

# Comparación de métodos histoquímicos para el análisis histológico de muestras de encía humana

## *Comparison of histochemical methods for the histological analysis of human gingival samples*

Víctor Simancas-Escorcía<sup>1</sup> , Jocsan Leal-Betancur<sup>1</sup> , Antonio Díaz-Caballero<sup>1</sup> , Jennifer Orozco-Páez<sup>2</sup> 

### RESUMEN

**Introducción:** Las técnicas de coloración histológica son útiles en el análisis ultraestructural de muestras tisulares, incluyendo el tejido gingival.

**Objetivo:** Comparar la utilidad de tres métodos histoquímicos (hematoxilina-eosina, Masson Goldner y rojo sirio) en la identificación de elementos celulares y otros constituyentes del tejido gingival.

**Métodos:** Estudio experimental in vitro que comprendió el análisis de tejidos gingivales de donantes sanos sin signos de inflamación gingival y con indicación de cirugía periodontal. Las muestras de encía se obtuvieron mediante gingivectomía, se procesaron e incluyeron en parafina, posteriormente se realizaron cortes con un micrótopo y se depositaron en portaobjetos de adhesión con polisina. Las muestras se agruparon y fueron teñidas con hematoxilina-eosina, Masson Goldner y rojo sirio, finalmente fueron visualizadas en un microscopio óptico Leica DM 750®. La lectura de los hallazgos fue realizada por patólogos orales.

**Resultados:** La coloración hematoxilina-eosina evidencia elementos celulares y extracelulares del tejido epitelial y conectivo. Núcleos de color azul violeta, citoplasmas rosados, fibras de colágeno de matiz rosa claro, arteriolas y vénulas con túnica adventicia, media e íntima diferenciadas. La coloración Masson Goldner diferencia núcleos de coloración púrpura y citoplasma fucsia, presenta especificidad en identificar fibras de colágeno con tonalidad verde, distribuidas densa, homogénea y paralelamente en el tejido conectivo gingival. La tinción rojo sirio, permitió identificar las fibras de colágeno de color rosa brillante, mientras que el tejido epitelial y los vasos sanguíneos fueron de color amarillo.

**Conclusión:** Cada coloración histológica evaluada en el presente trabajo tiene cierta afinidad y sensibilidad por estructuras celulares y componentes de la matriz extracelular específica. Su empleo es útil en el estudio de tejidos gingivales y podrían contribuir en el análisis de biopsias gingivales.

**Palabras clave:** coloración histológica; encía; hematoxilina; colágeno; fibroblastos.

### ABSTRACT

**Introduction:** Histological staining techniques are useful in the ultrastructural analysis of tissue samples, including gingival tissue.

**Objective:** Compare the usefulness of three histochemical methods (hematoxylin-eosin, Masson-Goldner and sirius red) for identification of cellular elements and other constituents of gingival tissue.

**Methods:** An in vitro experimental study was conducted which included the analysis of gingival tissue from healthy donors without gingival inflammation signs and indication of periodontal surgery. The gum samples were obtained by gingivectomy, processed with paraffin, cut with a microtome and placed on Polysine adhesion slides. The samples were grouped, stained with hematoxylin-eosin, Masson Goldner and sirius red, and visualized under a Leica DM 750® microscope. Reading of the findings was performed by oral pathologists.

**Results:** Hematoxylin-eosin staining found cellular and extracellular elements of the epithelial and connective tissue: violet-blue nuclei, pink cytoplasm, light rose collagen fibers, and arterioles and venules with differentiated tunica adventitia, media and intima. Masson-Goldner staining differentiated purple nuclei and fuchsia cytoplasm. It displayed specificity identifying green collagen fibers with dense, homogeneous and parallel distribution in the gingival connective tissue. Sirius red staining allowed identification of bright rose collagen fibers, whereas epithelial tissue and blood vessels were yellow.

**Conclusion:** Each of the histological staining methods evaluated in the study shows a certain affinity with and sensitivity to cellular structures and components of the specific extracellular matrix. All three are useful for the study of gingival tissue and could contribute to the analysis of gingival biopsies.

**Keywords:** histological staining, gum, hematoxylin, collagen, fibroblasts.

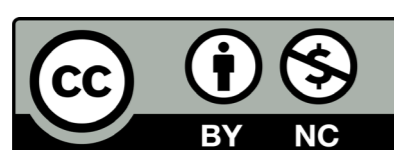
## INTRODUCCIÓN

El periodonto participa en la protección, irrigación y estabilidad de los órganos dentarios. La encía, componente del periodonto, es una mucosa que

Recibido: 22/08/2020  
Aceptado: 15/12/2020

<sup>1</sup> Universidad de Cartagena, Facultad de Odontología, Grupo Interdisciplinario de Investigaciones y Tratamientos Odontológicos Universidad de Cartagena (GITOU). Cartagena, Colombia.

