

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA
U. N. A. M.**

Carrera de Cirujano Dentista

**EL PAPEL DE LA COLAGENASA EN LA PRODUCCION
DE CARIES**

**Ferrer Arreola Cynthia Teresa
Rojkind Halpert Jaqueline**



San Juan Iztacala, México 1984



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

INTRODUCCION,	1
ESTRUCTURA DENTARIA,	1
1) Esmalte,	1
2) Cemento,	2
3) Dentina,	3
4) Pulpa Dentaria,	5
ETIOLOGÍA DE LA CARIES,	6
1) Teoría Acídógena,	6
2) Teoría Proteolítica,	7
3) Teoría de la Proteólisis y Quelación,	8
COLÁGENA,	13
1) Propiedades Físico-Químicas,	14
COLAGENASA,	15
OBJETIVO DEL TRABAJO,	16
MATERIALES Y METODOS,	17
REACTIVOS UTILIZADOS,	17
OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS,	19
DISTRIBUCIÓN DE LAS MUESTRAS,	20
PREPARACIÓN DE COLÁGENA,	22
1) Colágena de Riñón de Res,	22
2) Colágena de Tendón de Cola de Rata,	24
PROCEDIMIENTO PARA MEDIR LA CANTIDAD DE COLAGENASA PRESENTE,	24
IDENTIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN, ..	26
1) Marcado de Colágena con C^{14} ,	26
2) Toma de Muestras para Determinar los Productos de la Degradación,	27
3) Incubación de las Muestras Obtenidas con Colágena Marcada con C^{14} ,	27
DETERMINACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN, ...	29

RESULTADOS,	30
IDENTIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS,	36
DISCUSION,	38
RESUMEN Y CONCLUSIONES,	43
BIBLIOGRAFIA,	45

INTRODUCCION

La caries dental es una enfermedad de los tejidos calcificados del diente, que se caracteriza por la desmineralización de la parte inorgánica y la destrucción de la sustancia orgánica de la pieza¹. Es una enfermedad infecciosa caracterizada por una serie de reacciones químicas complejas que resultan en primer lugar, en la destrucción del esmalte dentario y posteriormente, si no se le detiene, en la de todo el diente. La destrucción mencionada es la consecuencia de la acción de agentes químicos que se originan en el ambiente inmediato a las piezas dentarias².

Para poder entender el proceso de la caries dental, es necesario conocer primeramente dos puntos fundamentales que son:

- 1) La estructura dentaria.
- 2) La etiología de la caries dental.

ESTRUCTURA DENTARIA.

El diente se encuentra formado por cuatro tejidos principales que son: esmalte, cemento, dentina y pulpa.

- 1) *Esmalte.*

Recubre la corona del diente. Su dureza y, asimismo, su fragilidad, se deben al contenido extremadamente alto de -

sales minerales. Su espesor varía de 2 a 2.5 mm a nivel del borde incisivo o cúspide, hasta cero en la unión del esmalte con el cemento. Es translúcido y de color blanco o gris azulado a nivel del borde incisal, y amarillento en el resto del diente, debido a la coloración amarillenta de la dentina.

- a) Composición química: 92-96% de materia inorgánica,
1-2 % de materia orgánica,
3-4 % de agua.

b) Estructura: El esmalte se encuentra formado por:

- Prismas del esmalte.
- Vaina del prisma (alrededor de la cabeza de cada prisma)
- Cristales de hidroxiapatita.
- Matriz orgánica del esmalte.
- Estriaciones transversales y estriás de Retzius.
- Laminillas, penachos y husos del esmalte³.

2) Cemento.

Es un tejido mineralizado que recubre la raíz del diente; es tejido conectivo especializado que presenta varias similitudes estructurales con el hueso compacto, pero difieren en que el hueso es vascularizado y el cemento es avascular.

a) Distribución y Tipos de Cemento: Estudios morfológicos realizados con microscopía óptica, han revelado dos cla-

ses de cemento; acelular y celular. Generalmente el acelular se encuentra en la mitad coronaria de la raíz y el celular se encuentra en la mitad apical de la misma; sin embargo, en la mitad apical de la raíz se pueden observar capas alternantes de cemento celular y acelular.

b) Composición: 65% contenido mineral.

23% porción orgánica.

12% agua.

c) Estructura: Como todo tejido conectivo, se encuentra compuesto por células y sustancia intercelular, en las que se observan las siguientes características estructurales:

- Fibras de Sharpey.
- Fibras de la matriz.
- Líneas de crecimiento.
- Precemento.
- Cementoblastos.
- Las lagunas y canaliculos.
- Cementocitos.

3) *Dentina.*

Tejido conectivo avascular y mineralizado que está -- vestido por el esmalte en su porción coronal y por el cemento a nivel de la raíz del diente.

a) Composición: 70% materia inorgánica.

18% materia orgánica.

12% agua.

- Porción inorgánica.- Formada principalmente por cristales de hidroxiapatita, también posee fosfatos cálcicos amorfos, otras sales minerales tales como carbonatos, sulfatos, - así como trazas de ciertos elementos como F, Cu, Zn, Fe y -- otros.

- Porción orgánica.- Consta principalmente de colágena - que representa el 17% de la masa tisular total, es decir, alrededor del 95% del conjunto de materia orgánica. Posee también fracciones de lípidos, glicosaminoglicanos y compuestos - proteicos no identificados; cada uno de ellos constituyendo - alrededor del .2%. Además, el ácido cítrico comprende algo - menos del 1%.

b) Estructura:

- Odontoblastos y prolongaciones del odontoblasto.

Las fibras de Tomes son prolongaciones del citoplasma de los odontoblastos o dentinoblastos, que son - las células productoras de una matriz extracelular (ej. colágena), que al calcificarse constituyen la dentina⁴.

- Canaliculos o tubérculos de la dentina.

- Espacio periodontoblástico.

- Dentina pericanalicular e intercanalicular.

c) Distribución de la materia orgánica: Las fibras colágenas, elementos constituyentes de la mayor parte de la materia orgánica, se encuentran principalmente en la dentina in--

tercanalicular. En la dentina pericanalicular, así como en el espacio periodontoblástico, sólo existen pequeñas proporciones de materia orgánica, habiéndose podido demostrar fibras colágenas típicas en estas localizaciones.

En la dentina de revestimiento, las fibras se orientan perpendicularmente al límite amelo-dentinario, mientras que en la dentina peripulpar las fibras adoptan una posición paralela al mencionado límite amelo-dentinario, o a la superficie de la pulpa; sin embargo, la dirección de las fibras es diversa según los planos, es decir, las fibras exhiben una posición regular en un plano mientras están orientadas irregularmente en otros planos.

4) Pulpa Dentaria.

Se sitúa en la posición central del diente; se encuentra rodeada por la dentina en toda su extensión, excepto a nivel del conducto apical que es por donde se comunica con el tejido periodontal.

a) Composición: 75% de agua.

25% de materia orgánica.

Durante el envejecimiento, la pulpa dentaria se hace menos celular y más rica en fibras. Está formada por tejido conectivo laxo, similar al tejido conectivo de cualquier parte del organismo.

b) Estructura básica:

- Células de tejido conectivo, predominando fibro--

blastos, células mesenquimatosas indiferenciadas, histiocitos o macrófagos. En ocasiones pueden observarse linfocitos, células plasmáticas y granulocitos eosinófilos. En pulpas inflamadas pueden observarse células cebadas, no apreciándose células adiposas.

- Fibras principalmente colágenas; hay además fibras elásticas, reticulares y fibras colágenas finas.

Además posee vascularización dada por arteriolas y vénulas. El flujo sanguíneo está bajo control nervioso.

ETIOLOGIA DE LA CARIES.

