

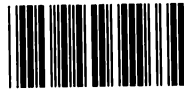
ESTUDIO DE RENOVACION CELULAR
EN EPITELIO GINGIVAL DE RATA
CEPA TIPO WISTAR

Por

C. D. SERGIO GONZALEZ COVARRUBIAS

**GONZALEZ
COVARRUBIAS
SERGIO
1984**

TESIS



K(1) UNAM



Facultad de Odontología
Div. de Est. de Posgrado e Investigación
Biblioteca "Barnet M. Levy"

TESIS

Presentada como requisito para obtener el Grado
de Maestría en Odontología

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

1984



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

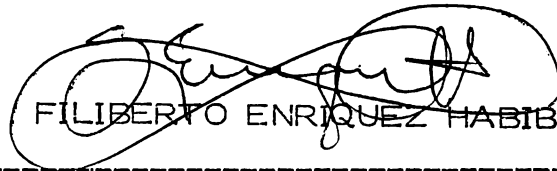
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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.

ESTUDIO DE RENOVACION CELULAR
EN EPITELIO GINGIVAL DE RATA
CEPA TIPO WISTAR

Aprobado por:


FILIBERTO ENRIQUEZ HABIB

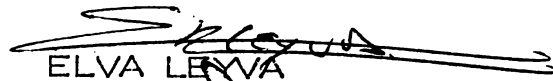
C.D.M.O.


ROGELIO HERRERA ECHAURI

C.D.M.O.


GUADALUPE MARIN GONZALEZ

C.D.M.O.


ELVA LEIVA

C.D.M.O.


JAVIER PORTILLA ROBERTSON

D.Sc.O. Director de la tesis

RECONOCIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México
y a la Facultad de Odontología.

Al Dr. Rogelio Rey Bosch
Jefe de la División de Estudios de Posgrado,
de la Facultad de Odontología.
Por los lazos de amistad que siempre nos -
han unido ; por su fé y confianza deposita-
da en mi.

Al Dr. Javier Portilla Robertson
Jefe del Departamento de Investigación de la
Facultad de Odontología.
Director de la tesis, por su valiosa colabo-
ración y atinados comentarios para la reali-
zación de esta tesis.

Al Dr. Filiberto Enriquez Habib
Coordinador de Estudios de Posgrado de la
Facultad de Odontología.
Por su gran ayuda recibida durante todo el
posgrado , que con sus sabios consejos y o-
portunos comentarios fué posible la realiza-
ción de esta tesis.

Al Dr. Julio González Gómez
Encargado del Bioterio de la Facultad de -
Odontología, por su gran ayuda durante el -
desarrollo de la tesis.

A la Dra Elva Leyva
Del Departamento de Histopatología de la
Facultad de Odontología, por su valiosa
colaboración para la realización de esta
tesis.

A la Dra Julia Urdiales
Compañera de Posgrado, que con su apo
yo, colaboración y su alto espíritu uni -
versitario en aras de la investigación, a
portó invaluable comentarios para la -
realización de esta tesis.

Al Psicologo Haroldo Elorza
Por su importante aportación en el área
estadística, para la realización de esta
tesis.

Al Dr Sergio Jara del Rio
Director de la Escuela Nacional de Es -
tudios Profesionales Iztacala y a sus ati
nados colaboradores, por las facilidades
y apoyo en varias direcciones académicas
; entre ellas la elaboración de esta tesis,
a mis compañeros del Honorable grupo -
de profesores de la Clínica Ecatepec y -
de la Especialidad en Endoperiodontología

Al Honorable Jurado.

A la memoria de mi padre
Rafael González Arriaga, por sus -
sabios consejos que me dio durante
toda su vida y por el recuerdo que
aún vive en mí.

A mi madre
Elvira Covarrubias vda. de Glez.,
por la paciencia que me ha tenido
durante toda la vida y por el a -
mor que me ha prodigado siempre.

A mi adorada esposa
Ma. del Pilar, por la fe y -
confianza que ha tenido en mi
y por el amor que nos une.

A mi querido hijo
Rafael, por ser lo mas bello que
me ha sucedido, dándole un buen-
ejemplo para la posteridad.

A mis hermanos:

Jorge, Rosalba, Ma. de los Angeles
y Omar Rafael, por las vivencias -
que hemos tenido juntos.

A mis sobrinas:

Linda, Pamela y Ariann, por
venir a formar parte de esta
gran familia.

A mis cuñados:

Sergio, Juan Carlos y Tatiana.

INDICE

	Página
INTRODUCCION -----	1
GENERALIDADES -----	3
OBJETIVOS -----	17
MATERIALES Y METODOS -----	18
RESULTADOS -----	21
ESTUDIO HISTOLOGICO -----	37
DISCUSION -----	44
CONCLUSIONES -----	49
RESUMEN -----	51
BIBLIOGRAFIA -----	54

INTRODUCCION

Los epitelios de los mamíferos se encuentran en constante recambio a través de la actividad mitótica en el estrato germinativo. Está bien establecido que en la cavidad oral bajo condiciones de homeostasis la proporción de renovación celular equivale a la exfoliación celular, manteniéndose un equilibrio constante por medio de sistemas, a éstos se les llama:

- Sistema de Renovación poblacional celular.
- Sistema de Expansión poblacional celular.
- Población estática celular.

En otros tejidos la actividad mitótica es notablemente más baja que en los epitelios y esta altamente condicionada a la actividad fisiológica local, mientras que en los epitelios la actividad mitótica se controla por medio de mecanismos reguladores fisiológicos hormonales (epinefrina, nor-epinefrina y chalonas) y mecanismos mecánicos (trauma, radiaciones).

Howard divide el ciclo renova-generacional celular en:

Fase "S" (Tiempo de síntesis de dna.)

Fase "G"₂ (Inicio de Mitosis)

Fase "M" (Tiempo de Mitosis)

Fase "G"₁ (Tiempo entre Mitosis y la siguiente fase "S")

1

Los métodos de medición de renovación celular son por medio de conteo mitótico (Dustin 1934) e identificación de dna. (Howard & Pele 1953). El análisis del ciclo mitótico se lleva a cabo en la fase "S" y la duración se calcula en base a las mitosis identificadas.

Aunque un gran número de autores han estudiado la renovación celular del epitelio oral, no se hace una correlación entre los factores tales como la localización, tiempo, dieta y cepillado.

Es importante conocer el comportamiento de la proliferación celular en la cavidad oral en modelos experimentales para aplicaciones clínicas en humanos como son las mediciones de tiempo prequirúrgico, quirúrgico y procesos de cicatrización.

GENERALIDADES

En los mamíferos, el epitelio que se encuentra cubriendo las superficies internas y externas sufren cierto grado de desgaste, lo cual hace que constantemente pierdan células. Para sustituirlas, hay una buena proporción de actividad mitótica en los estratos celulares germinativos. Esto también se realiza en el epitelio de la cavidad oral incluyendo el epitelio gingival. (20,21).

Leblond y Walker (1956), dicen que bajo condiciones normales es característico que la velocidad de renovación de las células epiteliales es igual a la velocidad de exfoliación, por lo cual el número total de células permanece constante. Tales sistemas celulares han sido conocidos como " Poblaciones Celulares de Renovación ". (6,19,20,21).

La mitosis es un proceso en el cual los núcleos se dividen, incluyendo cuatro fases consecutivas, profase, metafase, anafase y telofase. Se acordó dar el nombre de interfase a la fase de la célula durante la cual no ocurre la mitosis. Cuando la mitosis comienza, el proceso suele ser continuo; cada etapa pasa insensiblemente a la siguiente.

Profase: Se caracteriza por la helicoidación gradual de la cromatina, que termina formando una serie de bastoncillos que se tiñen intensamente en la última etapa de ésta, y en las dos siguientes de la mitosis. En las primeras etapas de la profase, la membrana nuclear permanece íntegra y los cromosomas se disponen dentro del núcleo como si fuera un ovillo de hilo grueso. En la última etapa de ésta, la membrana nuclear

se disuelve, de manera que no queda barrera formal entre los cromosomas y el citoplasma de la célula; entre tanto, el nucleolo parece disolverse y desaparecer, y ya no puede observarse como cuerpo redondo aislado. Los centriolos se separan emigrando un par para cada polo de la célula. Cuando alcanzan los polos, ellos y su medio inmediato constituyen las centrósferas. Comienza a aparecer un agregado de microtúbulos uniendo los dos pares de centriolos que forman el huso mitótico.