<sup>2</sup> Corporación Universitaria Rafael Núñez, Facultad de Ciencias de la Salud, Programa de Odontología. Cartagena, Colombia.



contornea los dientes y funciona como barrera de protección. El tejido epitelial especializado que integra la encía, es un facilitador de estas funciones protectoras. Principalmente, frente a factores exógenos como los agentes microbianos y las fuerzas mecánicas.<sup>(1)</sup> El tejido conectivo que lo acompaña está constituido por fibras de colágeno y elementos celulares como fibroblastos gingivales, mastocitos, linfocitos, monocitos y macrófagos.<sup>(2)</sup> La lámina propia gingival implica un componente papilar y uno reticular: el primero, consiste en papilas de tejido conectivo intraepitelial, con un asa capilar terminal, una arteria ascendente y una extremidad venosa descendente; el segundo, comprende la porción restante de la lámina propia con abundantes fibras de colágeno.<sup>(3)</sup> Los métodos histoquímicos, entre ellos, las tinciones o coloraciones histológicas, permiten la identificación de células y elementos constitucionales de los tejidos. Los colorantes utilizados en esta técnica se clasifican en ácidos, básicos o neutros. Los colorantes ácidos se conocen como citoplasmáticos y los colorantes básicos son denominados nucleares.<sup>(4)</sup> Existe una variedad de tinciones histológicas que podrían ser útiles en el análisis del tejido gingival de individuos sanos, entre ellas, la tinción con hematoxilina-eosina (HE), Masson Goldner (MG) y rojo sirio (RS).

La tinción HE, comúnmente utilizada en la investigación histológica, está compuesta por dos colorantes: la hematoxilina, que por ser básica tiñe estructuras ácidas en tonos azul violeta como los núcleos, la cromatina y la membrana nuclear pero no el nucleoplasma; el otro componente es la eosina, de pH ácido, tiñe los componentes básicos haciéndolos visibles en tonos de color rosa, entre ellos el citoplasma, fibras elásticas, fibras de colágeno y fibras musculares. La eosina es capaz de producir tres matices que permiten diferenciar los glóbulos rojos entre naranja-rojizo oscuro, el colágeno de un color rosa claro y el músculo liso en rosa brillante.<sup>(5)</sup> Por su parte, la tinción MG, emplea tres colorantes: la hematoxilina férrica, para diferenciar el núcleo celular; la fucsina, para observar el citoplasma y tejido muscular; el azul de anilina o verde luz, para identificar las fibras de colágeno y las fibras reticulares del tejido conectivo gingival.<sup>(6)</sup> Otra técnica, la tinción RS es utilizada en la identificación del colágeno tisular. Esta coloración revela la organización y heterogeneidad de la orientación de las fibras de colágeno en tejidos conectivos. El color emitido varía dependiendo de la fibra de colágeno: el colágeno tipo I, se muestra como un amarillo brillante, naranja o rojo; el colágeno tipo II, varía entre azul y amarillo dependiendo de la naturaleza del tejido; y el colágeno tipo III, generalmente acompañado del colágeno tipo I, se tiñe de color verde. Así mismo, el RS tiñe las membranas basales debido al colágeno tipo IV que poseen.<sup>(7,8)</sup>

El estudio histológico es fundamental en la investigación médica y odontológica, al permitir evaluar componentes celulares y extracelulares a partir de la observación. Este análisis ofrece información útil que puede ser complementaria en el establecimiento de un diagnóstico clínico. Con el propósito de reconocer la importancia del estudio histológico en el área de la odontología, el objetivo de esta investigación fue comparar la utilidad de tres métodos histoquímicos (hematoxilina-eosina, Masson Goldner y rojo sirio) en la identificación de elementos celulares y otros constituyentes del tejido gingival.

## MÉTODOS

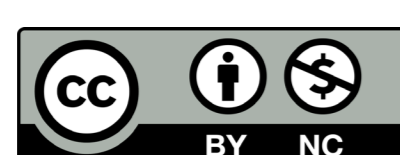
Se realizó un estudio experimental *in vitro*. La población y muestra del estudio estuvo conformada por cortes histológicos de biopsias de encía marginal humana donadas por siete individuos seleccionados por conveniencia. Todos los donantes cumplieron con los siguientes criterios de inclusión: sujetos inscritos en la clínica integral del adulto de la Universidad de Cartagena, que estuvieran recibiendo atención odontológica, cuya edad estuviera en un rango comprendido entre los 18 y 30 años; pacientes sistémica y periodontalmente sanos, con indicación de cirugía gingival por razones estéticas o protésicas y con un índice de placa O'Leary  $\leq 15$  %.