Se han elaborado dos teorías principales, la acidógena (teoría quimioparasitaria de Miller⁵) y proteolítica. Mas recientemente se propuso una tercera teoría, la de proteólisis y quelación¹.

1) Teoría Acidógena.

W.D. Miller, probablemente el más conocido de los primeros investigadores de la caries dental, publicó ampliamente los resultados sobre sus estudios a partir de 1882, los cuales culminaron en la hipótesis que afirmaba que "la caries dental es un proceso quimioparasitario que consta de dos etapas: Descalcificación del esmalte, cuyo resultado es la destrucción total, y descalcificación de la dentina, seguida de la disolución del residuo reblandecido. El ácido que causa esta descalcificación primaria es el ácido láctico que provie

ne de la fermentación de azúcares y almidones alojados en las zonas retentivas de los dientes".

Miller⁶ aisló una cantidad de microorganismos de la cavidad bucal, muchos de los cuales eran acidógenos y algunos proteolíticos; como una cantidad de estas formas bacterianas tenía capacidad de formar ácido láctico, Miller creyó que la caries no era causada por un solo tipo de microorganismo, sino por una gran variedad de ellos. Esta teoría ha sido aceptada por la mayoría de los investigadores.

2) Teoría Proteolítica.

Aunque las pruebas de la teoría de la caries denominada acidógena son considerables, todavía no se acepta como concluyente, ya que es de naturaleza muy circunstancial. Como explicación alternativa está la teoría proteolítica. Se han acumulado pruebas de que la porción orgánica del diente puede desempeñar un papel importante en el proceso de caries. Gottlieb⁷⁻⁹ y Gottlieb, Diamond y Applebaum¹⁰, postularon que la caries es un proceso esencialmente proteolítico: los microorganismos invaden los pasajes orgánicos y los destruyen en su avance. Admitieron que la proteólisis iba acompañada de formación de ácido, en cantidades menores cuando se trataba de laminillas y en cantidades mayores en las vainas de los prismas. Gottlieb sostenía que la pigmentación amarilla era característica de caries y que se debía a la producción de pigmentos por microorganismos proteolíticos.

Manley y Hardwick¹¹ intentaron reconciliar las dos principales teorías sobre la etiología de la caries dental y señalaron que mientras los mecanismos acidógenos y proteolíticos pueden ser separados y diferentes, no lo son necesariamente. Así, algunas bacterias capaces de producir ácidos de los carbohidratos, llegan a degradar las proteínas en ausencia de éstos. Sobre esta base se propuso que pueden haber dos clases de lesiones cariosas: 1) los microorganismos invaden las laminillas del esmalte y atacan el esmalte y la dentina antes de que existan manifestaciones apreciables; 2) no hay laminillas del esmalte; esta alteración se hace mediante la descalcificación del esmalte por ácidos generados por las bacterias de la placa microbiana que cubre el esmalte.

3) Teoría de la Proteólisis y Quelación.

La quelación es un proceso de incorporación de un ion metálico a una sustancia compleja, mediante la unión covalente coordinada, que da por resultado un compuesto muy estable.

Según Schatz¹², el ataque bacteriano del esmalte iniciado por microorganismos queratinolíticos, consiste en la destrucción de proteínas y otros componentes orgánicos del esmalte, fundamentalmente la queratina. Esto da por resultado la formación de sustancias capaces de formar quelatos solubles con el componente mineralizado del diente y por esa vía descalcificar el esmalte en presencia de un pH neutro o hasta alcalino. El esmalte también contiene otros componentes orgánicos.

cos además de la queratina, como glucosaminoglicanos, lípidos y citratos que pueden ser susceptibles al ataque bacteriano y actúan como quelantes.

La teoría de la proteólisis y quelación afirma que tanto la porción orgánica como la inorgánica del esmalte, pueden -- ser atacadas simultáneamente. Si se acepta esta teoría deben hacerse varias conciliaciones:

- Observación del aumento de frecuencia de caries al aumentar el consumo de azúcar.
- Observación del aumento de la cantidad de lactobacilos cuando la actividad de caries es elevada, y
- Observación de la disminución de frecuencia de caries después de la administración tópica de flúor, o su consumo por vía general.

Todas las teorías actuales sobre la etiología de caries asumen la presencia de microorganismos en el proceso¹³.

Las más recientes investigaciones respecto a la caries y a la prevención de la misma, tienen su mirada fija en el - estreptococo mutans¹⁴, además el lactobacilo acidófilo ha - recibido especial atención debido a su presencia, con mucha frecuencia, en la dentina cariosa.

Bibby y Hine¹⁵ encontraron un gran número de cocos, bacilos, microorganismos fusiformes y filamentos gram negativos en las extensiones de la dentina cariosa, lo cual parece estar de acuerdo con los hallazgos de Burnett y Scherp¹⁶, --

quienes aislaron 250 cepas de microorganismos proteolíticos - de la dentina cariosa.

Estudios gnatobióticos han revelado que los principales agentes cariogénicos son los estreptococos mutans, salivarius y sanguis², además del lactobacilo acidófilo y actinomicetos¹⁴. Los lactobacilos, considerados anteriormente como los principales invasores, han sido relevados de dicha posición, ya que en realidad su potencial cariogénico es bastante reducido².

Orland¹⁷ observó que no se producía caries en los dientes de animales libres de gérmenes, aun cuando los animales fueran alimentados con dietas cariógenas. No obstante, se produjeron caries cuando en el medio del animal fueron introducidos estreptococos y bacilos gram negativos.

A pesar de todas las pruebas, no hay una indicación clara de un microorganismo causal. Hay datos indicativos de una asociación entre lactobacilos, tanto de la saliva como de la placa y caries dental, pero esto dista mucho de ser completo. También hay una asociación entre estreptococos en la placa y caries dental, pero esto no es aplicable a los estreptococos en la saliva¹⁸.

En varios estudios realizados con cepas de microorganismos tomados de diferentes placas dento-bacterianas, de diferentes niños, se encontró que los estreptococos eran los microorganismos aislados con mayor frecuencia de la placa, durante el período de actividad de caries¹⁴.

Estreptococo facultativo	27%
Difteroide facultativo	23%
Difteroide anaerobio	18%
Peptoestreptococo	13%
Veillonella	6%
Bacteroides	4%
Fusobacterias	4%
Neisseria	3%

Razones químicas y observaciones experimentales presentan apoyo a las afirmaciones aceptadas generalmente de que -- los agentes destructivos iniciadores de la caries son ácidos, los cuales disuelven inicialmente los componentes inorgánicos del esmalte. La disolución de la matriz orgánica del esmalte tiene lugar después del comienzo de la descalcificación y obedece a factores mecánicos o enzimáticos. Los ácidos que originan la caries son producidos por ciertos microorganismos bucales que metabolizan hidratos de carbono fermentables, para satisfacer sus necesidades de energía. Los productos finales de esta fermentación son ácidos, en especial láctico y en menor escala, acético, propiónico, pirúvico y quizá fumárico².

Se ha señalado que los microorganismos acidógenos producen la descalcificación de la dentina en el proceso de caries, pero que debe ser necesario otro mecanismo para la destrucción definitiva de la matriz orgánica remanente. La explicación más lógica es que la matriz es destruida por la acción -

de enzimas proteolíticas generadas por microorganismos en la profundidad de la cavidad. Esta digestión enzimática es de máxima actividad sólo cuando la matriz orgánica está descalcificada y tiene poco efecto sobre la dentina sana¹.

De los microorganismos de la pulpa fueron aisladas enzimas que afectan a los tejidos conjuntivos. Smith, Thomassen y Sweet¹⁹ demostraron que muchos microorganismos aislados de dientes no expuestos a los líquidos bucales producían esas enzimas. Sin embargo, no encontraron relación alguna entre las enzimas bacterianas, tales como colagenasa, hialuronidasa y otras, y las cualidades invasoras de las bacterias con respecto al tipo de lesión radiográfica observada.