Metafase: Desaparece la membrana nuclear y el nucleolo. Los centrómeros de los cromosomas se disponen en una placa en la zona correspondiente al ecuador de la célula. Los centrómeros de los cromosomas se reúnen en este plano, pero algunos se hallan cerca del centro de la célula mientras que otros se hallan más cerca de la periferia de la misma. Las ramas de los cromosomas no se hallan en el plano ecuatorial, sino que se extienden en forma que aparece desordenada a cada lado (sólo los centrómeros se hallan en el plano ecuatorial). Mientras los cromosomas se están disponiendo en esta forma, sus ramas siguen acortándose. Los túbulos de cada centrósfera se unen a centrómeros de los cromosomas, de tal manera que cada centrómero tiene túbulos de una centrósfera unidos a uno de sus lados, y túbulos de otra centrósfera al otro. Para fijarse en los centrómeros de los cromosomas en las regiones más periféricas del plano ecuatorial, los túbulos han de estar divergentes, lo cual origina una imagen mitótica con aspecto de huso.

Anafase: Se caracteriza por dos acontecimientos en primer lugar -

los centrómeros de los cromosomas se dividen, de manera que las dos cromátides de cada cromosoma quedan totalmente separadas:

A partir de entonces cada cromátide se considera un cromosoma por derecho propio . .

En segundo lugar, cuando los centrómeros se dividen, los túbulos que están unidos a los centrómeros tiran de las cromátides separados de cada cromosoma hacia los polos opuestos de la célula .. El motivo de tal movimiento no es bien conocido; un factor importante parecía ser que la célula se ha estado alargando sobre la línea que une sus dos polos (en ángulo recto con el ecuador) y las centrósferas han adoptado una posición cerca de cada polo celular; en consecuencia se ha creado tensión en los túbulos, de manera que cuando los centrómeros se separan de los túbulos tensos tiran de las cromátidas hacia los extremos respectivos de la célula . Otro hecho es que cuando cada centrómero se divide, las mitades separadas se repelen entre sí.

Telofase: Al final de la anafase y al comienzo de la telofase se desarrolla una constricción en la parte media de la célula alargada; esta constricción rodea a la célula como un surco, al cual se le denomina surco de segmentación porque cuando va haciéndose más profundo divide la célula en dos células hijas. Probablemente intervengan en la segmentación por lo menos dos mecanismos . En primer lugar es muy probable que el surco de segmentación se desarrolle por acumulación y contracción de material fibrilar en el citoplasma-

inmediatamente por debajo y a cada lado del surco de segmentación.

Otro factor que probablemente interviene como parte de la segmentación en algunos tipos de células es que se acumulen pequeñas vesículas membranosas por debajo del surco de segmentación, y luego se funden no sólo juntas, sino también con la membrana celular en el fondo del surco, lo cual, claro está, aumenta todavía más la profundidad de éste.

Mientras el surco de segmentación se va haciendo más profundo, puede verse todavía un haz de túbulos que unen las dos células a punto de separarse; esto es lo que se llama el cuerpo medio de la célula en división. Cuando la segmentación es completa, los restos del cuerpo medio quedan indicados por una mayor densidad a lo largo de las membranas celulares de las dos células hijas en el punto donde se han separado; este aumento de densidad depende de lo que queda del cuerpo medio. Entre tanto los cromosomas de cada célula hija se han desarrollado en mayor o menor grado adoptando nuevamente el estado alargado de los cromosomas característicos de los núcleos de interfase. Se han reformado los nucleólos y desarrollado una membrana nuclear en cada célula hija para rodear cromatina, nucleólos y jugo nuclear. (20,21).

Las células que siguen dividiéndose regularmente, pasan consecutivamente por interfase, mitosis, interfase, mitosis y así sucesi

vamente. Un paso completo a través de la interfase y la mitosis recibe el nombre de un CICLO CELULAR. El tiempo tomado por cualquier tipo de célula para completar un ciclo celular completo recibe el nombre de tiempo de generación.

El estudio detallado del ciclo celular nos muestra que está dividido en dos etapas principales: la mitosis, que se subdivide en las cuatro fases ya descritas y la interfase. Esta se subdivide a su vez en tres subfases llamadas G_1 , S y G_2 .

Una vez terminada la mitosis, la célula entra en la etapa que se ha denominado G_1 o de preduplicación. La fase G_1 es aquella en la cual las células que acaban de dividirse y que no sufren nueva mitosis permanecen hasta iniciar otro ciclo mitótico. En esta fase ocurre la síntesis del DNA, de las proteínas y la recuperación del volumen normal de la célula que fue reducida a la mitad en la mitosis. Esta fase es corta en los tejidos de renovación rápida.

Durante la fase S ocurre la síntesis con duplicación del DNA.

G_2 es la fase de postduplicación, donde las células han terminado la fase S pero no han entrado aún a mitosis. Además se cree que algunas células pasan por una fase inactiva de descanso. (6,20,21).

Parece que la división celular estaría desencadenada por el mecanismo que establece la duplicación del DNA; una vez que ésta comienza, la célula automáticamente sigue el resto de la interfase y luego la mitosis.

Sin embargo, se cree que las células no sufren actividad mitótica indistintamente, sino que esta actividad está controlada de alguna manera. Abercrombie (1957) sugirió que los mecanismos de control son resultado de la estimulación de agentes humorales, es decir, de un mecanismo homeostático. Se ha demostrado que la adrenalina puede inhibir la actividad mitótica. (4,6,11).

Esto fué demostrado por Bullough & Laurence (1961) quienes encontraron una depresión en el número de células en mitosis durante el stress y relacionan ésto con un incremento en la concentración de adrenalina. (3).

Asimismo, estos investigadores también Randers Hansen -- (1967) haciendo estudios de la mitosis epidérmica tanto in vitro como in vivo, demostraron que además de la adrenalina, la concentración de chalone también influye en la actividad mitótica, (Bullough en 1967) propuso que los inhibidores mitóticos de tejidos específicos deberían llamarse Chalones). En presencia de una concentración efectiva de estas sustancias se reduce el número de células entrando en mitosis, se reduce la velocidad de la mitosis y se prolonga la duración de ésta. (4,6,11).

Sin embargo, este efecto no se presenta en todas las células epiteliales y sólo puede ser demostrado en sistemas celulares con una velocidad de renovación moderada, tales como las células de la epidermis y del epitelio oral.

METODOS PARA EL ESTUDIO DE RENOVACION CELULAR .

1.- CUENTAS MITOTICAS:

Determinando el número relativo de células en mitosis en una sección , se puede calcular en índice mitótico (número de mitosis - por 1000 células). Debido a que la duración mitótica no puede ser de terminada en base a una cuenta mitótica simple, la información que - se obtiene del índice mitótico es estrictamente relativa. Para calcu - lar el índice mitótico correctamente, todos los estados mitóticos des - de la primera profase hasta la última telofase deben ser contados. - En algunos tejidos la profase y metafase son extremadamente difíci - les de identificar, como por ejemplo en el epitelio de unión.

En base a lo anterior a otras variaciones, los estudios com - parativos realizados con cuentas mitóticas tienen una confiabilidad - cuestionable, debido a que las figuras mitóticas son fáclmente in -- fluenciadas por factores difíciles o imposibles de controlar durante - el experimento. (6).

2.- COLCHICINA:

La inyección de una dosis adecuada de colchicina causa un - bloqueo de las células en metafase (Dustin, 1935). Bertalanffy y - Leblond descubrieron que la dosis apropiada de colchicina era de 2 - mg/kg de peso. (12).

Presumiblemente las células en otras fases no son afectadas,

las células entran en mitosis a una velocidad normal y son detenidas en la metafase. De aquí es posible determinar cuántas células han estado en mitosis durante un intervalo de tiempo en el cual la colchicina ha sido efectiva. La observación actual en microscopio de una sección con metafases detenidas por colchicina simple es fácil, ellas son reconocidas fácilmente de la cromatina oscura por un halo de luz de citoplasma rodeando la célula.

De acuerdo al número relativo de metafases detenidas por colchicina es simple calcular el tiempo del ciclo T de acuerdo a la ecuación:

$$T = \frac{100 \cdot t}{M_c}$$

donde t es el intervalo de tiempo entre la inyección de colchicina y el sacrificio, y M_c el porcentaje de metafase detenidas por colchicina.

También la duración mitótica (T_m) puede ser encontrada por medio de la técnica de colchicina por el porcentaje de metafases detenidas por colchicina (M_c) y la frecuencia de figuras mitóticas en animales de control no inyectados (M).

$$T_m = \frac{M \cdot t}{M_c}$$

La colchicina y su derivado la colcemida han sido ampliamente usadas para el estudio de renovación celular, como por ejem-

plo se ha usado en los estudios realizados por Trott y Gorenstein (1) Bullough y Laurence (11) y Wil Bienkinsopp (12). (6).

3.- MARCAS EN EL DNA :

Durante la síntesis del DNA, cuando tiene lugar una exacta -- duplicación de las moléculas, es posible introducir un grupo radioactivo que puede mantenerse durante todo el lapso de vida celular debido a que las moléculas son estables.