Todas las muestras fueron obtenidas de donantes sometidos al mismo procedimiento quirúrgico: la gingivectomía. Esta se realizó bajo anestesia local con lidocaína (2 %) + epinefrina 1:80000 aplicada mediante la técnica infiltrativa en el área quirúrgica. El margen de encía se obtuvo mediante la combinación de una incisión intrasurcular y otra a bisel externo, realizadas con una hoja de bisturí No.15.

Este trabajo contó con la aprobación del Comité de Ética en Investigaciones de la Universidad de Cartagena. A todos los participantes se les explicó el objetivo de la investigación, los fines del procesamiento y estudio de sus muestras de encía. Una vez conocida la información, diligenciaron, aprobaron y firmaron el consentimiento informado de acuerdo a los principios declarados en la Declaración de Helsinki y la resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia.

### Procesamiento de muestras

Las muestras recuperadas fueron lavadas en solución salina tamponada con fosfato (PBS 1X, Gibco™) y fijadas en paraformaldehído (PFA) al 4 % durante 48 horas. Los procedimientos de deshidratación, inclusión y corte fueron pasos comunes para los tres métodos histoquímicos objeto de estudio. Las muestras se extrajeron del PFA y fueron deshidratadas en pasajes crecientes de alcohol (30 %, 60 %, 80 %, 95 %, 100 %), cinco minutos en cada solución de alcohol; seguido de dos baños en xileno (Leica Biosystems®) y embebidas en parafina lí-



quida durante toda la noche. Con la obtención de los bloques, los tejidos fueron cortados con un espesor de 5  $\mu\text{m}$ , utilizando un micrótopo Leica RM2125 RST y colectados en portaobjetos de adhesión con polisina (Thermo Scientific™). Se tomó una muestra de encía por paciente, la cual fue incluida en un bloque de parafina. Se seleccionaron tres láminas consecutivas que contenían tres cortes histológicos, cada una por cada bloque que posteriormente fue destinado para la realización de las tinciones HE, MG y RS. Todos los experimentos se realizaron en la Unidad de Investigación de Ciencias Básicas Odontológicas de la Universidad de Cartagena, Colombia.

### Coloraciones histoquímicas

Los cortes de tejidos gingivales fueron desparafinados con xileno y luego se rehidrataron en soluciones de alcohol con concentraciones decrecientes (100 %, 95 %, 80 %, 60 %, 30 %), un baño de cinco minutos en cada solución.

**Hematoxilina-eosina:** inició con la inmersión de los cortes en hematoxilina de Mayer durante cinco minutos y dos lavados en agua corriente. Posteriormente, se realizó una diferenciación ácido-alcohol durante 30 segundos, enjuague en agua destilada, inmersión en eosina durante tres minutos y un lavado en agua corriente. Los cortes fueron deshidratados en alcohol (70 %, 95 %, 100 %), sumergidos en xileno y montados en un medio anhidro (DPX®, Sigma-Aldrich).

**Masson Goldner:** fue iniciada con la inclusión de los tejidos en hematoxilina de Mayer durante 20 minutos, lavado en agua destilada y una diferenciación ácido-alcohol durante 30 segundos. Luego, se procedió a la inmersión de los tejidos en solución de azofloxina (10 minutos), solución de ácido fosfolvofrámico-anaranjado G (un minuto) y verde luz (dos minutos). Cada inmersión estuvo acompañada de un enjuague en ácido acético (1 %) durante 30 segundos. Finalmente, se procedió a la deshidratación en alcohol, lavados en xileno y montaje de los tejidos en DPX.

