations. International Journal Nanomedicine. 2012;7:5693-704.
  31. Landová H, Daněk Z, Gajdziok J, Vetchý D, Štembírek J. Oral mucosa and therapy of recurrent aphthous stomatitis. Ces a Slov Farm Cas Ces Farm Spol a Slov Farm Spol. 2013;62(1):12-8.
  32. Volkov I, Rudoy I, Freud T, Sardal G, Naimer S, Peleg R, et al. Effectiveness of vitamin B12 in treating recurrent aphthous stomatitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. J Am Board Fam Med. 2009;22(1):9-16.

33. Bellón S, Echarry O. Evaluación clínica de la efectividad de bórax en el tratamiento de la estomatitis aftosa. *Revista Cubana de Estomatología*. 2006;43(2):0-0.
34. Tellez N, Pérez L, Rodríguez J, Travieso M, López M. Efectividad del tratamiento con radiación láser de baja potencia en la estomatitis aftosa recurrente. *Revista de Ciencias Médicas*. 2013;17(175):40-50.
35. Mansour G, Ouda S, Shaker A, Abdallah H. Clinical efficacy of new aloe vera- and myrrh-based oral mucoadhesive gels in the management of minor recurrent aphthous stomatitis: A randomized, double-blind, vehicle-controlled study. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 2014;43(6):405-9.
36. Jahromi N, Ghapanchi J, Pourshahidi S, Zahed M, Ebrahimi H. Clinical evaluation of high and low-level laser treatment (CO<sub>2</sub> vs InGaAlP Diode Laser) for recurrent aphthous stomatitis. *Journal of Dentistry*. 2017;18(1):17-23.
37. Han M, Fang H, Li Q-L, Cao Y, Xia R, Zhang Z-H. Effectiveness of laser therapy in the management of recurrent aphthous stomatitis: A systematic review. *Scientifica*. 2016.
38. Pavlić V, Vujić-Aleksić V, Aoki A, Nežić L. Treatment of recurrent aphthous stomatitis by laser therapy: A systematic review of the literature. *Vojnosanitetski Pregled*. 2015;72(8):722-8.
39. Lalla R, Choquette L, Feinn R, Zawistowski H, Latortue M, Kelly E, et al. Multivitamin therapy for recurrent aphthous stomatitis. *J Am Dent Assoc*. 2012;143(4):370-6.
40. Yasui K, Kurata T, Yashiro M, Tsuge M, Ohtsuki S, Morishima T. The effect of ascorbate on minor recurrent aphthous stomatitis. *Acta Paediatrica*. 2010;99(3):442-5.
41. Carrera C. En la naturaleza está la respuesta: «micronutrientes: las vitaminas, agentes terapéuticos en las heridas». *Enfermería Global*. 2013;12(31):273-89.
42. Mohammed B, Fisher B, Kraskauskas D, Ward S, Wayne J, Brophy D, et al. Vitamin C promotes wound healing through novel pleiotropic mechanisms. *International Wound Journal*. 2016;13(4):572-84.
43. Schencke C, Salvo J, Vasconcellos A, Del Sol M. Estudio comparativo de la cicatrización en quemaduras con tratamiento en base a miel de ulmo (*Eucryphia cordifolia*) y vitamina C oral versus hidrogel en cobayos (*Cavia porcellus*). *International Journal of Morphology*. 2013;31(3):839-44.
44. Mollinedo M, Carrillo K. Absorción, excreción y metabolismo de vitaminas hidrosoluble. *Revista de Actualización Clínica Investiga*. 2014;41:2146-50.
45. Arévalo P. Efectividad del ácido ascórbico en la cicatrización de tejidos blandos en cobayos [Tesis]. Quito: Universidad Central Del Ecuador; 2014.
46. Karavana S, Sezer B, Güneri P, Veral A, Boyacioğlu H, Ertan G, et al. Efficacy of topical benzydamine hydrochloride gel on oral mucosal ulcers: An in vivo animal study. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2011;40(9):973-8.
47. Fujisawa K, Miyamoto Y, Nagayama M. Basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor reverse impaired ulcer healing of the rabbit oral mucosa. *J oral Pathol Med*. 2003;32(6):358-66.