La técnica para marcar el DNA ha llegado a ser desarrollada en un alto grado de sofisticación. El marcador radioactivo es introducido a las moléculas por medio de precursores para marcar el DNA, el más popular de éstos es la timidina (timidina-deoxirribosa, TdR) marcando también con C o H. H-TdR ha probado ser especialmente -- útil para el estudio de células dinámicas.

La marca es localizada en el núcleo celular y puede ser i -- dentificada por radioautografía. Las células marcadas son reconocidas fácilmente bajo el microscopio debido a los granos de plata localiza -- dos directamente sobre el núcleo. Después de la división, la radioac -- tividad es dividida igualmente entre las dos células hijas, donde per -- manece hasta su próxima división.

De este modo es posible no sólo identificar las células que -- están en fase S sino también seguir la ruta de migración de las cé -- lulas después de la división variando el intervalo de tiempo entre la-

inyección del H-Td R y el sacrificio (6).

Algunos de los estudios realizados usando esta técnica son - el de Mogons Skougaard (3), Beagrie & Skougaard (5), Epstein & Malbach (7), Greulich, Cameron & Thrasher (8), y Duane & Banner (10).

VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS METODOS

Una evaluación de los tres métodos válidos para el estudio - de la renovación celular, muestra que es imposible simplemente el establecer que uno de los métodos es el método de elección para todos los propósitos. Al contrario, todos los métodos tienen alguna aplicación.

1.- Cuenta mitótica: Esta ofrece las mínimas ventajas y solo brinda información escasa y poco confiable. Este método es, sin embargo, el único valioso para el análisis de la actividad mitótica - en humanos.

2.- Colchicina: Comparada con la cuenta mitótica simple, - las ventajas de ésta técnica son obvias, pero con sus limitaciones. - La técnica de colchicina da una información clara en el tiempo de - un ciclo y la duración mitótica, mientras que no es posible obtener información de las rutas de migración celular ni tampoco de las -- subfases dentro de la interfase.

La colchicina, veneno mitótico, excluido en humanos, tiene sus ventajas en animales experimentales cuando se compara con el H-Td R. Primero, es aplicable en laboratorios no equipados para trabajar con materiales radioactivos, y está basado en simples rutinas histológicas sin procedimientos auxiliares como la radioautografía. El procedimiento con colchicina parece ser el método de elección para el estudio de fluctuaciones diurnas en la actividad mitótica y de la duración mitótica.

Pocos datos son valiosos en lo concerniente al tiempo tomado desde la inyección de colchicina hasta el completo efecto en las células entrando en metafase y usualmente no se hace ninguna corrección a esto. Ha sido establecido a través de la incidencia de profases idénticas en animales de control y con colchicina que la droga tiene un pequeño o ningún efecto en el número de células entrando en mitosis (Bertalanffy y Lau, 1962; Stevens Hooper, 1961). Pero la velocidad a la cual las metafases son acumuladas puede decrecer durante el período de tiempo entre la inyección de colchicina y el sacrificio (Leblond y Walker, 1956), particularmente cuando el intervalo de tiempo entre la inyección y el sacrificio excede las 6 horas; aún con intervalos cortos alguna pérdida de metafases puede ocurrir. Este fenómeno dará por resultado una subestimación de la actividad mitótica cuando se usa el método de colchicina.

3.- Precursores marcados de DNA: La técnica de H-Td R, - también excluída en humanos, tiene la ventaja sobre la colchicina que requiere menos animales para el cálculo del tiempo total de movimientos en un tejido. Esto es debido a que las fluctuaciones diversas en el número de células entrando a la fase S es menor que las variaciones de la actividad mitótica y consecuentemente puede ser descuidado. Las marcas con H-td R en las células son permanentes y puede seguirse su destino y ruta de migración. Más aún las marcas con H-Td R brindan información en fases dentro de la interfase lo cual no es posible con cualquier otra técnica. (6).

RENOVACION DEL EPITELIO GINGIVAL.

La actividad mitótica del epitelio gingival ha sido estudiada - extensamente en las últimas décadas. En particular se ha enfocado un especial interés al epitelio de unión considerando que una renovación celular continúa en contacto con el esmalte de los dientes, hace una verdadera adherencia orgánica entre el epitelio y el esmalte, difícil de visualizar.

Es difícil, y casi imposible el comparar los resultados de -- investigaciones previas, debido a las complicaciones que aparecen - por los diferentes métodos y especies usadas, así como diferentes - zonas epiteliales investigadas.

Algunos de los principales estudios que se han realizado rese

cientemente sobre la renovación celular del epitelio gingival son los siguientes:

- Trott y Gorenstein (1) estudiaron la velocidad mitótica en el epitelio oral y gingival de la rata y concluyeron que los tejidos gingivales, con excepción de la encía crevicular, presentan una variación diurna, por lo que la actividad mitótica más alta ocurre en las primeras horas de la mañana. También demostraron que el epitelio de unión tiene la velocidad mitótica diurna más alta de todos los epitelios que examinaron. (1).

- Skougaard (3) en un estudio de la renovación del epitelio gingival en marmoseta demostró que la actividad mitótica es mayor en el epitelio de unión, y cree que ésta actividad alta está relacionada con cambios inflamatorios. (3).

- Erik Randers Hansen (4) afirma que las variaciones tanto en la velocidad como en la duración mitótica están controladas por un mecanismo homeostático en el cual el chalone epidérmico y la adrenalina toman parte. El número de células entrando en mitosis se reduce y la duración de la mitosis es prolongada por la acción de estas sustancias. (4)

- Duane y Baner (10) estudiaron la renovación celular en la mucosa oral y piel de la rata y obtuvieron un tiempo de renovación para las diversas porciones de la mucosa oral de 3.2 a 5.8 -

días. se demostró además que la mucosa de la encía libre se renue-
a sí misma cada 5.6 días y que la encía libre e insertada tiene la re_
novación celular más lenta que cualquier otra área de la cavidad oral.

OBJETIVOS

La finalidad del presente trabajo, es estudiar la renovación celular del epitelio gingival en papila interdientaria de la rata. Principalmente en la punta de papila, el epitelio externo, el epitelio crevicular y el epitelio de unión, empleando la técnica de colchicina de Dustin, bajo dos diferentes dietas y un mismo tipo de cepillado.

MATERIALES Y METODOS

- Se utilizaron 14 ratas blancas adultas hembras cepa wistar
- Se dividieron en tres grupos de la siguiente manera:

I. - Grupo control " A "; 2 ratas adultas con un peso de:

1 - 254 grms.

2 - 253 grms.

2 - Grupo experimental " B "; 6 ratas adultas con un peso de:

1 - 245 grms.

2 - 244 grms

3 - 226 grms

4 - 220 grms.

5 - 207 grms.

6 - 220 grms.

Con variable de dieta DURA y con cepillado de barrido

3 - Grupo experimental " C "; 6 ratas adultas con un peso --

de:

1 - 207 grms

2 - 231 grms

3 - 236 grms

4 - 207 grms

5 - 211 grms

6 - 230 grms.

Con variable de dieta BLANDA y con cepillado de barrido

- Se cepillaron todos los días 10 veces por la mañana, aproximadamente a las 8 AM, en los incisivos inferiores con técnica de barrido

- Se les inyectó colchicina 1cm / 100 grms de peso al 0.01 % via intraperitoneal , sacrificándose después de 6 hrs. de haberse inyectado

Todos los sujetos de experimentación se encontraron en Anestros y aislados en grupos como se mencionó anteriormente

- Fueron sacrificados a razón de una diaria de cada grupo experimental (Se sacrificaron después de 3 días de iniciado el estudio hasta terminar con los grupos)

Durante el sacrificio se utilizó una campana de vidrio, dentro de ésta se colocó algodón con éter, en ella se introducía el animal de experimentación hasta no encontrar signos vitales

- Posteriormente al sacrificio, en una mesa de disección se obtenía una muestra de los incisivos inferiores y parte del maxilar inferior del sujeto experimental

- La muestra era lavada con agua y se fijaba con formalina al 10 %, se fueron clasificando cada una de las ratas de acuerdo a los grupos establecidos hasta terminado el sacrificio

- Posteriormente se desmineralizaron los especímenes con ácido fórmico al 5 % . Se tomaron radiografías como control del des

mineralizado, se utilizó para el estudio la técnica de inclusión en parafina, para la deshidratación se utilizó el Histokinette, procesándolo en parafina, realizando cortes seriados de la muestra en sentido mesiodistal.