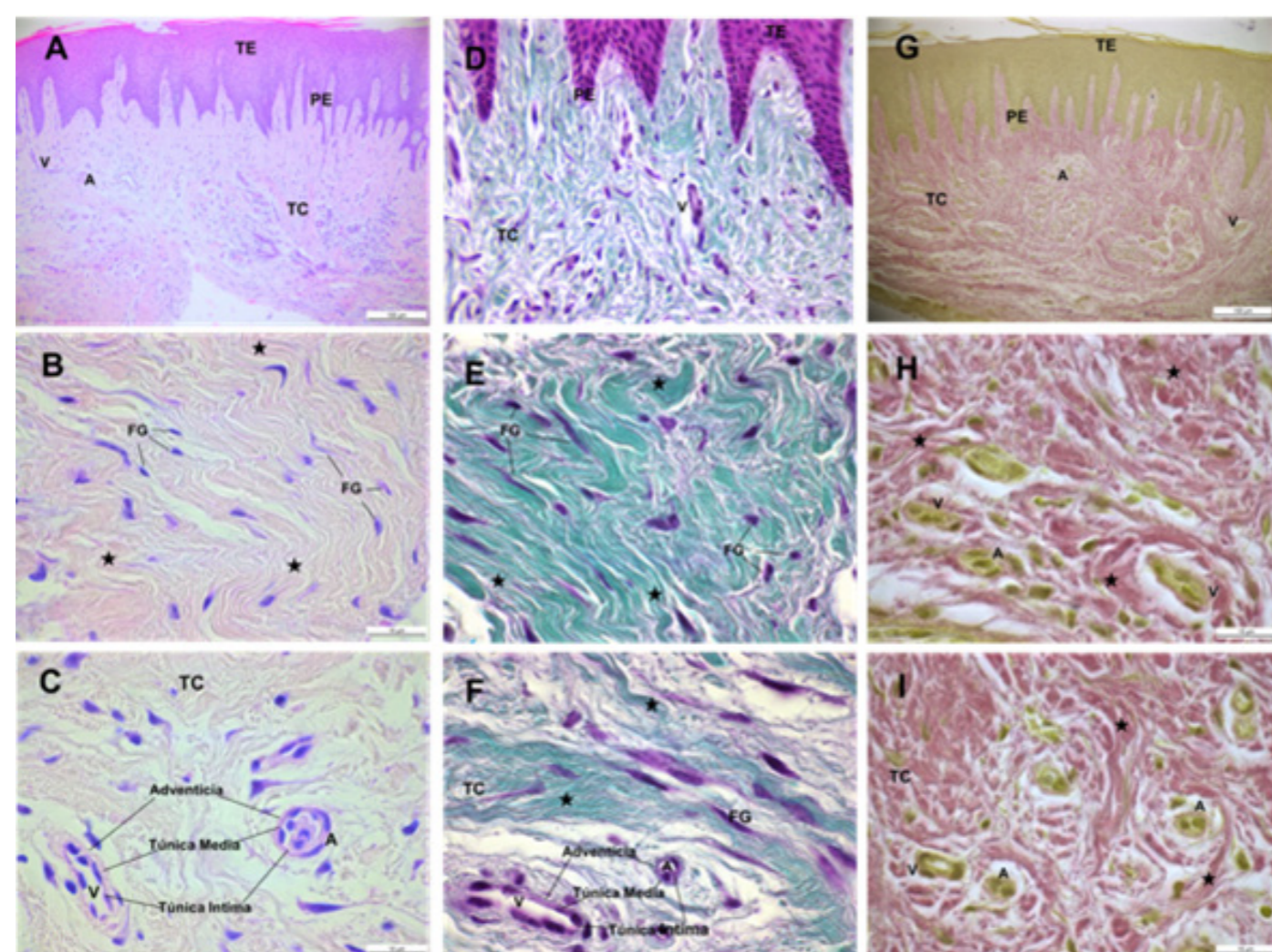
**Rojo sirio:** inició con la inmersión de los tejidos en hematoxilina de Mayer durante cinco minutos, seguido de un enjuague en agua corriente y agua destilada. A continuación, los cortes fueron sumergidos en el colorante rojo sirio durante 15 minutos. En último lugar, se llevó a cabo la deshidratación en alcohol, lavados en xileno y montaje de las láminas en DPX.

Todas las observaciones fueron realizadas en un microscopio óptico Leica® DM 750 acoplado a una cámara fotográfica.

## RESULTADOS

### Coloración con hematoxilina-eosina (HE)

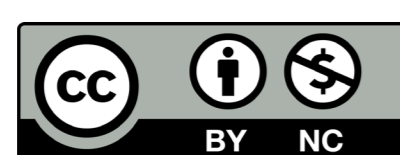
Los tejidos gingivales teñidos con HE distinguen un epitelio escamoso estratificado paraqueratinizado con múltiples elementos celulares con núcleos púrpuras, de forma ovalada, aplanada y citoplasma de color rosa; subyacente a estos, se observaron múltiples prolongaciones epiteliales, donde se identificó la membrana basal teñida de rosa claro (Fig. 1A). El tejido conectivo expuso una red densa y homogénea de fibras de colágeno, caracterizadas por emitir un color rosa claro. Entre estas fibras se identificaron múltiples fibroblastos gingivales con núcleos azules, ovoides y alargados y citoplasmas de matiz rosa (Fig. 1B). Se hallaron numerosas arteriolas y vénulas, identificándose sus capas constituyentes: la túnica íntima, evidente por las células endoteliales con núcleos azulados; la túnica media, identificada por las fibras musculares rosa oscuro; y la túnica adventicia, evidente por sus fibras de colágeno con matiz rosa claro. Las arteriolas presentan una estructura menos tortuosa, más gruesa y diámetro menor en comparación con las vénulas (Fig. 1C).