48. Wu W, Yang N, Feng X, Sun T, Shen P, Sun W. Effect of vitamin C administration on hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in periodontal ligament cells. *Molecular Medicine Report*. 2015;11(1):242-8.
49. Alagl A, Subraya G. Ascorbic acid: New role of an age-old micronutrient in the management of periodontal disease in older adults. *Geriatrics & Gerontology International*. 2015;15(3):241-54.
50. Chen J, He Y, Shan C, Pan Q, Li M, Xia D. Topical combined application of dexamethasone , vitamin C , and  $\beta$ -sodium glycerophosphate for healing the extraction socket in rabbits. *Revista Internacional de Cirugia oral y maxilofacial*. 2015;44(10):1317-23.
51. Barbosa V, Pureza G, Guimarães I. Aplicação tópica de ácido ascórbico em úlcera provocada na língua de cobaias (*Cavia porcellus*) estudo histológico. *Rev da Fac Odontol*. 2004;9(2):27-32.
52. Gonzales B, Yakamoto M, Utsumi K, Sakagami H. A clinical pilot study of lingnin-ascorbic acid combination treatment of herpes simplex virus. *In Vivo (Brooklyn)*. 2009;23(6):1011-6.
53. López J. Efectividad cicatrizante del ácido ascórbico en la mucosa bucal de los cobayos mediante análisis histológico. [Tesis]. Quito: Universidad Central de Ecuador; 2017.
54. Alas A. Efecto de la vitamina c vía oral en la cicatrización de la incisión intersurcular posterior a cirugías de terceras molares mandibulares incluidas. [Tesis]. El Salvador: Universidad de El Salvador; 2015.
55. Schemel M, López J, Chimenos E. Úlceras orales: diagnóstico diferencial y tratamiento. *Medicina Clínica*. 2015;145(11):499-503.
56. Gülseren D, Hapa A, Ersoy-Evans S, Elçin G, Karaduman A. Is there a role of food additives in recurrent aphthous stomatitis a prospective study with patch testing. *Int J Dermatol*. 2017;53(3):302-6.
57. Terzi S, Dursun E, Özgür A, Yiğit E, Özergin-Coşkun Z, Çelebi-Erdivanl Ö, et al. Status of neutrophils, lymphocytes and platelets in patients with recurrent aphthous stomatitis: A retrospective study. *Iran J Otorhinolaryngol*. 2016;28(6):421-4.
58. Ranganath S, Pai A. Is optimal management of recurrent aphthous stomatitis possible? A reality check. *J Clin Diagnostic Res*. 2016;10(10):8-13.
59. Garzón I. Estudio de marcadores de diferenciación epitelial en mucosa oral construida por ingeniería tisular [Tesis doctoral]. Granada: Departamento de Histología, Universidad de Granada. 2009.
60. De la Rosa E, Anaya G, Godoy L. Manual para la Detección de Alteraciones de la Mucosa Bucal Potencialmente Malignas. México. Prensa Digital S.A. 2003.
61. Michael R, Wojciech P. *Histologia: texto y atlas color con biología celular y molecular*. 5<sup>o</sup> edición. Buenos Aires; 2008.
62. Castillo J. Mucosa bucal. *Rev la Asoc Dent Mex*. 2002;59(2).
63. Iglesias S. Efecto del gel de Matricaria recutita sobre la cicatrización de heridas de mucosa palatina en conejos de la raza Nueva Zelanda. [Tesis]. Trujillo: Universidad Católica Los Ángeles Chimbote; 2019.