Se seleccionó de los cortes seriados, las áreas representativas del estudio, obteniéndose alrededor de 10 laminillas por cada sujeto experimental. Se tiñeron con Hematoxilina y Eosina, se procedió a la observación con microscopio óptico a 200 x, 400 x, y bajo inmersión, dividiendo el campo de observación en:

Campo I

Campo II

Campo III

Campo IV

RESULTADOS

Para la lectura de mitosis (renovación celular), se seleccionaron áreas de: epitelio de unión, epitelio crevicular, punta de la papila y epitelio externo. (figura No. 1)

Todas las secciones fueron examinadas a 250 X , 400 X , y bajo inmersión, para determinar la identidad individual de las células que a continuación se reportan en la tabla No. 1, tabla No. 2 y tabla No. 3, que corresponden al grupo control y a los grupos experimentales.

La actividad mitótica revelada por las células, se lleva a cabo en áreas generativas del epitelio, existiendo distribución variable-celular tanto en el estrato espinoso como en el basal, indicando que la división es variable dependiendo de la migración hacia la superficie.

El número de mitosis en el grupo A control, es menor que en el grupo B y que en el grupo C de acuerdo al cambio de variables posiblemente debido a la dieta o a trauma mecánico, estableciéndose parámetros de medida según tablas Nos. 1, 2, y 3, graficando los valores de los grupos experimentales (gráficas 1 , 2 , 3 , y 4).

FIGURA No. 1

- I:- EPITELIO DE UNION
- II:- PUNTA DE LA PAPILA
- III:- EPITELIO CREVICULAR
- IV:- EPITELIO EXTERNO

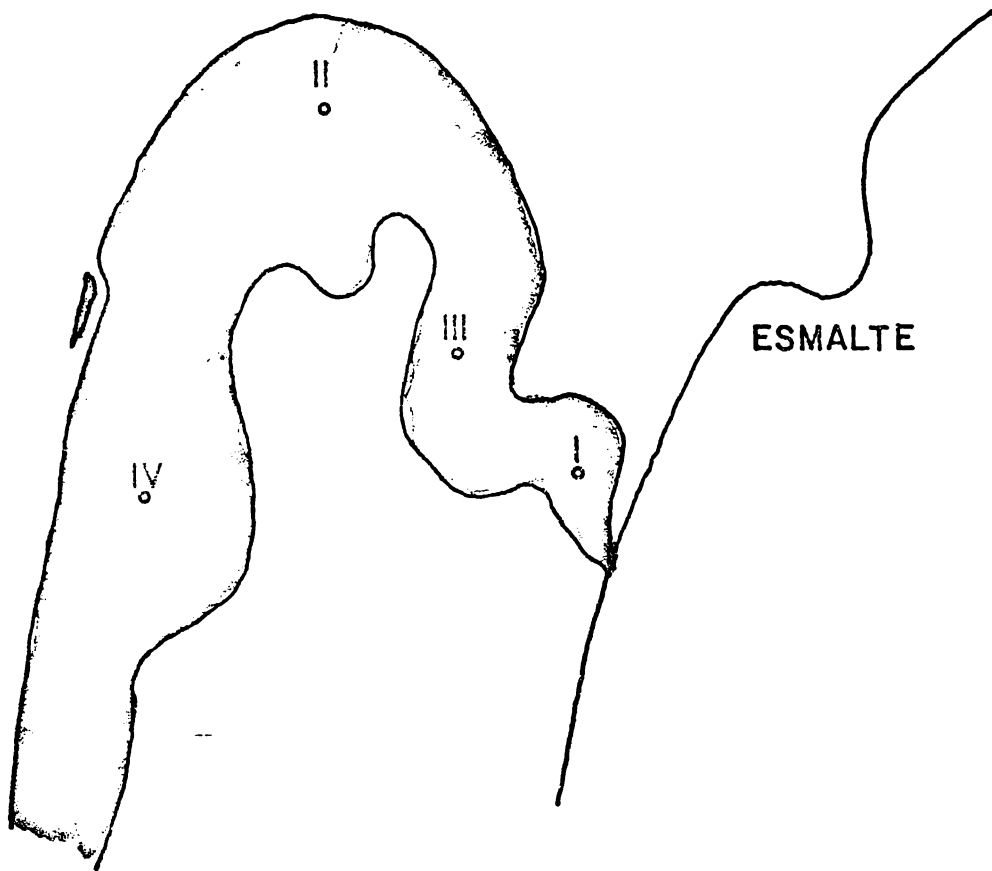


TABLA NO. 1

GRUPO CONTROL " A "