**Fig. 1** - Microfotografías de secciones histológicas de encía sana con tinciones histoquímicas. Tinción hematoxilina-eosina: **A.** Aspecto general del tejido epitelial (TE) y conectivo gingival. **B.** Tejido conectivo (TC) con presencia de fibras de colágeno y fibroblastos gingivales. **C.** Identificación de vasos sanguíneos en el tejido gingival. Tinción Masson Goldner: **D.** Se evidencia prolongaciones epiteliales (PE) y tejido conectivo con sus elementos celulares. **E.** Aspecto de fibras de colágeno (estrella) y fibroblastos gingivales (FG). **F.** Vasos sanguíneos y células adyacentes. Tinción rojo sirio: **G.** Se observa tejido epitelial (TE) y tejido conectivo (TC) subyacente. **H.** Identificación de fibras de colágeno (estrella) y redes vasculares. **I.** Elementos anatómicos y fibras de colágeno en encía sana.

V: vénula; A: arteriola; FG: fibroblastos gingivales; Estrella: fibras de colágeno.

Barra negra: 100  $\mu\text{m}$  (A,D,G), 10  $\mu\text{m}$  (B,C,E, F,H,I).



### Coloración Masson Goldner (MG)

Las muestras teñidas con el método MG expusieron prolongaciones epiteliales dirigidas al tejido conectivo y, junto a estas, numerosas células basales con núcleos morados y ovalados, rodeados por un citoplasma fucsia (Fig. 1D). En el tejido conectivo se identificaron fibras de colágeno de tonalidad verde, paralelas entre sí, extendiéndose densa y homogéneamente por el tejido. Entre las fibras de colágeno se observaron múltiples fibroblastos gingivales con núcleos morados, alargados y citoplasma de color fucsia (Fig. 1E). Se distinguieron vénulas y arteriolas, diferenciándose sus capas constituyentes, igual que en la coloración HE. Fue destacable la túnica media por el tejido muscular fucsia oscuro (Fig. 1F).

### Coloración rojo sirio (RS)

Las muestras gingivales evaluadas con esta coloración manifiestan papilas intraepiteliales de tejido conectivo, que se insertan en el epitelio suprayacente (Fig. 1G). Las células del epitelio fueron identificadas de color amarillo. En el tejido conectivo con esta tinción fue limitada la observación de los elementos celulares. Sin embargo, fue posible apreciar los haces de fibras de colágeno. Las fibras de colágeno se identificaron de color rosa brillante y dispuestas en diversas direcciones (Fig. 1G, 1H). Se distinguieron múltiples arteriolas y vénulas, las arteriolas con forma más homogénea y diámetro menor que las vénulas (Fig. 1H, 1I).

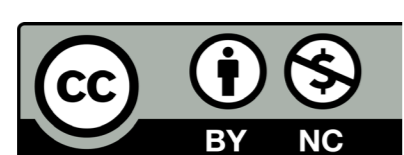
En la tabla 1 se resumen los hallazgos histológicos identificados por medio de cada método histoquímico.

**Tabla 1 - Comparación de métodos histoquímicos**

Tinción	Estructura visible	Descripción	Ventajas	Desventajas
Hematoxilina-eosina	Núcleo	Azul violeta con formas alargada, aplanada u ovalada	<ul style="list-style-type: none"> <li>Provee visión global del tejido epitelial y conectivo gingival.</li> <li>Permite identificar elementos celulares y extracelulares básicos.</li> <li>De fácil empleo y bajo costo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Baja especificidad hacia estructuras moleculares más complejas como fibras reticulares, elásticas, proteoglicanos y glucosaminoglicanos</li> <li>Nula capacidad para determinar factores tisulares específicos</li> </ul>
	Citoplasma	Rosado, contrastando con el núcleo celular		
	Membrana basal	Rosa claro, siguiendo contorno del epitelio		
	Fibras de colágeno	Rosa claro / anaranjado, mostrándose densas y homogéneas		
	Arteriolas y vénulas	Rosa claro (citoplasma) / Azul violeta (núcleos)		
Masson Goldner	Núcleo	Matiz morado, formas alargada u ovalada	<ul style="list-style-type: none"> <li>Brinda visión de la arquitectura molecular y celular de tejido epitelial y conectivo gingival</li> <li>Específico para resaltar e identificar las fibras de colágeno en general</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Incapacidad de distinguir los subtipos de colágeno presentes en el tejido</li> <li>Baja especificidad para factores tisulares o estructuras moleculares más complejas</li> </ul>
	Citoplasma	Rosado a rojo, contrastando con el núcleo celular		
	Membrana basal	Morado, guiada por el contorno del epitelio		
	Hematíes/ Queratina	Rojo vivo		
	Fibras de colágeno	Tonalidad verde, con disposición paralela, densa y homogénea		
	Arteriolas y vénulas	Tonalidad fucsia		
Rojo sirio	Núcleo / Citoplasma	Amarillo	La tinción es específica para las fibras de colágeno, permitiendo identificar cada uno de los subtipos presentes en la muestra	<ul style="list-style-type: none"> <li>No permite identificar elementos celulares y extracelulares diferentes a las fibras de colágeno</li> <li>Limitación de empleo en casos de nula accesibilidad a microscopía de luz polarizada</li> </ul>
	Membrana basal	Amarillo, siguiendo contorno del epitelio		
	Fibras de colágeno	Tonalidad roja		
	Arteriolas y vénulas	Identificable de color amarillo		