La actividad colagenolítica está asociada a la variedad de microorganismos, con particular énfasis en aquellos microorganismos de la flora bucal. Todas las especies de bacteroides, incluyendo los B. Gingivales, B. Melaninogénicos, S.S. - melaninogénicos e intermedios, B. Capillus, B. Oris, B. The-taiotaomicon y B. Fragilis, producen colagenasa, la cual fue asociada primeramente con la fracción de la célula. La actividad de las enzimas parece estar aumentada cuando estos organismos crecen en un medio completamente peptídico. La producción de colagenasa por especies de bacteroides y A. Actinomy-cetecomitans fue única entre otros miembros de la flora bucal incluyendo especies de fusobacterias, actinomices, capnocytophaga y selenomonas, que no demostraron tener actividad colagenolítica bajo las mismas condiciones de cultivo²⁰.

COLÁGENA.

La colágena se encuentra ampliamente distribuida en el reino animal y su función depende del tejido en que se encuentre²¹. En los tejidos conectivos extracelulares la colágena es la proteína más abundante, que funciona como proteína estructural y sirve esencialmente como un soporte de los tejidos²². La colágena representa un tercio de la proteína total en los vertebrados y en algunos invertebrados, como esponjas o equinodermos, la colágena puede representar una parte aún mayor de las proteínas totales del organismo²³.

La unidad básica de la colágena tiene un peso molecular de 300 000 daltones, con una longitud de 280 nm y un diámetro de 1.5 nm²¹.

El hueso y la dentina contienen exclusivamente colágena del tipo I. Los resultados demuestran que dos tejidos mineralizados diferentes que poseen el mismo tipo genético de colágena, pero diferente organización macromolecular, pueden tener funciones diferentes²⁴.

El contenido de colágena de la dentina humana normal corresponde del 80 al 90% de la matriz orgánica, dependiendo de la especie²⁵ y ha sido calculado en 18% por peso seco²³. Como se dijo anteriormente, la colágena que se encuentra en el tejido dentario es principalmente la colágena de tipo I, la cual está formada por tres cadenas polipeptídicas llamadas $\alpha 1$ y $\alpha 2$, cuya fórmula estructural es $2(\alpha 1(I))\alpha 2$. Durante las

etapas tempranas de la dentinogénesis, se lleva a cabo la sin tesis de la colágena tipo III y en las últimas etapas se hace casi exclusivamente colágena tipo I. La mineralización de la colágena comienza en la superficie y avanza rápidamente al in terior de la fibra. Las fibras colágenas son ordenadas en haces con una periodicidad de 64.0-70 nm²⁵.

1) *Propiedades Físico-Químicas.*

Es una molécula excepcional. Es una triple hélice derecha formada por tres cadenas polipeptídicas de aproximadamente 1 000 residuos de aminoácidos, cada una denominada cade na α^1 .

La colágena es relativamente insoluble; sin embargo, se puede extraer un 5 a 10% de la proteína total con soluciones ácidas diluidas²⁶, con soluciones ligeramente alcalinas²⁷ y con soluciones salinas a pH neutro²⁸. Su rasgo más distintivo es su patrón de difracción de rayos X de un ángulo obtuso, obtenido de colágena en estado sólido, siendo esto aceptado como el criterio fundamental para definir la colágena. El dia grama de rayos X representa una configuración de polipéptido única que consta de tres cadenas helicoidales hacia la izquierda, dispuestas linealmente en una superhélice hacia el lado derecho.

Estudiada bajo microscopio electrónico, la colágena del tejido mesenquimatoso aparece formada por fibrillas que repre sentan un módulo repetido de estrías transversales llama-

do período de repetición de 64 nm (70 nm de forma hidratada).

Químicamente, la colágena posee algunos rasgos notables. Un tercio de los residuos de aminoácidos son de glicina, mientras los aminoácidos prolina e hidroxiprolina constituyen alrededor de un 20 a un 25% del total²³. Estos residuos de prolina e hidroxiprolina juegan un papel importante en la estabilización de la estructura y algunas de las propiedades físico-químicas de las proteínas están asociadas a la presencia de estos dos aminoácidos²⁹.

COLAGENASA.

Las colagenasas pertenecen a dos grandes grupos. El primer grupo comprende las colagenasas elaboradas por microorganismos que no contienen colágena, y el segundo grupo, o sea, el de las colagenasas tisulares, son producidas por células de organismos superiores que contienen colágena como componente principal de su matriz extracelular. Se ha definido a la colagenasa como una enzima capaz de provocar desdoblamiento hidrolítico de los enlaces peptídicos en las regiones helicoidales características de la colágena no desnaturalizada, a pH y temperatura fisiológicos.

Por lo general, las colagenasas de tipo bacteriano como la producida por bacterias anaeróbicas del género clostridia, hidrolizan enlaces prolina glicina-prolina-x dentro de la re-

gión helicoidal. Las colagenasas de célula de mamífero rompen selectivamente uno o dos enlaces localizados a una distancia de aproximadamente 210 nm del amino terminal. El amino que queda libre después de la hidrólisis enzimática puede ser una leucina o una iso-leucina³⁰.

OBJETIVO DEL TRABAJO.

Tanto la pulpa como la dentina están constituidas principalmente por colágena. Por consiguiente, la formación de caries implica la desmineralización de la dentina y la destrucción del tejido conjuntivo de la misma y de la pulpa. Por lo tanto, es importante analizar la presencia de enzimas específicas que degraden la colágena del diente (colagenasa) y establecer si son producidas por algunas bacterias (Bacteroides, Actinobacillus Antinomycetemcomitans¹⁵), por las células que participan en el proceso inflamatorio (polimorfonucleares y macrófagos) o por los elementos celulares propios del diente (odontoblastos).

Por lo tanto, nuestro principal objetivo, es determinar la actividad colagenolítica en el material obtenido de caries de segundo a cuarto grado, y establecer si la colagenasa es producida por las bacterias o por las células del mismo diente.

MATERIALES Y METODOS

REACTIVOS UTILIZADOS.

Los siguientes reactivos se obtuvieron de la casa Merck-México, S.A. de C.V.:

- Acido acético.
- Acido clorhídrico fumante (37%).
- Benceno.
- Etanol absoluto.
- Formaldehído en solución (35%).
- Hidróxido de sodio.
- Metanol.

De la casa J. T. Baker, S.A. de C.V. (Xalostoc, México), fueron comprados los siguientes reactivos:

- Acido pícrico.
- Acido acético.
- Cloruro de calcio.
- Cloruro de sodio.
- Etanol.
- Fosfato dibásico de sodio.
- Fosfato monobásico de potasio.
- Fosfato monobásico de sodio.
- Glicerol.
- Rojo de fenol.

Los siguientes reactivos fueron obtenidos de importación de las siguientes casas comerciales:

Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo., U.S.A.)

- Acido desoxicólico (desoxicolato de sodio)
- Colagenasa bacteriana
- Desoxirribonucleasa
- Dodecil sulfato de sodio (SDS)
- Etilen diamino tetracetato disódico (EDTA)
- Glicina
- N-etilmaleimida (NEM)
- Pepsina
- Tripsina
- Trizma (base)

Bio-Rad Laboratories (Richmond, Ca., U.S.A.)

- Acrilamida y Bis-acrilamida
- Azul brillante de Coomassie
- Glicina
- Persulfato de amonio

New England Nuclear.

- Anhídrido acético {1-¹⁴C}
- Aquasol

Aldrich Chemical Company Inc.