FO 1383 I

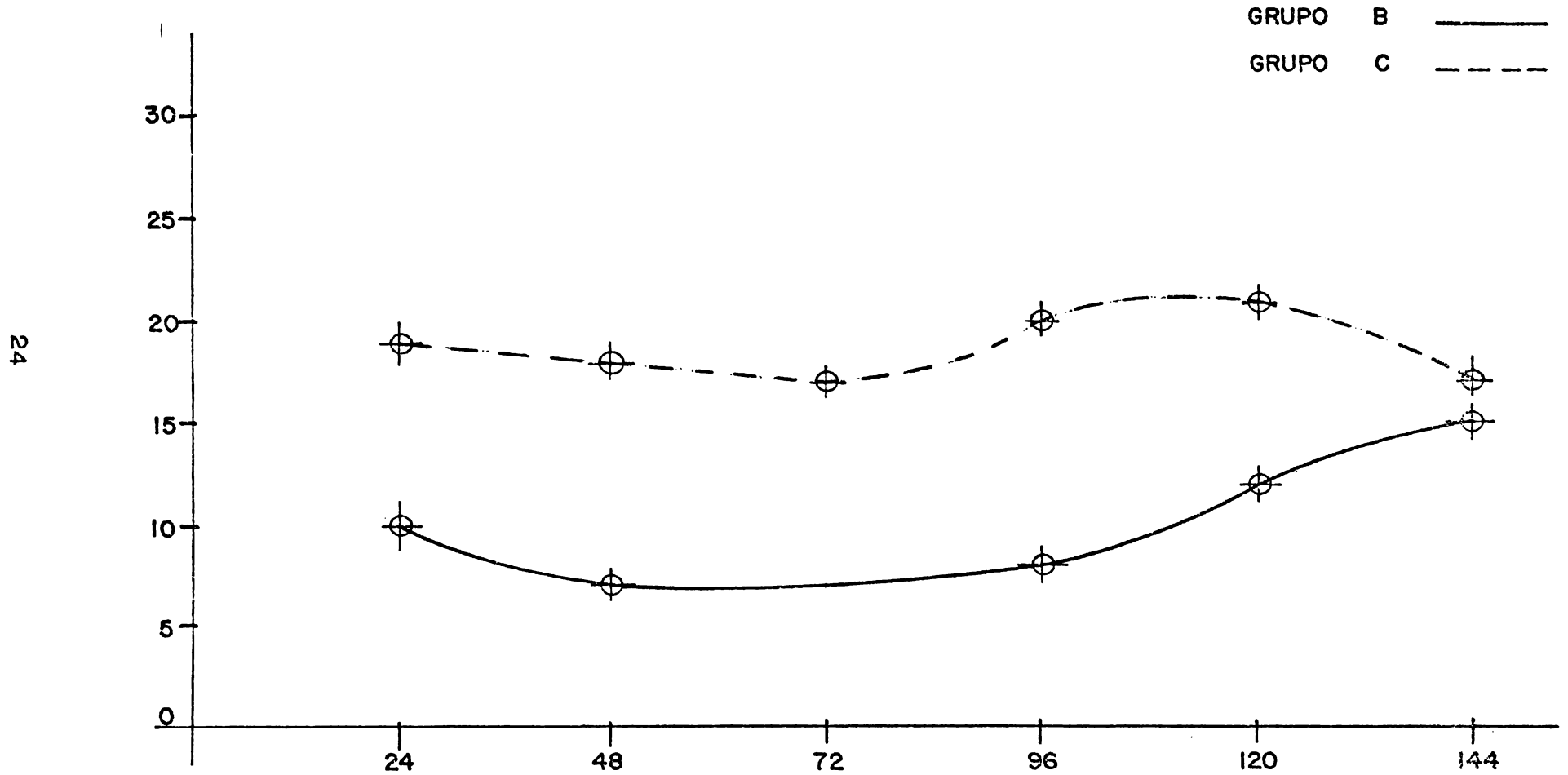
I 4

II 3

III 7

IV 9

GRAFICA No. 1



ZONA I.- EPITELIO DE UNION

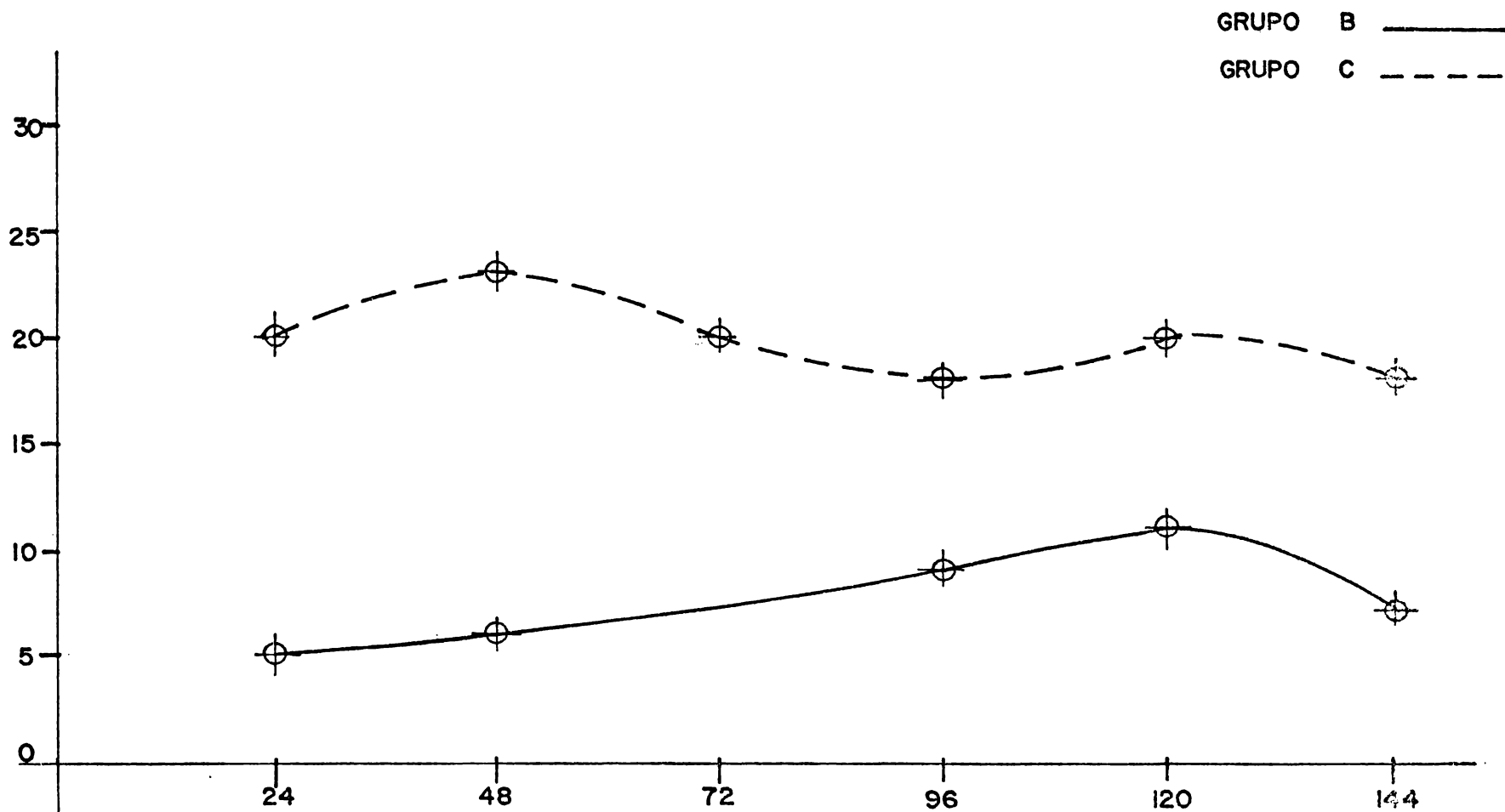
TABLA NO. 2

GRUPO EXPERIMENTAL " B "

	FO 1483 I	FO 1583 I	FO 1783 I	FO 1883 I	FO 1983 I
I	10	7	8	12	14
II	5	6	9	11	7
III	7	5	7	13	10
IV	9	12	8	10	17

GRAFICA No. 2

26



ZONA II: PUNTA DE LA PAPILA

TABLA NO. 3

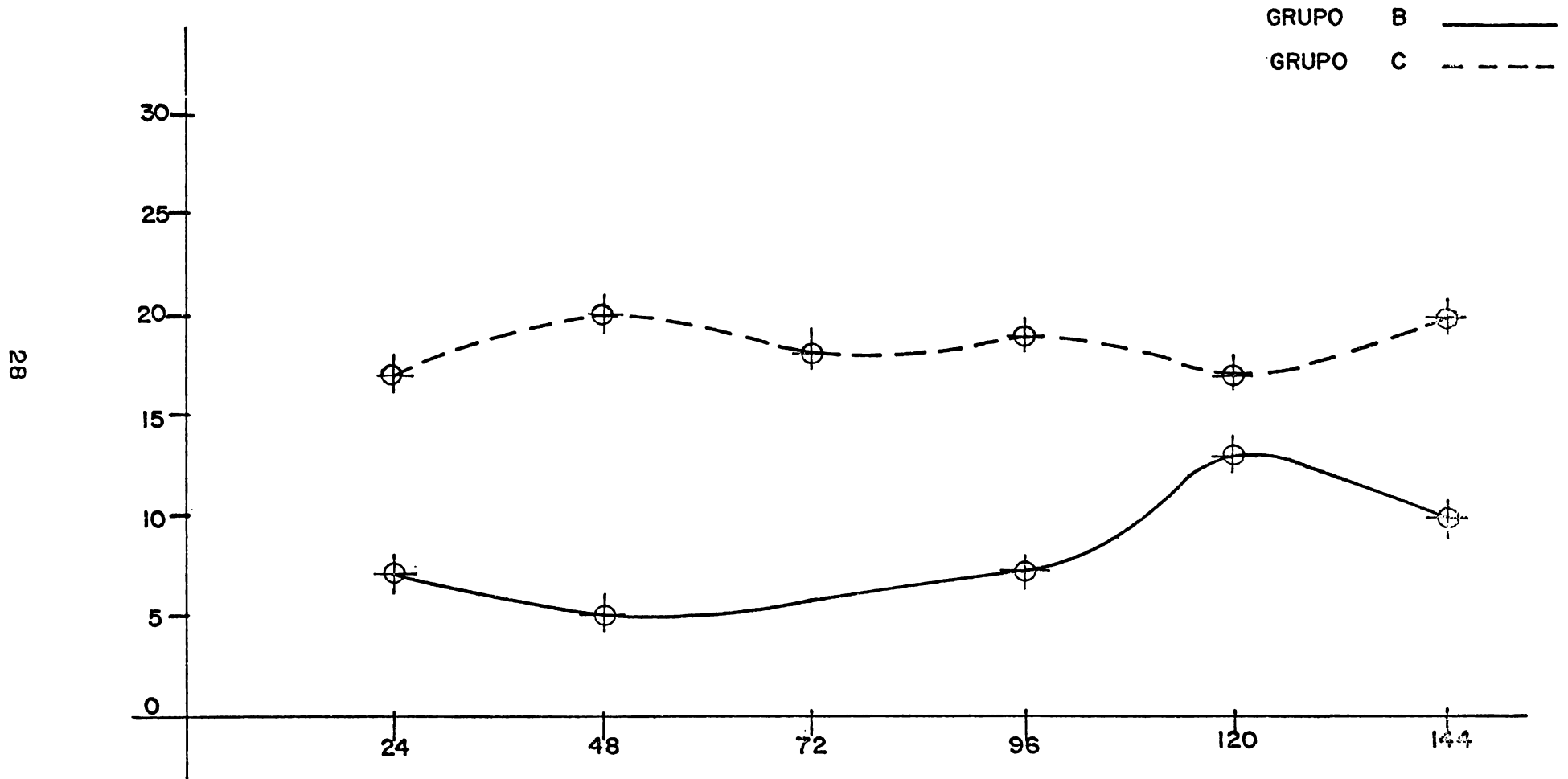
GRUPO EXPERIMENTAL " C "

	FO 2083 I	FO 2183 I	FO 2283 I	FO 2383 I	FO 2483 I	FO 2583 I
I	19	18	17	20	21	17
II	20	23	20	18	20	18
III	17	20	18	19	17	20
IV	23	25	23	24	21	16