## DISCUSIÓN

En la presente investigación se compararon tres métodos de tinción diferentes en la identificación de elementos celulares y otros constituyentes del tejido gingival: hematoxilina-eosina, Masson Goldner y rojo sirio. La HE permitió un buen contraste entre el núcleo, citoplasma y las estructuras extracelulares del tejido epitelial. Esta identificación de las estructuras tisulares gingivales, seguramente fue posible por las variaciones en la carga y en los niveles de acidez de las estructuras constituyentes. Otros estudios señalan que la hema-



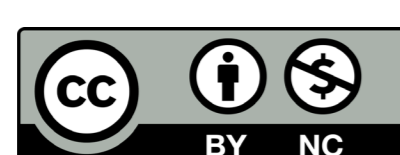
toxilina no es un tinte por sí mismo, primero se oxida con el fin de obtener su forma activa, la hemateína, y luego se combina con una sustancia mordiente (sulfato de aluminio de potasio o sal ferrosa), para fijar el tinte y permitir que las estructuras tomen la coloración correspondiente. Estructuras como los ácidos nucleicos, glicosaminoglicanos y glicoproteínas ácidas, tendrán un color azul o púrpura.<sup>(9)</sup> Esto fue constatado en las muestras gingivales del presente estudio, al identificar de color azul violeta, el núcleo de las células epiteliales, los fibroblastos gingivales y las células endoteliales de los vasos sanguíneos. Por su parte, la eosina puso en evidencia con un color rosa los componentes básicos, incluidos el citoplasma, las mitocondrias, gránulos secretorios y estructuras extracelulares como el colágeno, tal como han sido reportados previamente.<sup>(10)</sup>

La tinción HE, contrastó las estructuras presentes en la matriz extracelular. Aunque este trabajo investigativo se limitó al análisis de muestras de tejido gingival sano, la hematoxilina también permite identificar materiales extracelulares presentes en ciertas enfermedades. La eosina puede teñir también la fibrina, membrana basal, matriz osteoide, entre otros.<sup>(9,11)</sup> La HE, además de caracterizar los aspectos normales de un tejido, también ha permitido evaluar el grado de evolución y malignidad de diversas lesiones, incluyendo el carcinoma oral de células escamosas. Otras investigaciones reportan que mediante la tinción HE lograron identificar el grado de queratinización, células epiteliales malignas, grado de diferenciación e infiltración de células inflamatorias.<sup>(12)</sup> Por su parte, Almeida y otros<sup>(13)</sup> evaluaron muestras de tejido gingival con gingivitis crónica y periodontitis crónica, a partir de lo cual reportaron numerosos fibroblastos, un epitelio escamoso estratificado con un tejido conectivo subyacente constituido por gruesas fibras de colágeno y distribuidas paralelamente. En la presente investigación, las muestras de tejido gingival presentaron una arquitectura epitelial y del tejido conectivo similar a las expuestas con los elementos celulares, extracelulares y vasculares descritos anteriormente. A pesar de su simplicidad, la HE tiene algunas limitaciones, entre ellas, su deficiente capacidad para determinar factores específicos involucrados en la etiología, patogénesis e histogénesis de ciertas enfermedades. Ante ello, es necesario vislumbrar estudios complementarios mediante técnicas de inmunohistoquímica, citometría de flujo y citogenética.

La técnica MG reconoció particularmente las fibras de colágeno. Su mecanismo de acción se asemeja a la técnica HE, gracias a la unión entre los colorantes y las estructuras por medio de la atracción entre las cargas opuestas. Esta coloración histológica permitió identificar con claridad también las células que integran el tejido epitelial y conectivo, por lo que podría ser útil en la investigación de enfermedades que afectan el depósito de colágeno. Un estudio realizado por Kim y otros<sup>(14)</sup> valoró muestras de tejido gingival sano y de pacientes con hipertrofia gingival inducida por fenitoína. A partir de esta tinción, se observó un epitelio escamoso estratificado con múltiples prolongaciones epiteliales y la acumulación de fibras de colágeno en el tejido conectivo, de tonalidad verde. Estos hallazgos se relacionan con los descritos en los individuos evaluados en el presente estudio. Aquí detectamos haces de fibras de colágeno de color verde y establecimos de manera clara, la arquitectura epitelio-mesenquimatoso del tejido gingival. Kanneganti y otros.<sup>(15)</sup>, en muestras de 30 pacientes diagnosticados con fibrosis submucosa oral, observaron gracias a la tinción MG, los depósitos de fibras de colágeno de color azul oscuro en el tejido conectivo, mientras que esta tonalidad contrastaba con las fibras musculares teñidas de rojo brillante. Aunque, los tejidos gingivales evaluados fueron patológicos, los hallazgos revelan las ventajas de la coloración MG.