- Salicilato (Acido salicílico)

OBTENCION Y PREPARACION DE MUESTRAS.

Las muestras se tomaron al azar, de pacientes que fueron atendidos en las clínicas de Acatlán e Iztacala.

A cada tubo con tapón de rosca que se utilizó para recibir la muestra (5 ml de capacidad), se le colocó 1 ml de agua destilada. Los tubos y las cucharillas para tomar las muestras se esterilizaron en el autoclave durante 20 min a 120°C y a 20 libras de presión.

La obtención de las muestras se llevó a cabo con las cucharillas filosas, para lo cual se utilizaron dos tipos de aislado del diente por estudiar, el relativo y el absoluto; para el aislado relativo se utilizaron rollos de algodón y para el aislado absoluto se utilizó dique de hule; en ambos casos, después de haber efectuado el aislado, se secó el diente y con la cucharilla filosa se obtuvo la muestra de dentina re blandecida, la cual se colocó en su tubo correspondiente. Con forme se llevó a cabo la obtención de las muestras, se fueron tomando los datos correspondientes de cada una de ellas y que eran necesarios para poder efectuar el estudio sobre actividad colagenolítica en los diferentes pacientes. Los datos que se tomaron en cuenta para este estudio son: sexo, edad, grado de caries, número de diente y tipo de aislado.

Posteriormente las muestras fueron trasladadas al laboratorio, donde se liofilizaron.

DISTRIBUCIÓN DE LAS MUESTRAS.

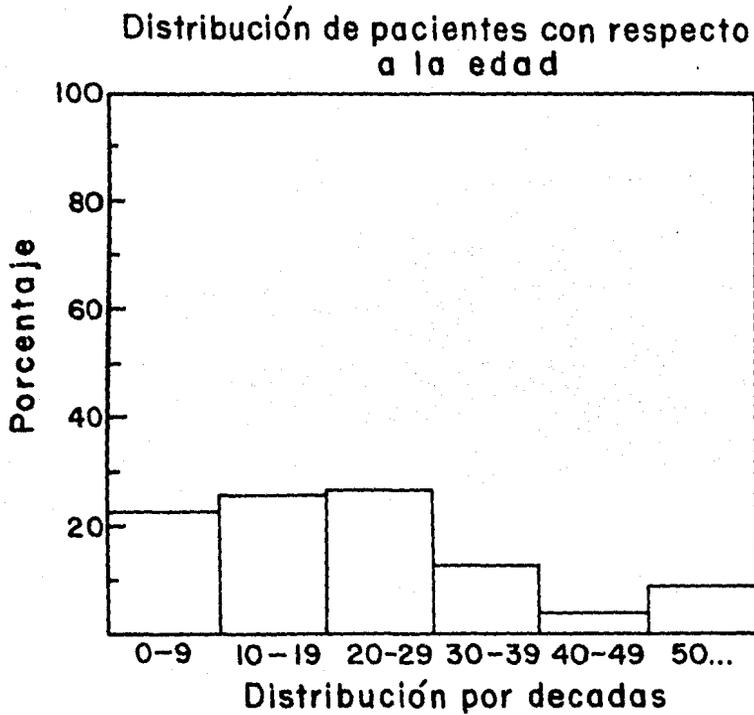
Se obtuvieron 102 muestras de pacientes de ambos sexos, 56 de sexo masculino y 46 de sexo femenino. Cerca del 22.54% del total eran sujetos de menos de 10 años, aproximadamente - 64.7% entre 20 y 40 años y el resto eran mayores de 40 años - (ver Gráfica 1). De las muestras tomadas, 51.96% fueron de - caries de segundo grado, 22.54% de tercer grado y 25.49% de - cuarto grado. La distribución de caries en las diferentes -- piezas dentales se presenta en la Tabla I.

Aproximadamente la mitad de las muestras provinieron de la arcada superior y la otra mitad de la arcada inferior.

El 78.43% de las muestras fueron tomadas con aislado re- lativo y el 21.56% con aislado absoluto.

TABLA I

Número de Diente	Número de Pacientes
13 - 23	14
14 - 15	4
16 - 18	11
24 - 25	1
26 - 28	8
33 - 43	2
34 - 35	5
36 - 38	14
44 - 45	4
46 - 48	10
53 - 63	1
54 - 55	7
64 - 65	7
73 - 83	0
74 - 75	6
84 - 85	8



Gráfica 1

PREPARACIÓN DE COLÁGENA.

1) Colágena de Riñón de Res³¹.

a) Métodos para obtener fibras de colágena: El tejido fresco del rastro se limpió, se cortó en fragmentos y se guardó congelado a -20°C hasta ser utilizado.

Todo el procedimiento se llevó a cabo a 4°C ; la muestra se descongeló, se pesaron porciones equivalentes a 10-15 grms, se licuaron durante 15 seg a alta velocidad en una licuadora "Warring"; para evitar el calentamiento de la muestra y la --desnaturalización de la colágena, se agregaron fragmentos de hielo molido durante la preparación del licuado.

El licuado se filtró en una malla de nylon; el filtrado se desechó y a la porción retenida se le agregaron 10 ml de - agua bidestilada por cada gramo de tejido, lo cual se agitó - durante una hora dentro del cuarto frío. Se filtró nuevamente en una malla de nylon; el filtrado se desechó y la porción retenida se lavó 1 hr con una solución de NaCl 1 M + 2 mg de desoxirribonucleasa por cada 500 mg de porción retenida. Se - filtró nuevamente, y la porción retenida se lavó durante 1 hr con 100 a 200 ml de desoxicolato de sodio al 1%. Se filtró - nuevamente, y la porción retenida se lavó durante 20 min con 10 ml de agua bidestilada por cada gramo de tejido. Se fil--tró y se repitió el lavado anterior, se filtró nuevamente y - las fibras se secaron en un papel filtro.

Una vez secas las fibras fueron pesadas y se calculó el porcentaje de rendimiento.

b) Solubilización de la colágena: Para favorecer la extracción de la colágena y eliminar algunas proteínas no colagénicas, la biomatriz obtenida se picó finamente con tijeras y se pesaron las fibras. Posteriormente, por cada gramo de fibras se agregaron 75 ml de ácido acético 0.25 M y se agitó durante 24 hrs a 4°C. Se centrifugó en una centrifuga modelo Beckman durante 1 hr a 16 000 rpm a 4°C.

c) Pepsinización: En un volumen de ácido acético 0.25 M igual al usado para obtener extracto ácido, se resuspendió el precipitado residual de dicho extracto. La cantidad necesaria de pepsina (0.25 mg/ml) se disolvió en 2 a 3 ml de HCl 0.01 M, y se agregó a las fibras que contenían ácido acético 0.25 M. Se agitó suavemente durante 24 hrs a 4°C y posteriormente, se centrifugó en una centrifuga modelo Beckman durante 1 hr, a 16 000 rpm a 4°C. Las colágenas disueltas quedaron en el sobrenadante y éste se utilizó para obtener los distintos tipos genéticos.

d) Fraccionamiento de los tipos de colágena³²: Al sobrenadante se le agregó NaCl 0.7 M y se agitó toda la noche, se centrifugó con las mismas condiciones descritas. El sobrenadante se llevó a pH 7.4 y el precipitado (colágena I y III) se disolvió en tris 0.05 M y se dializó contra tris 0.05 M -- NaCl 1.7 M. Se centrifugó y el sobrenadante (colágena I) se dializó contra ácido acético 0.25 M y el precipitado se disol

vió en ácido acético 0.25 M y se dializó contra ácido acético 0.25 M. La colágena se almacenó en ácido acético 0.25 M a -- 4°C.

2) *Colágena de Tendón de Cola de Rata*²⁶.