Nota: Promedio entre FO 2083 I y FO 2283 I

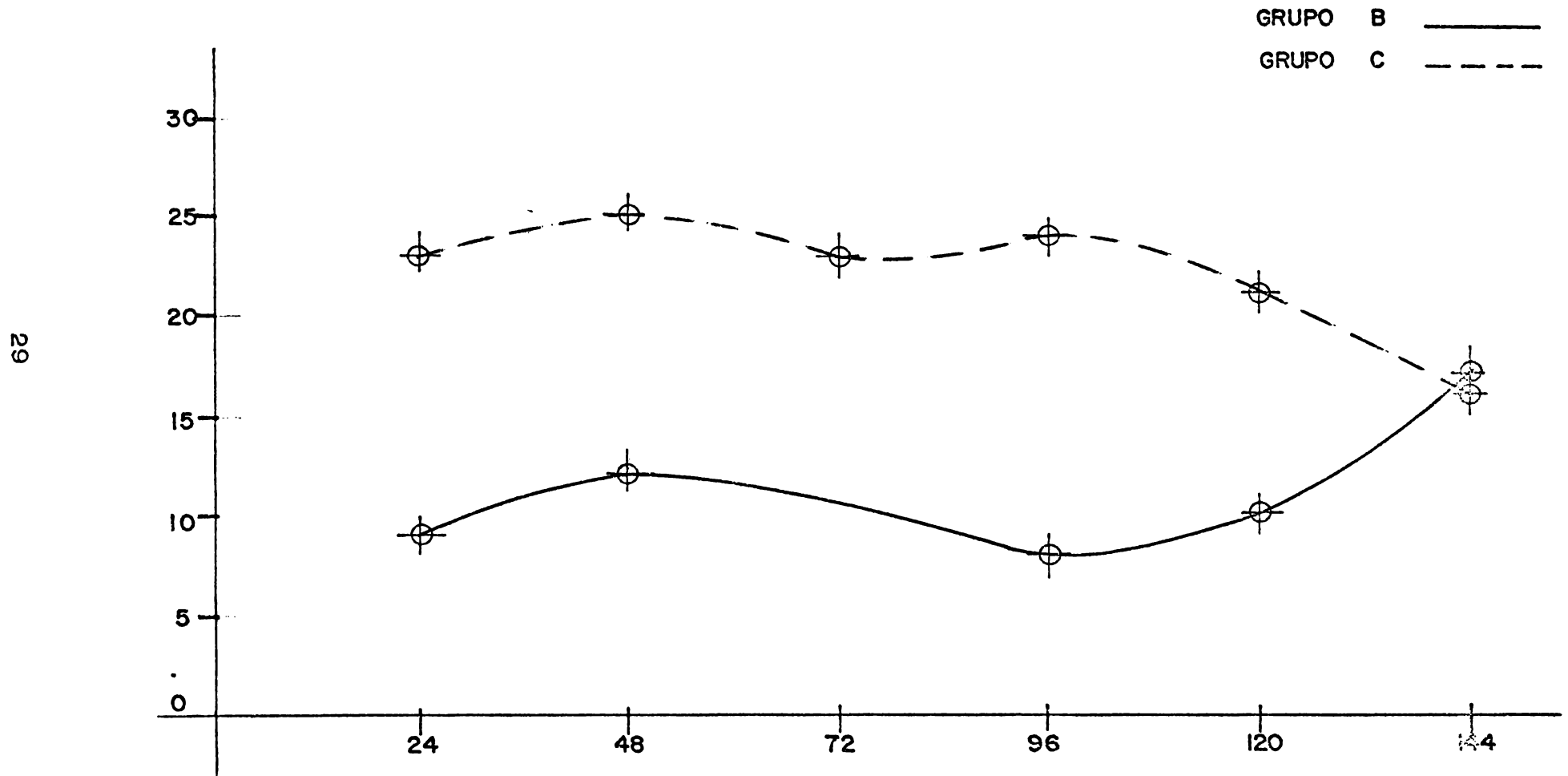
I 18 ; II 20 ; III 17.5 ; IV 23.

GRAFICA No. 3



ZONA III : EPITELIO CREVICULAR

GRAFICA No. 4



ZONA IV : EPITELIO EXTERNO

Para comprobar si existía significancia en el estudio, se realizaron pruebas estadísticas para darle validez externa e interna utilizando pruebas no paramétricas como son la de χ^2 y Huskal Wallis - (H).

Con la siguiente hipótesis:

$$H_a : A \neq B \neq C$$

$$H_o : A = B = C$$

De donde se deduce que:

R.D.

Si $H_{calculada} > H_{tablas}$ entonces H_o se rechaza

R.D.

Si $H_{calculada} > \chi^2_{tablas}$ entonces H_o se rechaza

Valor de H y χ^2 de las tablas:

$$H (5,5,1 \quad .05) = 5.13$$

$$\chi^2 (2, .05) = 5.991$$

Como observaremos en las tablas 4 y 5 y gráficas 5, 6, 7 y 8.

TABLA NO. 4

RESULTADOS DE $H_{calculada}$

$H_{calculada}$	H_{tablas}	H_o	H_a
H_I	8.17	5.13	rechazo acepta
H_{II}	8.17	5.13	rechazo acepta
H_{III}	7.52	5.13	rechazo acepta
H_{IV}	6.67	5.13	rechazo acepta

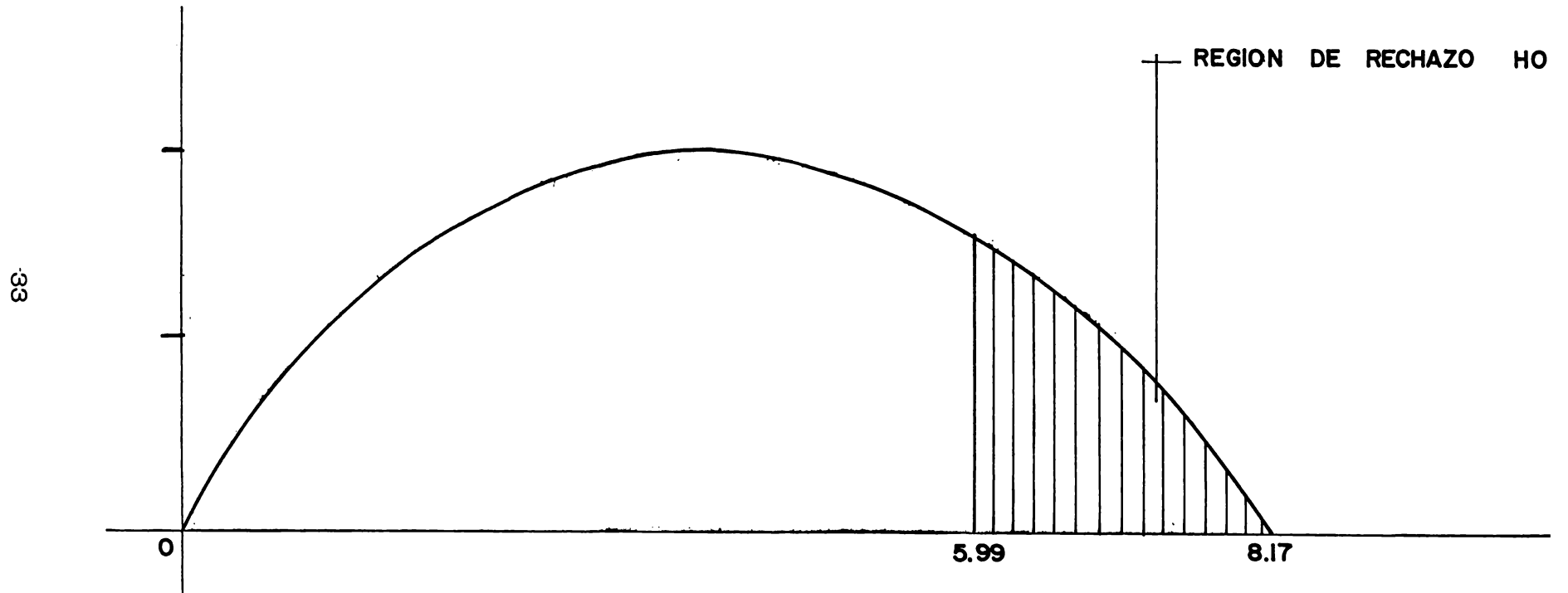
TABLA NO. 5

RESULTADOS DE $H_{calculada}$

$H_{calculada}$	X^2_{tablas}	H_0	H_a
H_I 8.17	5.991	rechazo	acepta
H_{II} 8.17	5.991	rechaza	acepta
H_{III} 7.52	5.991	rechaza	acepta
H_{IV} 6.62	5.991	rechaza	acepta

Nota: Como se observa en las gráficas 5, 6, 7 y 8.