Respecto a la coloración RS, esta hizo evidente las fibras de colágeno de tejido gingival. El mecanismo de coloración de esta tinción se basa en fenómenos ópticos originados por las propiedades de las fibras de colágeno. En ellas, la luz que reflejan depende de la orientación de la molécula respecto a la luz que la incide. Cuando la luz incide en la fibra de colágeno se produce un fenómeno de birrefringencia, generándose dos rayos que viajan a diferente velocidad y con direcciones de vibración orientadas 90° entre sí. Al emplear el RS, este se une a varias estructuras, sin embargo, cuando se enlaza al colágeno, se dirige en forma paralela a estas fibras, mejorando su birrefringencia natural y siendo la unión de estas mucho más birrefringente que las otras proteínas a las cuales se unió el RS.

Para observar específicamente el colágeno tisular, es necesario que la muestra sea observada en un microscopio de luz polarizada, de lo contrario, todas las áreas se muestran color rojo y rosado.<sup>(8)</sup> En la actual investigación no se empleó la microscopía polarizada para identificar las fibras de colágeno de las muestras gingivales, evento que limitó la identificación de los diferentes subtipos de fibras de colágeno presentes en el tejido gingival. En su lugar, se identificó una red de fibras de colágeno de color rojo intenso, empleando únicamente la coloración y observación en un microscopio de luz. La inclusión de esta tinción en el actual trabajo fue con el propósito de exponer su utilidad y pertinencia al momento de realizar estudios comparativos entre los subtipos de colágeno tisular. Por ejemplo, Arora y otros<sup>(16)</sup> analizaron y compararon los cambios en el colágeno a través de la coloración RS en muestras de leucoplasia oral, fibrosis submucosa oral y carcinoma epidermoide oral. Los resultados indicaron cambios en las fibras de colágeno en las condiciones patológicas evaluadas. Estos autores concluyeron que la evaluación histológica con RS es un método fácil y confiable para determinar el estado del estroma de los casos evaluados. Por su parte, Roman y otros<sup>(17)</sup> estudiaron biopsias de pacientes con fibromatosis gingival hereditaria, evaluando el colágeno depositado en el tejido conectivo gingival a partir de la coloración RS, observando un incremento en la síntesis del colágeno en ambos pacientes.



Estos datos demuestran la efectividad de la tinción RS en tejido gingival, tal como se expresa en la presente investigación.

Este estudio demuestra la utilidad de las técnicas HE, MG y RS en la examinación histológica del tejido gingival. Cada una de estas tinciones posee una afinidad y sensibilidad específica en la identificación de células y componentes de la matriz extracelular.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