Se extrajo el tendón de cinco colas de rata y se colocaron desmenuzados en 500 ml de ácido acético 0.5 M; se agitaron durante 24 hrs a 4°C y posteriormente se centrifugó en -- una centrifuga modelo Beckman durante 1 hr, a 16 000 rpm a -- 4°C. El sobrenadante fue la colágena tipo I, la cual fue almacenada a 4°C y el precipitado se disolvió en 500 ml de ácido acético 0.5 M y se repitió el mismo procedimiento de agitación y centrifugación, con lo que se obtuvo sobrenadante que correspondió a la colágena tipo I y el precipitado se eliminó.

Para determinar la pureza de las colágenas obtenidas, se procedió a correr cada muestra en geles de SDS-acrilamida al 5%³³.

PROCEDIMIENTO PARA MEDIR LA CANTIDAD DE COLAGENASA PRESENTE.

La colágena se dializó contra buffer de fosfatos 0.15 M, pH 7.4 durante 24 hrs, para obtener un pH adecuado (7.4) para su gelificación. Se colocaron 50 µl de colágena en cada pocito de la caja de cultivos múltiple* y se colocó 1 hr a 37°C -

* Linbro, Div. of Flow Lab, 96 flat bottom wells, diam 0,6 cm
Cat. No. 76-001-05.

para que se gelificara la colágena³⁴. Transcurrido este tiempo, se colocaron 200 μ l de agua, dentro de cada uno de los pocitos, para lavar durante 45 min a 37°C. Se eliminó el agua.

Cada una de las muestras obtenidas de los pacientes, después de ser liofilizadas, se disolvió en 100 ó 200 μ l de tris 0.05 M, dependiendo de la cantidad de muestra obtenida. Se colocó una muestra en cada pocito, teniendo la precaución de colocar siempre una cantidad uniforme de 100 μ l para cada pocito; se colocaron los controles que fueron de tris 0.05 M, - un control con tripsina-EDTA (2 mg tripsina + 7.44 mg EDTA + 2 ml tris 0.05 M), un control con colagenasa bacteriana (1 -- mg/ml de agua) y un control con agua; la cantidad de líquido utilizada en cada control fue también de 100 μ l. Una vez colocados los controles y las muestras dentro de los pocitos, - se dejó que éstos actuaran sobre la colágena durante 24 hrs a 37°C.

Transcurrido este tiempo se aspiró el líquido con mucho cuidado; los pocitos se lavaron con 200 μ l de agua durante algunos minutos; se eliminó el agua y se colocaron 200 μ l de -- formaldehído 10% en PBS en cada uno de los pocitos durante -- 1 hr a 37°C. Se eliminó el formaldehído y se lavó varias veces con 200 μ l de agua durante algunos minutos. Posteriormente se despegó el gel de colágena de cada uno de los pocitos - y a cada uno de ellos se le colocaron 200 μ l de rojo sirio (1 mg/ml solución de ácido pícrico saturado³⁵) durante 3 hrs a 37°C.

Se lavaron los geles con HCl 0.01 M para eliminar el exceso de ácido pícrico.

En tubos de ensayo pequeños se colocó 1 ml de sosa metanol (1:1) y dentro de cada uno de éstos, un gel de colágena. Se dejaron 48 hrs en la plancha agitadora para desteñir los geles, ya que el rojo sirio es un colorante que se adhiere a las colágenas tipo I, II y III y la cantidad de colorante adherido es proporcional a la cantidad de colágena presente³⁶. Se leyeron las absorbancias a 530 nm usando un espectrofotómetro modelo Beckman, ya que la cantidad de colágena puede ser estimada utilizando un coeficiente de extensión molecular de $2.0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$.

IDENTIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN.

1) *Marcado de Colágena con C¹⁴.*

Para verificar la presencia de la colagenasa e identificar los productos de la degradación, se utilizó colágena -- marcada con C¹⁴, cuya acetilación se llevó a cabo siguiendo el método de Johnson Wint³⁴. Se purificó colágena de tendón de cola de rata (2 mg/ml, 125 ml) en ácido acético 0.01% y se llevó a pH 8.4 por la adición de K₂HPO₄ 1 M. El agente acetilante, anhídrido acético (1-¹⁴C) se agregó gota a gota a 1.5 ml de benceno a la solución de colágena por un período de 30 min a 10°C y la mezcla obtenida se agitó durante 1 hr. Para remover el benceno y el ácido acético ¹⁴C, la colágena se pre

cipitó a 4°C por adición lenta de una solución de NaCl al 30%, para tener una concentración final de NaCl al 15%. La colágena precipitada, mantenida a 4°C se sedimentó (27 000 g/20 min), se resuspendió (~ 2 mg/ml) en 120 ml de ácido acético 0.5 M - hasta que no se detecto más C¹⁴ en el dializado. La solución de colágena acetilada C¹⁴ se centrifugó a 78 000 g/hr para remover la colágena no disuelta y se almacenó a 4°C.

2) *Toma de Muestras para Determinar los Productos de la Degradación.*

Una vez identificados los pacientes con mayor actividad colagenolítica, con el objeto de determinar los productos de la degradación, se tomaron 20 muestras de diferentes pacientes con características específicas, siendo el método descrito anteriormente.

Las muestras se juntaron y se trasladaron al laboratorio donde fueron liofilizadas.

3) *Incubación de las Muestras Obtenidas con Colágena Marcada con C¹⁴.*

La colágena de tendón de cola de rata acetilada C¹⁴, se dializó contra buffer de fosfatos 0.15 M pH 7.4 durante 12 hrs. Se colocaron 30 µl de colágena acetilada C¹⁴ en cada pocito de la caja de cultivo múltiple, la cual se mantuvo en un ángulo de 45° durante 1 hr, a 37°C, para que la solución de colágena C¹⁴ se adhiriera a la parte baja de cada pocito y de

jar cubierta sólo la mitad de la superficie. Una vez que la colágena C¹⁴ gelificó, se colocaron 200 µl de agua en cada pocito para lavar durante 45 min a 37°C. Se eliminó el agua y se colocaron las muestras y los controles.

Las 20 muestras juntas, ya liofizadas, se disolvieron en 1 ml de tris-HCl 0.05 M CaCl₂ 0.005 M. La muestra se distribuyó de la siguiente manera:

Se colocaron tres pozos, por duplicado, que contenían: - el primero, 50 µl de muestra + 150 µl de tris-HCl 0.05 M CaCl₂ 0.005 M; el segundo contenía 100 µl de muestra + 100 µl de -- tris-HCl 0.05 M CaCl₂ 0.005 M, y el tercero contenía 200 µl - de muestra. Además se colocaron cuatro controles: un control con 200 µl de colagenasa bacteriana (1 mg/ml), un control con 200 µl de tripsina-EDTA (2 mg tripsina + 7.44 mg EDTA + 2 ml tris 0.05 M), un control con 200 µl de tris-HCl 0.05 M CaCl₂ 0.005 M y un control con 200 µl de agua.

Además, se colocó en un pocito 100 µl de muestra + 100 µl de EDTA (7.44 mg/2 ml tris HCl 0.05 M) y en otro pocito se colocó 100 µl de muestra + 100 µl de NEM 0.01 M.

Una vez colocadas las muestras y los controles, se dejó que éstos actuaran sobre la colágena acetilada con C¹⁴, durante 24 hrs, a 37°C. Se tomaron alícuotas de 50 µl de cada pocito y se transfirieron a viales para medir radioactividad. A cada muestra se le agregó 10 ml de aquasol, se agitaron, se guardaron en el cuarto oscuro a 4°C, durante 30 min, y se de

terminó su radioactividad en un contador de centelleo líquido modelo Packard Tri-Carb, tomando cuentas de 1 min para cada muestra.

DETERMINACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN.

Para determinar los productos de la degradación se procedió a correr geles de SDS-acrilamida al 10%³³ de las colágenas obtenidas, después de incubar como se describió anteriormente. Se corrieron cuatro geles durante 5 hrs a 30 mA. Dos geles se utilizaron para teñir las muestras con azul de Coomassie y los otros dos para determinar la localización de las bandas por fluorografía; para esto, los geles fueron sumergidos en salicilato de sodio 1 M durante 30 min. Se secó, y ya seco se colocó sobre una película Kodak (X-O mat K) a -80°C, en la obscuridad durante dos semanas³⁷.

RESULTADOS

Después de haber medido la actividad colagenolítica de cada una de las muestras de caries de los diferentes pacientes y de los controles, se obtuvieron los siguientes resultados.

Para determinar la actividad colagenolítica se prepararon varios controles: el control de colagenasa bacteriana para asegurar que el sustrato utilizado era degradado por la enzima bacteriana. El segundo control, con tripsina, para determinar que las enzimas proteolíticas no específicas eran incapaces de romper la hélice de colágena, y por lo tanto, esto era una indicación de que la proteína se encontraba en su estado nativo; sin embargo, como la tripsina comercial puede venir contaminada con colagenasa, ya que se extrae del páncreas y en este órgano existe una colagenasa muy activa, se llevó a cabo otro control con EDTA, compuesto que es un potente inhibidor de la colagenasa porque quela el Ca^{++} .

Por último, se utilizaron dos controles, uno con agua y otro con tris 0.05 M para verificar que la proteína no se disolvía, ya que se encontraba en su estado nativo.

Para comprobar que las colágenas utilizadas como sustrato eran puras, se corrieron geles de SDS-acrilamida al 5%. Como se observa en la figura 1, las dos bandas de mayor movilidad (flechas) corresponden a las cadenas $\alpha 1$ y $\alpha 2$, respectiva-



FIGURA 1. Gel de SDS-acrylamida al 75% que contiene la colágena de tipo I purificada que se utilizó como sustrato para medir la actividad colagenolítica. El gel se corrió con un amperaje constante de 3 mA y se tiñó con coomassie azul.

mente, de la colágena tipo I. Con menor movilidad se encuentran las cadenas β y γ , las cuales están unidas por enlaces covalentes. En las colágenas solubilizadas por pepsina, el número de enlaces está muy reducido, ya que estos se encuentran fuera de la zona helicoidal de la proteína y son hidrolizados por la enzima. Como se observa también en los geles, la colágena tipo I utilizada como substrato está bastante pura.

De las muestras obtenidas, el 25.49% tuvo actividad colagenolítica; de éstas, hubo un ligero predominio en las muestras obtenidas de sujetos del sexo masculino (61.5%), sobre el sexo femenino (38.4%). Sin embargo, este dato debe tomarse con reservas, debido a que hubo un ligero predominio del sexo masculino entre la población estudiada y esto podría tener influencia sobre los porcentajes encontrados.

En vista de la organización del diente y que diferentes grados de caries afectan a diversas estructuras, se analizó la actividad colagenolítica obtenida de los diferentes grados de caries. La actividad colagenolítica fue mayor en las caries de segundo grado y fue disminuyendo progresivamente hasta la caries de cuarto grado, como se observa en la tabla II.

Con respecto a la edad (décadas), se encontró actividad colagenolítica desde la infancia hasta los 40 años de edad, observándose un incremento de dicha actividad entre los 20 y 29 años de edad, y encontrándose casi nula la actividad cola-

genolítica de los 40 años en adelante, como se muestra en la tabla III.

TABLA II. Actividad Colagenolítica Según el Grado de Caries.

Grado de Caries	Número de Muestras	Número de Muestras con A. C.	%
2o.	53	16	30.18
3o.	23	6	26.08
4o.	26	4	15.38

TABLA III. Actividad Colagenolítica en Caries Dental. Distribución por Décadas.

Edad Años	Número de Muestras	Número de Muestras con A. C.	%
0 - 9	23	6	26.08
10 - 19	26	6	23.07
20 - 29	27	10	37.03
30 - 39	13	3	23.07
40 - 49	4	0	-
50 - 59	9	1	11.11

Debido a la diferente anatomía que presentan los dientes, se analizó la actividad colagenolítica obtenida según el número de diente, tanto en niños como en adultos. En adultos la mayor actividad colagenolítica se encontró en los dientes anteriores inferiores (dientes 33-43, según la Federación Dental Internacional) como se muestra en la tabla IV; en los niños, dicha actividad colagenolítica fue mayor en los molares inferiores derechos como se muestra en la tabla V.

En lo referente a los maxilares, la actividad colagenolítica en los adultos fue la siguiente: de un total de 35 muestras obtenidas de la mandíbula, 10 tuvieron actividad colagenolítica, lo que equivale a un 28.57% y de 38 muestras obtenidas del maxilar, 10 tuvieron actividad colagenolítica, lo que equivale a un 26.31% del total de las muestras. Para el caso de los niños, de 15 muestras obtenidas del maxilar, sólo uno tuvo actividad colagenolítica (6.66%) y de las 14 muestras obtenidas de la mandíbula, cinco presentaron actividad colagenolítica, lo que equivale a un 35.71%.

Para descartar que la colagenasa proviniera de la saliva, se compararon los resultados obtenidos cuando se tomaron muestras con los dos tipos de aislado, el relativo y el absoluto, encontrándose mayor actividad colagenolítica en las muestras obtenidas de dientes con aislado absoluto; 8 de 22 muestras - tuvieron actividad, lo que equivale a un 36.36%. De las muestras tomadas con aislado relativo, 18 de 80 muestras tuvieron actividad colagenolítica, lo que equivale a un 22.5%.

TABLA IV. Actividad Colagenolítica en Caries de Adulto.

Diente	Número de Muestras	Número de Muestras con A.C.	%
13 - 23	14	3	21.42
14 - 15	4	1	25.00
16 - 18	11	5	45.45
24 - 25	1	0	-
26 - 28	8	1	12.50
33 - 43	2	1	50.00
34 - 35	5	2	40.00
36 - 38	14	3	21.42
44 - 45	4	1	25.00
46 - 48	10	3	30.00

TABLA V. Actividad Colagenolítica en Caries de Niños.

Diente	Número de Muestras	Número de Muestras con A.C.	%
53 - 63	1	0	-
54 - 55	7	0	-
64 - 65	7	1	14.28
73 - 83	0	0	-
74 - 75	6	2	33.33
84 - 85	8	3	37.50

IDENTIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS.

Para identificar los productos de degradación, se escogieron 20 muestras tomadas de pacientes del sexo masculino, - entre 20 y 30 años de edad, en dientes de la arcada inferior con caries de segundo grado, sin importar el tipo de aislado, que de acuerdo a los datos aquí descritos, fueron las que con mayor frecuencia mostraron actividad colagenolítica.

Después de incubar colágena radiactiva en el concentrado de las 20 muestras, el material se corrió en geles de acrilamida en 10% y las bandas se detectaron por fluorografía. Como se observa en la figura 2, las bandas de alto peso molecular - corresponden a las cadenas α , β y γ . Por debajo de las cadenas α se observan fragmentos de degradación, los cuales corresponden a los productos de degradación de las colagenasas de mamífero (TCA y TCB).