64. Valencia C. Cicatrización: Proceso de reparación tisular. Aproximaciones terapéuticas. *Rev Investig Andin*. 2010;12(20):85-98.
65. Zavaleta F. Efecto del gel de *Peperomia dolabriformis* Kunth y *Aloe vera* sobre la cicatrización de heridas de mucosa palatina en conejos de la raza Nueva zelandia. [Tesis]. Trujillo: Universidad Católica Los Ángeles Chimbote; 2019.
66. Bestagno V, Neira I, Gómez-Gaete P, Pastene E, Gómez M, Pérez M, et al. Estudio del efecto de un enjuagatorio de *Rosmarinus officinalis* (romero) en la cicatrización de heridas de mucosa oral. *Int J Odontostomat*. 2017;11(4):411-7.
67. Quispe L, Salas S. Efecto cicatrizante de extracto etanolico de *Capsella bursa-pastoris* mediante heridas inducidas en mucosa oral de *Cavia porcellus*. [Tesis]. Puno: Universidad Nacional Del Altiplano; 2018.
68. Ibarra N. Asociación del tiempo operatorio y el tipo de incisión en el proceso de cicatrización de la colocación de implantes dentales. [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2019.
69. William E. Treating scars on the oral mucosa. *Facial Plast Surg Clin*. 2017;25(1):89-97.
70. Basabe B. Funciones de la Vitamina C en el metabolismo del colágeno. *Rev Cuba Aliment Nutr*. 2000;14(1):46-54.
71. Martino L, Pérez M. Lesiones elementales de la mucosa bucal. Guía para el diagnóstico clínico de patologías de la mucosa bucal . *Actas Odontológicas*. 2015;XII(1):14-20.
72. Del Olmo J, Pretel M, España A. Úlceras orales. *PIEL* [Internet]. 2006;21(2):92-100. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S0213-9251\(06\)72438-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0213-9251(06)72438-8)
73. Rodríguez A, Raissouni T. Estudio clínico de 200 pacientes con estomatitis aftosa recurrente. *Gac Med Mex*. 2018;154(2):165-71.
74. Parent D, Vaillant L. Aftas, aftosis, enfermedad de Behçet. *EMC - Dermatología*. 2008;42(2):1-20.
75. Valdés J, Padrón R, El Ghannam Y. Estrés oxidativo en las enfermedades bucales. *Rev Cuba Estomatol*. 2016;53(4).
76. Rivarola E. Stress oxidativo en las patologías inflamatorias orales. Actualización. *Rev Médica Univ*. 2008;4(1).
77. Serra H, Cafaro T. Ácido ascórbico: desde la química hasta su crucial función protectora en ojo. *Acta Bioquímica Clínica Latinoam*. 2007;41(4):525-32.
78. Valdés F. Vitamina C. *Actas Dermosifiliogr*. 2006;97(9):557-68.
79. San Mauro I, Garicano E. Papel de la vitamina C y los  $\beta$ -glucanos sobre el sistema inmunitario: revisión. *Rev Española Nutr Humana y Dietética*. 2015;19(4):238-45.
80. Guija H, Guija E, Ponce J, Inocente M, Camarena L. Generación de radicales libres por efecto de vitamina C sobre un jarabe antianémico de sulfato ferroso. *Horiz Med*. 2018;18(4):35-41.
81. Naranjo I, Vinuesa A, Rodríguez D, Vallejo K, Revelo K. Uso de megadosis de vitamina C en la cicatrización y desinflamación de heridas quirúrgicas. *La Cienc al Serv la Salud y la Nutr*. 2017;8(2):23-8.
82. Xammar J, Donnamaría M. Acción farmacológica, biofísicoquímica y

- estructura dinámica de la Vitamina C. *Acta Farm Bonaer.* 2006;25(1):145-54.
83. Fujisawa K, Hayashi E, Kamata N, Nagayama M. Diseño de modelo para curación deteriorada de herida creada en mucosa oral de conejos. *Rev la Soc Jpn para la Membr mucosa oral.* 1998;4(1):54-62.
  84. Lee D, Kim H, Shim I, Kanai N, Okano T, Kwon S. Treatment of chemically induced oral ulcer using adipose-derived mesenchymal stem cell sheet. *J oral Pathol Med Or.* 2016;46(7):520-7.
  85. Shimamura Y, Takeuchi I, Terada H, Makino K. A Mouse model for oral mucositis induced by cancer chemotherapy. *Anticancer Res.* 2018;38:307-12.
  86. Ishiyama H, Kawai K, Azuma A, Nagano C. Therapeutic effect of rebamipide in a modified acetic acid-induced buccal mucosal ulcer model. *Inflammopharmacology.* 2002;10(4-6):391-9.
  87. Katayama S, Nishizawa K, Hirano M, Yamamura S, Momose Y. Effect of polaprezinc on healing of acetic acid-induced stomatitis in hamsters. *J Pharm Pharm Sci.* 2000;3(1):114-7.
  88. Yoshino F, Yoshida A, Nakajima A, Wada-takahashi S, Takahashi S, Chang-il Lee M. Alteration of the redox state with reactive oxygen species for 5-fluorouracil induced oral mucositis in hamsters. *PLoS One.* 2013;8(12):e82834.
  89. Slomiany B, Slomiany A. Role of endothelin 1 dependent up regulation of leptin in oral mucosal repair. *J Physiol Pharmacol.* 2005;56(4):531-41.
  90. Warzecha Z, Kownacki P, Ceranowicz P, Dembinski M, Cieszkowski J, Dembinski A. Ghrelin accelerates the healing of oral ulcers in non-sialoadenectomized and sialoadenectomized rats. *J Physiol Pharmacol.* 2013; 64(5):657-68.
  91. Hernández R, Fernández C, Baptista P. *Metodología de la Investigación.* 6a ed. México: Mc Graw Hill; 2014.
  92. Hurtado J. *El proyecto de investigación. Metodología de la Investigación Holística.* Caracas-Venezuela: Ediciones Quirón; 2007.
  93. Cabezas E, Yuconsa H. Efecto cicatrizante postquirúrgico de la fenitoína en la encía insertada de ratas BIOU: Wistar. [Trabajo Especial de Grado]. Mérida: Universidad de Los Andes; 2017.
  94. Contreras L. Efecto de Psidium guineense Sw como alternativa en el tratamiento de la inflamación en cavidad bucal de ratas BIOU: Wistar. [Trabajo Especial de Grado]. Mérida: Universidad de Los Andes; 2017.
  95. Al-Niimi F, Chiang N. Topical vitamin C and the skin: Mechanisms of action and clinical applications. *J Clin Aesthet Dermatol.* 2017;10(7):7-10.
  96. Ministerio del poder popular para la Ciencia Tecnología e Industrias Intermedias. Código de ética para la vida. Republica Bolivariana de Venezuela; 2011.
  97. Yoshino F, Yoshida A, Nakajima A, Wada-takahashi S. Alteration of the Redox State with Reactive Oxygen Species for 5-Fluorouracil-Induced Oral Mucositis in Hamsters. *PloS One.* 2013;8(12):10-5.
  98. Mahattanadul S, Mustafa M, Kuadkaew S, Pattharachayakul S, Ungphaiboon S, Sawanyawisuth K. Oral ulcer healing and anti-Candida efficacy of an