1. Koller A, Sapra A. *Anatomy, Head and Neck, Oral Gingiva*. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 [acceso: 20/08/2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560662/>
2. Simancas-Escorcía V, Díaz-Caballero A. *Fisiología y usos terapéuticos de los fibroblastos gingivales*. Odous Científica. 2019 [acceso: 20/08/2020]; 20(1): 41-57. Disponible en: <http://servicio.bc.uc.edu.ve/odontologia/revista/vol20n1/art05.pdf>
3. Moutsopoulos NM, Konkel JE. *Tissue specific immunity at the oral mucosal barrier*. Trends Immunol. 2018;39(4):276-87. PMID: [28923364](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28923364/)
4. Alturkistani HA, Tashkandi FM, Mohammedsaleh ZM. *Histological Stains: A Literature Review and Case Study*. Glob J Health Sci. 2016;8(3):72-9. Disponible en: <http://www.ccsenet.org/journal/index.php/gjhs/article/view/48521>
5. Wick MR. *The hematoxylin and eosin stain in anatomic pathology - An often-neglected focus of quality assurance in the laboratory*. Seminars in Diagnostic Pathology. 2019 [acceso: 20/08/2020]; 36(5):303-11. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0740257019300619>
6. Salazar L, Moreno F. *Comparación de tres tipos de tinciones histoquímicas en secciones histológicas de paladar y lengua de rata Wistar*. Saltem Scientia Spiritus. 2017 [acceso: 20/08/2020]; 2(2). Disponible en: <https://revistas.javerianacali.edu.co/index.php/saltemscientiaspiritus/article/view/155>
7. Lattouf R, Younes R, Lutomski D, Naaman N, Godeau G, Senni K, et al. *Picrosirius red staining: a useful tool to appraise collagen networks in normal and pathological tissues*. J Histochem Cytochem. 2014 [acceso: 20/08/2020]; 62(10):751-8. Disponible en: <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1369/0022155414545787>
8. Rittié L. *Method for Picrosirius Red-Polarization Detection of Collagen Fibers in Tissue Sections*. Methods Mol Biol. 2017;1627:395-407. DOI: [10.1007/978-1-4939-7113-8\\_26](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7113-8_26)
9. Feldman AT, Wolfe D. *Tissue Processing and Hematoxylin and Eosin Staining*. In: Day CE, editor. *Histopathology: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer; 2014. p. 31-43. DOI: [10.1007/978-1-4939-1050-2\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1050-2_3)
10. Simancas-Escorcía VH, Carmona Lorduy M, Díaz-Caballero A. *Immunolocalization of s100a4 and a-sma in gingival tissues of patients with gingival hypertrophy due to orthodontic treatment: preliminary study*. Archmed. 2021 [acceso: 20/08/2020]; 21(1). Disponible en: <http://revistasum.umanizales.edu.co/ojs/index.php/archivosmedicina/article/view/3693>
11. Chan JKC. *The wonderful colors of the hematoxylin-eosin stain in diagnostic surgical pathology*. Int J Surg Pathol. 2014;22(1):12-32. PMID: [24406626](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24406626/)
12. Kalele K, Kulkarni N, Kathariya R. *Oral Squamous Cell Carcinoma: Hematoxylin and Eosin Staining*. J Clin Diagn Res. 2015;9(9):ZJ01. PMID: [PMC4606365](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24406635/)
13. Almeida T, Valverde T, Martins-Júnior P, Ribeiro H, Kitten G, Carvalhoes L. *Morphological and quantitative study of collagen fibers in healthy and diseased human gingival tissues*. Rom J Morphol Embryol. 2015 [acceso: 20/08/2020]; 56(1):33-40. Disponible en: <https://rjme.ro/RJME/resources/files/560115033040.pdf>
14. Kim SS, Nikoloudaki G, Darling M, Rieder MJ, Hamilton DW. *Phenytoin activates Smad3 phosphorylation and periostin expression in drug-induced gingival enlargement*. Histol Histopathol. 2018 [acceso: 20/08/2020]; 33(12):1287-98. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/215391509.pdf>
15. Kanneganti S, Kattappagari KK, Tanuja K, Chandra KLP, Poosarla C, Baddam VRR. *Oral submucous fibrosis: Clinical and histopathological correlation of collagen fibers using Masson's trichrome and Van Gieson stains*. Journal of Dr NTR University of Health Sciences. 2018 [acceso: 20/08/2020]; 7(3):181. Disponible en: [http://www.jdrntruhs.org/temp/JNTRUnivHealthSci73181-263634\\_071923.pdf](http://www.jdrntruhs.org/temp/JNTRUnivHealthSci73181-263634_071923.pdf)
16. Arora KS, Nayyar A, Kaur P, Arora KS, Goel A, Singh S. *Evaluation of Collagen in Leukoplakia, Oral Submucous Fibrosis and Oral Squamous Cell Carcinomas Using Polarizing Microscopy and Immunohistochemistry*. Asian Pac J Cancer Prev. 2018;19(4):1075-80. PMID: [PMC6031770](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/306031770/)
17. Roman-Malo L, Bullon B, de Miguel M, Bullon P. *Fibroblasts Collagen Production and Histological Alterations in Hereditary Gingival Fibromatosis*. Diseases. 2019;7(2). PMID: [PMC6631910](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/326631910/)

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.

## CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES

**Conceptualización:** Víctor Simancas-Escorcía, Antonio Díaz-Caballero.

**Curación de datos:** Víctor Simancas-Escorcía, Antonio Díaz-Caballero.

**Análisis formal:** Víctor Simancas-Escorcía, Jocsan Leal-Betancur, Antonio Díaz-Caballero, Jennifer Orozco-Páez.

**Investigación:** Víctor Simancas-Escorcía, Jocsan Leal-Betancur, Antonio Díaz-Caballero, Jennifer Orozco-Páez.

**Metodología:** Víctor Simancas-Escorcía, Jocsan Leal-Betancur, Antonio Díaz-Caballero, Jennifer Orozco-Páez.

**Administración del proyecto:** Víctor Simancas-Escorcía, Antonio Díaz-Caballero.

**Supervisión:** Víctor Simancas-Escorcía, Antonio Díaz-Caballero.

**Validación:** Víctor Simancas-Escorcía, Antonio Díaz-Caballero.

**Visualización:** Víctor Simancas-Escorcía, Antonio Díaz-Caballero.

**Redacción - borrador original:** Víctor Simancas-Escorcía, Antonio Díaz-Caballero.

**Redacción - revisión y edición:** Víctor Simancas-Escorcía, Jocsan Leal-Betancur, Antonio Díaz-Caballero, Jennifer Orozco-Páez.