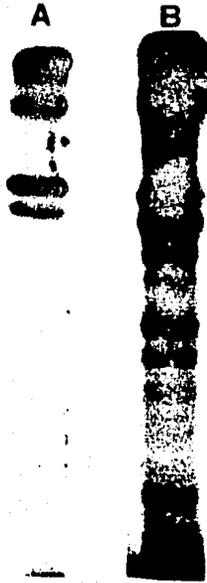


FIGURA 2. Fluorografía de un gel de acrilamida SDS al 10% que contiene la colágena radiactiva utilizada como sustrato, así como los productos de degradación obtenidos después de incubar la colágena con el concentrado de 20 muestras obtenidas de dientes con caries. El gel se corrió con una corriente constante de 3 mA. Se incubó con salicilato de sodio y las muestrss se revelaron - colocando una placa radiográfica Kodak (X-Omat K) e incubando - durante 15 días a -80 °C.

DISCUSION

Se utilizó el método de rojo sirio para medir la actividad -- colagenolítica en la mayor parte de las muestras, por ser un método muy sensible, fácil y barato. Se basa en la observación realizada en varios laboratorios³⁸, de que el rojo sirio en solución saturada de ácido pícrico, se une selectivamente a la colágena; la unión es cuantitativa y proporcional a la concentración y el colorante tiene un coeficiente elevado debido a sus cuatro grupos azoicos. El método ha sido ampliamente utilizado en el laboratorio y se ha observado que es un método adecuado para medir colagenasa. En nuestro material, la actividad de colagenasa se midió por la degradación de colágena, lo que iba acompañado de una disminución en la cantidad de colorante fijado. Se tomaron como valores positivos - aquéllos que mostraron disminuciones mayores de 10 a 15%, debido a que las enzimas proteolíticas no específicas que degradan las regiones no helicoidales pueden disminuir la fijación del colorante por pérdida de algunas moléculas que son solubilizadas.

En este estudio se demostró la presencia de actividad colagenolítica en el 25% de las cavidades de los dientes afectados con caries.

En lo referente al grado de caries, se encontró mayor ac

tividad colagenolítica en dientes que presentaban caries de segundo grado y la cantidad de dicha actividad colagenolítica fue disminuyendo progresivamente hasta la caries de cuarto grado, lo cual se atribuye a que las características estructurales de los tejidos del diente son diferentes, por lo que la caries en estas zonas está integrada por procesos patogénicos diferentes, e incluso, los microorganismos encontrados en dichas zonas son diferentes en cuanto a su morfología, ya sea que se trate del mismo microorganismos que cambie según las condiciones del medio ambiente propiciado por su propio metabolismo, o sean diferentes microorganismos los productos de estas reacciones²³.

Es importante mencionar que no se tomaron muestras de caries de primer grado, debido a su difícil obtención, ya que el esmalte se encuentra muy sólido y la cucharilla no puede recoger fácilmente el material.

En lo referente a la edad, se encontró actividad colagenolítica desde la infancia hasta los 40 años y fue casi nula a partir de esta edad. Esto es debido a que durante las primeras décadas de la vida, la caries es la principal enfermedad que afecta a la cavidad bucal, encontrándose poca o ninguna afectación de los tejidos parodontales y después de esta etapa se observa una disminución de la actividad cariogénica y un notable aumento de la enfermedad parodontal. Estos datos, en especial la ausencia de colagenasa en las caries de -

los adultos, cuando la actividad hormonal ha disminuido, aundo al predominio de caries de individuos del sexo masculino, podría indicar que la actividad hormonal puede modificar de - alguna manera la actividad colagenolítica. En el útero de la rata embarazada, la producción de colagenasa se incrementa en el post-parto inmediato, fenómeno que se acompaña de cambios en la concentración de hormonas³⁹.

Se encontró mayor actividad colagenolítica en la mandíbula que en el maxilar, tanto en niños como en adultos, lo cual es atribuido al continuo contacto de la saliva principalmente con los dientes inferiores. Estudios realizados demuestran - que la saliva contiene colagenasa⁴⁰, por lo que se cree que - este factor, junto con los mencionados anteriormente, produ--cen un incremento de la actividad colagenolítica en esta zona.

De los datos obtenidos en esta tesis, es evidente que en el 75% de las muestras tomadas de dientes con caries, no se - encontró actividad colagenolítica. Estos resultados pueden - explicarse de varias formas:

La primera sería que la degradación del diente por colagenasa no es la causa principal de la caries.

La segunda sería que, aunque la colagenasa desempeñara - un papel fundamental en el momento de tomar las muestras, la enzima no estuviera presente, o que la cantidad de muestra -- utilizada fuera relativamente pequeña y no contuviera sufi--ciente actividad colagenolítica. Es importante hacer notar -

el diferente reblandecimiento de las piezas afectadas; al raspar con la cucharilla se pudo haber extraído material necrótico carente de actividad colagenolítica.

La tercera sería la presencia de inhibidores de la colagenasa en el diente y en el medio bucal. Ha sido ampliamente demostrado que diferentes tejidos que tienen actividad colagenolítica también contienen inhibidores de la misma⁴¹. Aún más, la propia colágena de la dentina podría competir con la colágena del sustrato. Ha sido demostrado que la colagenasa extracelular en los diferentes tejidos investigados se encuentra pegada a las fibras colagénicas⁴², por lo que es necesario permitir que la colagenasa degrade primero la colágena -- del tejido utilizado para medir la actividad colagenolítica -- antes de que se degrade el sustrato.

En general, podemos sugerir que la colagenasa es la enzima responsable de la degradación de la colágena de la dentina y que podríamos dividir al proceso de la caries en varias etapas:

La primera correspondería a la desmineralización del esmalte, la cual se lleva a cabo por cambios en el pH de la saliva, y por la producción de ácido láctico de bacterias que forman la placa dento bacteriana.

La segunda correspondería a la producción de colagenasa, la cual podría provenir directamente de la saliva o de las células de la dentina.

Nuestros datos no descartan la contribución de las bacterias en la producción de colagenasa; sin embargo, por los fragmentos obtenidos durante la degradación, es probable que la mayor actividad colagenolítica provenga del individuo; esta posibilidad está apoyada por el estudio reciente en el que se encontró que la mayor actividad colagenolítica de la saliva proviene del individuo⁴⁰.

La tercera etapa sería la inflamación y destrucción de la pulpa; aunque los procesos de caries que afectan la pulpa no mostraron actividad colagenolítica, esta enzima pudiera estar presente y adherida a la colágena, ya que la pulpa es el tejido más rico en esta proteína. Sería interesante hacer experimentos con anticuerpos-anticolagenasa y estudiar la localización de esta enzima por técnica de inmunofluorescencia.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se estudiaron 102 muestras obtenidas de caries de segundo a cuarto grado. Las muestras se obtuvieron de 56 pacientes de sexo masculino y 46 pacientes de sexo femenino; 79 adultos y 23 niños. La colagenasa se midió por la técnica de rojo si rio; los resultados obtenidos mostraron lo siguiente:

1. Las muestras obtenidas de individuos de sexo masculi no mostraron mayor actividad colagenolítica que las muestras obtenidas de sujetos del sexo femenino.
2. Las muestras obtenidas de caries de segundo grado -- mostraron con mayor frecuencia actividad colagenolítica.
3. Un mayor número de muestras con actividad colagenoli tica provenía de sujetos entre 20 y 30 años de edad.
4. En niños, las muestras tomadas de la mandíbula mos-- traron con mayor frecuencia actividad colagenolítica que los de maxilar, mientras que en los adultos la - diferencia no fue significativa.
5. La actividad colagenolítica fue independiente del ti po de aislado utilizado indicando que la contamina-- ción por pequeñas cantidades de saliva no interfiere con la medición.

6. En los niños, las piezas dentales que con mayor frecuencia mostraron actividad colagenolítica fueron -- los molares inferiores derechos y en los adultos fueron los dientes anteriores inferiores. Sin embargo, esta sugerencia debería ser validada con un mayor número de casos estudiados.