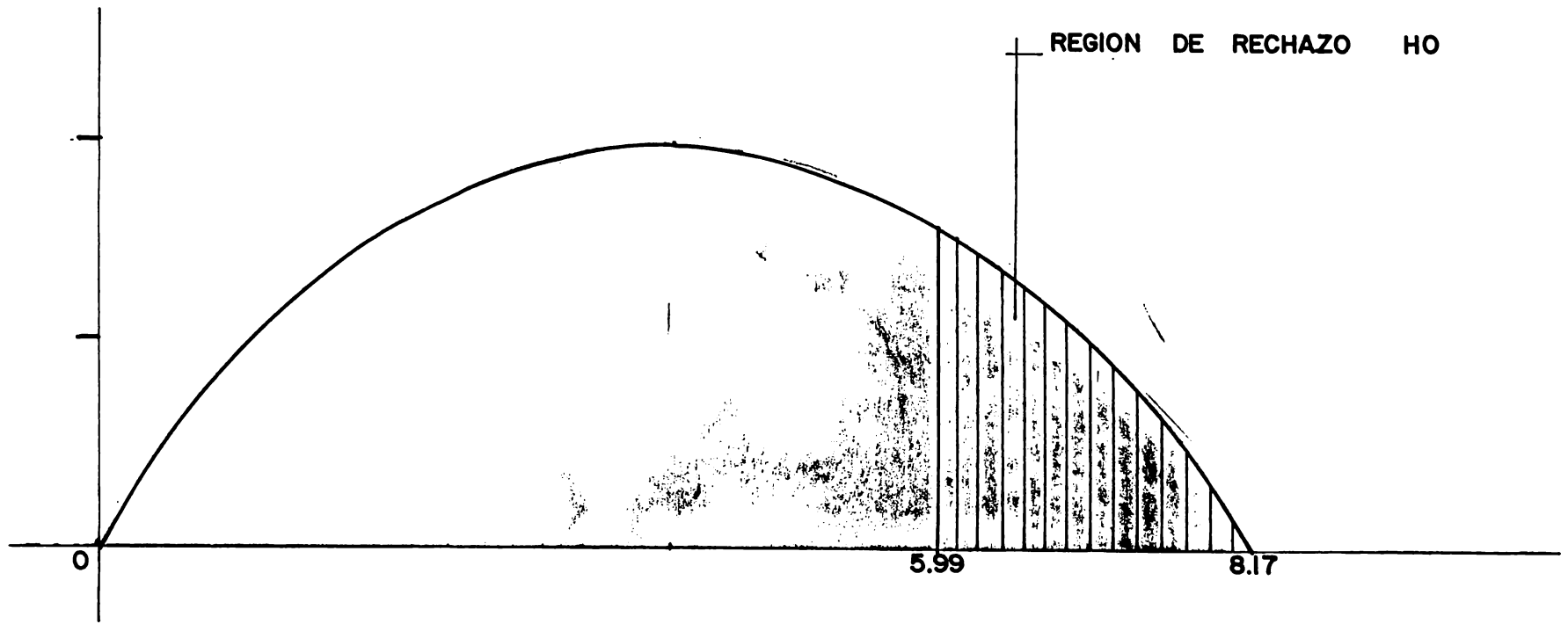
GRAFICA No. 5



$$H_1 = 8.17$$

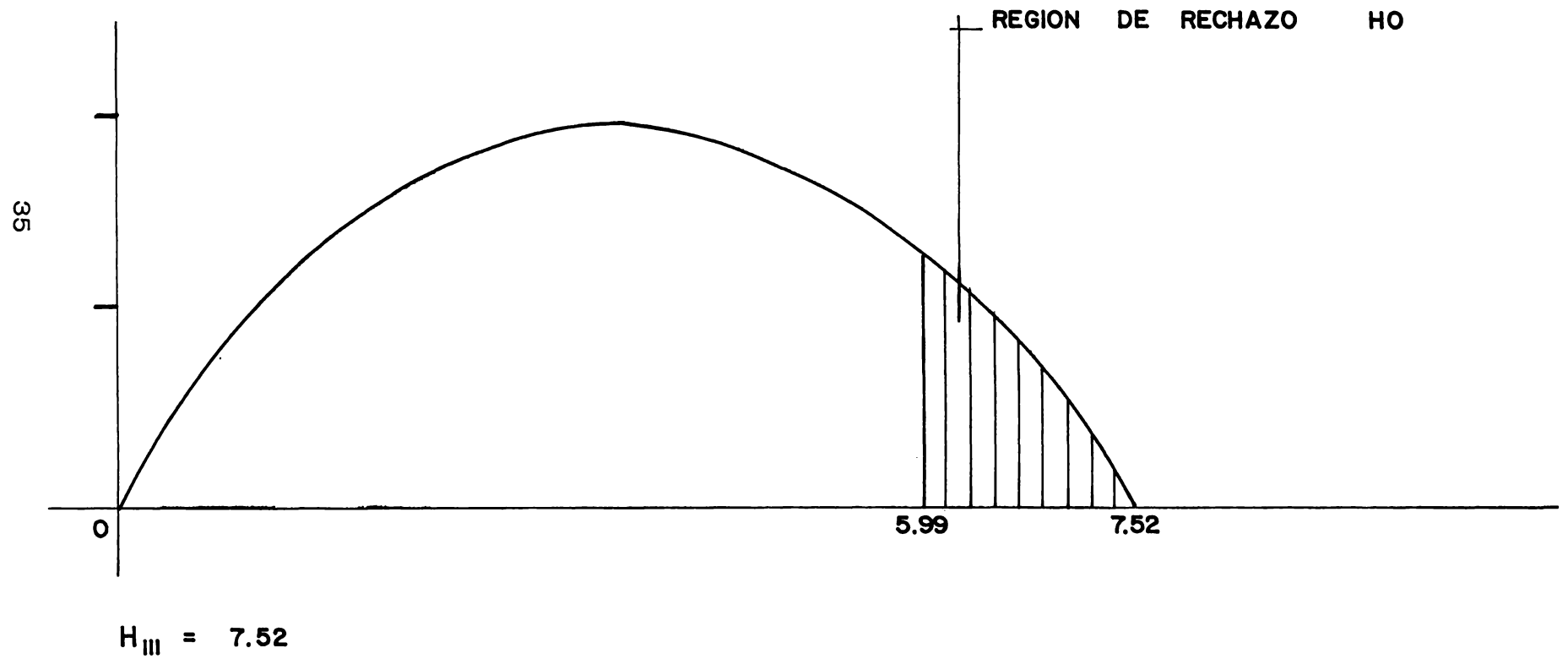
GRAFICA No. 6

34

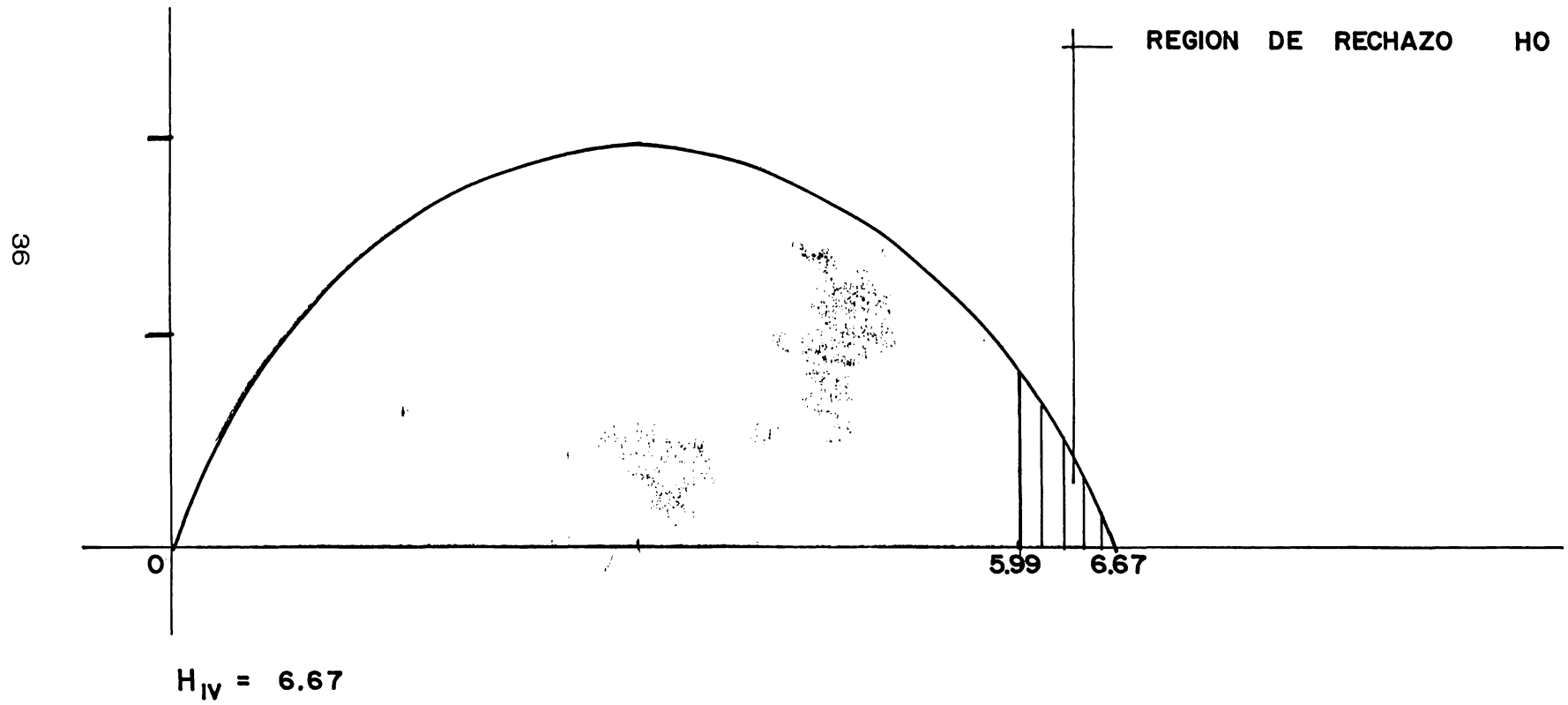


$H_{II} = 8.17$

GRAFICA No. 7



GRAFICA No. 8



ESTUDIOS HISTOLOGICOS

Se tomaron microfotografías de las áreas más representativas - de: epitelio de unión, epitelio crevicular, punta de la papila y epitelio externo, en donde observaremos a la renovación celular con tinción de Hematoxilina y Eosina en el grupo control como en los grupos experimentales. Las siguientes microfotografías muestran los cortes histológicos de las áreas ya mencionadas.