- alcohol-free chitosan-curcumin mouthwash. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018;22:7020-3.
99. Lima C, Pereira A, Silva J, Oliveira L, Resck M, Grechi C, et al. Ácido ascórbico para la cicatrización de heridas cutáneas en ratas. *Rev Bras Biol*. 2009;69(4).
  100. Mariaca C, Zapata M, Uribe P. Oxidación y antioxidantes: hechos y controversias. *Rev Asoc Colomb Dermatol*. 2016;24(3):162-73.
  101. Gemalmaz H, Sariyilmaz K, Ozkunt O, Gurgen S, Silay S. Role of a combination dietary supplement containing mucopolysaccharides , vitamin C , and collagen on tendon healing in rats. *Acta Orthop Traumatol Turc*. 2018;52:452-8.
  102. Poljsak B, Ionescu J. Pro-Oxidant vs . Antioxidant Effects of Vitamin C. *Handb Vitam c Res Dly Requir Diet sources Advers Eff*. 2009;153.
  103. Rossi R. Degradación de metilparabeno e propilparabeno pelo processo foto-Fenton solar. [Tesis]. Sao Paulo: Universidad de Sao Paulo; 2017.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## ANEXOS

**Anexo (A).** Ficha de registro de la aproximación de los bordes de la lesión.

### EVALUACIÓN CLÍNICA

<b>Grupo</b>											
<b>N° Animal</b>	<b>PT</b>		<b>24 horas</b>		<b>48 horas</b>		<b>72 horas</b>		<b>96 horas</b>		<b>N° Muestra</b>
	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>a</b>	<b>b</b>	
<b>1</b>											
<b>2</b>											
<b>3</b>											
<b>4</b>											

**Leyenda:**

**PT:** pretratamiento (primera medición 48 horas post inducción). **a:** medición de mayor longitud. **b:** medición de menor longitud

**Anexo (B).** Escala codificada para la evaluación clínica de la aproximación de los bordes de la lesión.

<b>EXÁMEN CLÍNICO</b>
<b>Aproximación de los bordes de la lesión</b>
4mm
3mm
2mm
1mm
<1mm
0mm

Anexo (C). Ficha de registro histológico.