Nuestros resultados sugieren que la colagenasa desempeña un papel importante en la degradación de la dentina; además, los resultados señalan a la colagenasa producida por el huesped y no a las bacterias como la responsable de la degradación.

Se sugiere que el desarrollo de substancias químicas capaces de inhibir a la colagenasa podrían ayudar en el control de las caries.

BIBLIOGRAFIA

1. Shafer, W.G., Hine, M.K., Levy, B.M.: Tratado de Patología Bucal. Edit. Interamericana, 3a. Edición, 1977, pp. - 369-435.
2. Katz, S., Mc Donald Jr., J.L., Stookey, G.K.: Odontología Preventiva en Acción. Edit. Mexicana Panamericana, Buenos Aires, 1975, pp. 59-77.
3. Mjör, I.A., Pindborg, J.J.: Histología del Diente Humano. Edit. Labor, S.A., Barcelona, 1974, pp. 39-115.
4. Esponda-Vila, R.: Anatomía Dental. Textos Universitarios, 1975.
5. Miller, W.D.: New Theories Concerning Decay of Teeth. -- Dent. Cosmos. 47: 1293, 1905.
6. Miller, W.D.: Microorganisms of the Human Mouth. S.S. -- White Publishing Co., Philadelphia, 1890.
7. Gottlieb, B.: Dental Caries. J. Dent. Res. 23: 141, 1944.
8. Gottlieb, B.: Histopathology of Enamel Caries. J. Dent. - Res. 23: 169, 1944.

9. Gottlieb, B.: New Concept of Caries Problem and Its Clinical Application. J. Am. Dent. Assoc. 31: 1482, 1489, - 1598. 1944.
10. Gottlieb, B., Diamond, M., Applebaum, E.: The Caries Problem. Am. J. Orthod. Oral Surg. 32: 365, 1946.
11. Manley, E.B., Hardwick, J.L.: Caries of Enamel I. The Significance of Enamel Lamellae. Br. Dent. J. 91: 36, -- 1951.
12. Schatz, A., Karlson, K.E., Martin, J.T.: Destruction of Tooth Organic Matter by Oral Keratinolytic Microorganisms. N.Y. State. Dent. J. 21: 438, 1955.
13. Seltzer, S., Bender, I.B.: La Pulpa Dental. Edit. Mundi. Buenos Aires. pp. 112-128.
14. Trejo-Guzmán, N.C.: Microorganismos en el Proceso de Caries. Tesis. Carrera de Cirujano Dentista. UNAM-ENEP IZ-TACALA, pp. 32-44, 1981.
15. Bibby, B.G., Hine, M.K.: Bacteriologic Study of Carious Cavities. J. Amer. Dent. Ass. 25: 1934-1937, 1938.
16. Burnett, G.W., Scherp, H.W.: Distribution of Proteolytic and Aciduric Bacteria in the Saliva and in the Carious Lesion. Oral Surg. Oral Med. Oral Path. 4: 469-497, 1951.

17. Orland, F.J., *et al.*: Experimental Caries in Germ Free - Rats Inoculates with Enterococci. J.A.D.A. 50: 529, 1959.
18. Gerlin, R. J., Goldman, H.M.: Patología Oral de Thoma. - Salvat Editores, S.A. Reimpresión. pp. 264-337, 1980.
19. Smith, L.S., Thomassen, P.R., Sweet, J.G.: Relationship Between Infection and Pathology in the Pulp Canal and -- Periapical Region. Oral Surg. 11: 1042, 1958.
20. Robertson, P.B., *et al.*: Collagenolytic Activity Associated with Bacteroides Species and Actinobacillus Actinomyy cetecomitans. J. Periodontal Res. 17: 275-283, 1982.
21. Hodge, A., Schmitt, F.O.: The Charge Profile of Tropocollagen Macromolecule and the Packing Arrangement in Na--tive Type Collagen Fibrils. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 46: 186, 1980.
22. Rojkind, M.: Molecular Structure of Fibrous Components - of the Connective Tissues. In: Molecular Pathology of -- Connective Tissues (R. Pérez-Tamayo and M. Rojkind, eds.) Marcel Dekker, Inc. New York. pp. 1-13, 1973.
23. Lazzari, E.P.: Bioquímica Dental. Edit. Interamericana. 2a. Edición. México. pp. 28, 169. 1978.
24. Kuboki, Y., Mechanic, G.L.: Comparative Molecular Distriu

- bution Cross-links in Bone and Dentin Collagen Structure Function Relationships. *Calcif. Tissue Int.* 34: 306-308, 1982.
25. Anghileri, L.J., Tuffet-Anghileri, A.M.: The Role of Calcium in Biological Systems. Vol. III, Chapter 5: Calcium Metabolism in Dentinogenesis, 1982.
 26. Gallop, P.M.: Particle Size and Shape in a Citrate Extract of Ichthyocol. *Arch. Biochem. Biophys.* 54: 485, -- 1955.
 27. Highberger, J.H., Gross, J., Schmitt, F.O.: The Interaction of Mucoprotein with Soluble Collagen, an Electron - Microscope Study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 37: 286, - 1951.
 28. Gross, J., Highberger, J.H., Schimtt, F.O.: Extraction - of Collagen from Connective Tissue by Neutral Salt Solutions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 41: 1, 1955.
 29. Rojkind, M., Zeichner, M.: Maturation of Collagen and -- Elastin. In: *Molecular Pathology of Connective Tissues -* (R. Pérez-Tamayo and M. Rojkind, eds.) Marcel Dekker, -- New York, pp. 135-174, 1973.
 30. Pérez-Tamayo, R.: Pathology of Collagen Degradation. *Am. J. Pathol.* 92: 509-566, 1978.

31. Armendáriz, J., Rojkind, M.: A Simple Quantitative Method for Collagen Typing in Tissue Samples: Its Application to Human Liver with Schistosomiasis. *Collagen Rel. Res.* 4: - 35-47, 1984.
32. Rojkind, M., Giambrone, M.A., Biempica, L.: Collagen -- Types in Normal and Cirrhotic Liver. *Gastroenterology*, - 76: 710-719, 1979.
33. Laemli, U.K.: Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage. *Nature, London*, - 227: 680-685, 1970.
34. Johnson, W.B.: A Quantitative Collagen Film Collagenase Assay for Large Number of Samples. *Anal. Biochem.* 104: - 175-181, 1980.
35. López de León, A., Rojkind, M.: Técnica de Rojo Sirio. - Comunicación personal.
36. Kuttan, R., Di Ferrante, N.: Sirius Red-Collagen Interaction: A Method for the Measurement of Collagen and Bacterial Collagenase Activity. *Biochem. Internat.* 1: 455-462, 1980.
37. Chamberlain, J.P.: Fluorographic Detection of Radioactivity in Polyacrylamide Gels with Water-Soluble Fluor, Sodium Salicylate. *Anal. Biochem.* 98: 132-135, 1979.

38. Junqueira, L.C.U., Bignolas, G., Brentani, R.R.: A Simple and Sensitive Method for the Quantitative Estimation of Collagen. *Anal. Biochem.* 94: 96-99, 1979.
39. Woessner, J.F.: Total, Latent and Active Collagenase During the Course of Postpartum Involution of the Rat Uterus. Effect of Estradiol. *Biochem. J.* 180: 95-102, 1979.
40. Iijma, K., Ando, K., Kishi, M., Nakashizuka, T., Hayakawa, T.: Collagenase Activity in Human Saliva. *J. Dental Res.* 62: 709-712, 1983.
41. Harper, E.: Collagenases. *Ann. Rev. Biochem.* 49: 1063, -1980.
42. Montfort, I., Pérez-Tamayo, R.: The Distribution of Collagenase in Normal Rat Tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 23: 910-920, 1975.