### EVALUACIÓN HISTOLÓGICA

N°	Integridad tejido epitelial		Cantidad de Vasos Sanguíneos				Infiltrado Inflamatorio									Densidad de Tejido Conectivo		Cantidad de Colágeno		
	Integridad	Discontinuidad	Ausencia	Escaso	Moderado	Abundante	Ausencia	Mononucleares:			Polimorfo-nucleares:			Mixto			Laxo	Densos	E	A
								E	M	A	E	M	A	E	M	A				
1																				
2																				
3																				
4																				
5																				
6																				
7																				
8																				
9																				
10																				
11																				
12																				
13																				
14																				
15																				
16																				
17																				
18																				
19																				
20																				
21																				
22																				
23																				
24																				
25																				
26																				
27																				
28																				
29																				
30																				

**Leyenda:**

**E:** escaso

**M:** moderado

**A:** abundante

**Anexo (D).** Carta aval del Comité de Ética del Bioterio de la Universidad de Los Andes.



Mérida, 14 de Junio de 2018

**Protocolo; CEBIOULA/ 115**  
**Estudiantes de Odontología: Fátima Antonio y Gabriela Sayago.**

El comité de ética del BIOULA, evaluó el proyecto "EFECTO DEL ÁCIDO ASCÓRBICO EN ÚLCERAS BUCALES INDUCIDAS EN RATAS BIOU:WISTAR", identificado por el comité como protocolo CEBIOULA/115.

Cuyo objetivo es: Evaluar el efecto del ácido ascórbico en úlceras bucales inducidas en ratas BIOU:WISTAR.

Luego del análisis correspondiente de este proyectó, el comité decidió **OTORGAR el AVAL BIOETICO** para la realización del trabajo, debido a los siguientes elementos de juicio

- 1.- El diseño metodológico es adecuado.
- 2.- El protocolo cumple con las normas bioéticas en el uso de animales experimentales y las personas involucrados en el mismo serán asesoradas y apoyadas técnicamente por el personal de Bioética del Bioterio de la Universidad de los Andes (BIOULA), el cual posee amplia experiencia en la materia.

Atentamente,  
Por el Comité de ética

Lic. Andrés Osorio

Lic. Yorfer Rondón

Prof(a). Kátiusca Villasana

M. V. Yepsys Montero

Prof(a). Nurby Ríos

Lic. Ramón Méndez

La Hechicera, vía principal de Santa Rosa, Edificio BIOULA

Anexo (E). Certificado de aprobación de curso de manipulación de animales de laboratorio.

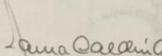
 **REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA**  
**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES**  
**VICERRECTORADO ACADÉMICO**  
**CONSEJO DE ESTUDIOS DE POSTGRADO** 

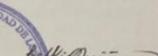
OTORGAN EL PRESENTE  
CERTIFICADO DE APROBACIÓN  
A  
**ANTONIO LEÓN FÁTIMA LORENA**  
C.I. 24.528.580

Por haber cumplido con las actividades programadas, de acuerdo con el art. 12 de la Normativa General del CCNPG-CNU (Gaceta Oficial N° 37.328 del 20.11.2001), en el Curso de Actualización No Conducente a Grado Académico:

**Manipulación de Animales de Laboratorio**  
Realizado en Mérida del 05 al 19 de Abril de 2018  
Constando el mismo de (52) horas teóricas, equivalentes a (03) Unidades Crédito.

  
Dr. José Giménez  
Coordinador de la División de Postgrado  
Facultad de Ciencias

  
Dra. Laura M. Calderín G.  
Coordinadora General  
Consejo de Estudios de Postgrado

  
Prof. Belkis Quiñonez  
Coordinadora del Curso

*Este Certificado puede Registrarse en el CEP bajo el N° 8061 del libro N° 1 en la fecha 25-05-18*

---

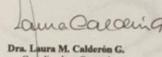
 **REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA**  
**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES**  
**VICERRECTORADO ACADÉMICO**  
**CONSEJO DE ESTUDIOS DE POSTGRADO** 

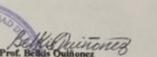
OTORGAN EL PRESENTE  
CERTIFICADO DE APROBACIÓN  
A  
**SAYAGO CARRERO GABRIELA A.**  
C.I. 20.850.931

Por haber cumplido con las actividades programadas, de acuerdo con el art. 12 de la Normativa General del CCNPG-CNU (Gaceta Oficial N° 37.328 del 20.11.2001), en el Curso de Actualización No Conducente a Grado Académico:

**Manipulación de Animales de Laboratorio**  
Realizado en Mérida del 05 al 19 de Abril de 2018  
Constando el mismo de (52) horas teóricas, equivalentes a (03) Unidades Crédito.

  
Dr. José Giménez  
Coordinador de la División de Postgrado  
Facultad de Ciencias

  
Dra. Laura M. Calderín G.  
Coordinadora General  
Consejo de Estudios de Postgrado

  
Prof. Belkis Quiñonez  
Coordinadora del Curso

*Este Certificado puede Registrarse en el CEP bajo el N° 8063 del libro N° 1 en la fecha 25-05-18*