~.

Microfotografía mostrando las diferentes áreas del epitelio las cuales fueron divididas en cuatro zonas de la siguiente manera:

I.- Epitelio de unión.

II.- Epitelio de la punta de la papila.

III.- Epitelio crevicular.

IV.- Epitelio externo.

Microfotografía mostrando el área del epitelio
externo a 250 X. (Grupo control).

Microfotografía mostrando el área del epitelio
crevicular a 250 X .(Grupo control).

Microfotografía mostrando el área del epitelio crevicular, del grupo experimental bajo inmersión, observamos distribución variable tanto en el estrato espinoso como en el basal.

Microfotografía mostrando aumento en el número de mitosis correspondiente a grupo experimental __ posiblemente debido a la dieta, estableciendo parámetros de medida.

Microfotografía mostrando que el número de mitosis en los grupos experimentales es mayor de acuerdo al cambio de variables . posiblemente debido a el trauma mecánico , estableciéndose parámetros de medida, bajo inmersión.

DISCUSION

Es difícil el comparar los resultados de investigaciones previas, debido a las complicaciones que aparecen por los diferentes métodos y especies usadas, así como diferentes zonas epiteliales investigadas.

Sin embargo, éste estudio se llevó a cabo en cuatro zonas:

Zona I	epitelio de unión
Zona II	punta de la papila
Zona III	epitelio crevicular
Zona IV	epitelio externo

el cual se realizó con la técnica de la colchicina (Dustin 1934), en donde observamos que el grupo B tenía un bajo rango de mitosis, el cual se incrementaba conforme avanzaba el estudio.

El grupo C empezó con un alto rango de mitosis, probablemente debido al estímulo producido por su dieta blanda, y conforme avanzó el estudio se fue incrementando.

Se ha sugerido que la actividad mitótica está determinada por algunos agentes humorales; y se ha demostrado que la adrenalina puede inhibir la actividad mitótica (4,6,11)

Nosotros observamos que durante la fase del cepillado nuestros sujetos de experimentación se encontraban bajo tensión (irritadas), debido a que se les tenía que sujetar y posteriormente realizar

diez movimientos de cepillado de barrido durante todo el estudio hasta su sacrificio.

Ya se demostró por Bullough & Laurence (en 1961), quienes encontraron una depresión en el número de células en mitosis durante el stress y relacionan esto con un incremento en la concentración de adrenalina. (3)

Randers Hansen (1967), menciona que no sólo la adrenalina sino la concentración de chalonas influye también en la actividad mitótica, (Bullough en 1962, propuso que los individuos mitóticos de tejidos específicos deberían llamarse chalonas) en presencia de una concentración efectiva de éstas sustancias se reduce el número de células entrando en mitosis, se reduce la velocidad de la mitosis y se prolonga la duración de ésta (4,6,11).

Por otro lado, se dice que el tiempo para el sacrificio después de la administración de colchicina, hasta el completo efecto en las células entrando en metafase, y usualmente no se hace ninguna corrección a esto, ha sido establecido a través de la incidencia de profases idénticas en animales de control y con colchicina (que la droga tiene un pequeño o ningún efecto) en el número de células entrando en mitosis (Bertalanffy & Lav, 1962; Stevens Hooper, 1961)

La velocidad a la cual las metafases son acumuladas puede suceder durante el período de tiempo entre la inyección de colchicina y el sacrificio (Leblond & Walker, 1956), particularmente cuando el -

Intervalo de tiempo entre la inyección y el sacrificio excede las 6 horas

Nosotros realizamos nuestro estudio basado en esto y después de la administración de la colchicina por vía intraperitoneal, se sacrificaron los sujetos de éste estudio a las 6 horas, sabiendo que en intervalos cortos alguna pérdida de metafases puede ocurrir.

Bertalanffy y Leblond mencionan que la dosis apropiada de colchicina es de 2 mg/kg de peso. (12). Nosotros utilizamos 0.01 % de colchicina pura por cada 100 mg/peso, observándose que funcionó adecuadamente.

Presumiblemente las células en otras fases no son afectadas; las células entran en mitosis a una velocidad normal y son detenidas en la metafase, de aquí es posible determinar cuántas células han estado en mitosis durante un intervalo de tiempo en el cual la colchicina ha sido efectiva. (Dustin 1934).

La colchicina y sus derivados, la colcemida, han sido ampliamente usadas para el estudio de renovación celular, como por ejemplo se ha usado en los estudios realizados por: Trott & Gorenstein (1) , Bullough & Laurence (11) y Wil Bienkinsopp (6).

Existen diferentes métodos de los cuales el que nosotros utilizamos parece ser muy apropiado pero no el mejor aparentemente, sin embargo el procedimiento con colchicina parece ser el método de elección para el estudio de fluctuaciones diurnas en la actividad mitó-

tica y de la duración mitótica (20,21), debido a que nuestro estudio fué realizado precisamente en las mañanas donde se les cepillaba a los sujetos experimentales y posteriormente se sacrificaban a las 6 horas lo cual ya fue discutido anteriormente.

En los estudios realizados por otros investigadores observamos que lo realizaron en condiciones diferentes, con diferentes sujetos experimentales y haciendo una relación de ellos vemos que en el estudio que nosotros realizamos se contempla las variables de la dieta y del cepillado, mencionando además de que no existen investigadores que lo hayan realizado en estas condiciones. Podemos subrayar que los estudios de las áreas donde nosotros hemos hecho el estudio, no todos los investigadores las han observado. Nuestras áreas de observación son: Epitelio de unión, Punta de la papila, Epitelio crevicular, y Epitelio externo.

Existe una gran cantidad de investigadores que han hecho estudios de alguna de éstas áreas, pero no de todas ellas por lo general. Los estudios se han realizados con la técnica de colchicina de Dustin (1934) (1,11,12) (6); con la técnica de identificación de DNA-Howard & Pele (1953) (3) (5,6,7,8,10) y alguno que otro con la de conteo mitótico realizada en humanos (6).

Trott y Gorenstein (1), estudiaron la velocidad mitótica en el epitelio oral y gingival de la rata y concluyeron que los tejidos gingivales con excepción de la encía crevicular presentan una varia -

ción diurna, por lo que la actividad mitótica más alta ocurre en las primeras horas de la mañana y demostraron que el epitelio de unión tiene la velocidad mitótica diurna más alta de todos los epitelios que examinaron.

Nosotros encontramos que el más alto grado de renovación celular se localiza en el epitelio de unión y además en el epitelio externo, donde probablemente está dado por el cepillado que se les practicó a los grupos experimentales.

Skougaard (3), en un estudio de la renovación del epitelio gingival en marmosetas, demostró que la actividad mitótica es mayor en el epitelio de unión y cree que ésta actividad alta está relacionada con cambios inflamatorios.

Nosotros estamos de acuerdo con esto porque alguna de nuestras muestras se encontraban con un infiltrado inflamatorio agudo, principalmente observándose Leucocitos Polimorfonucleares Neutrófilos, principalmente en la zona de epitelio de unión, la cual fue un área con el mayor rango mitótico.

También se ha reportado un estudio en perros por H. Loe (1961), en donde se indicó una velocidad alta en la actividad mitótica para el epitelio de unión, en donde había un alto número de leucocitos.

CONCLUSIONES

Nuestras observaciones confirman que la regeneración celular se lleva a cabo dentro de los estratos basal y germinativo de los epitelios, variando según las diferentes condiciones.

La capacidad de renovación celular es probablemente una respuesta evolutiva al trauma sufrido por los epitelios de recubrimiento.

El establecimiento de tiempos y cantidades de células en renovación en los epitelios normales de las ratas, semejan a los humanos y otras especies, pudiendo servir de base a la línea de investigación epitelio-celular en circunstancias patológicas.

En este estudio nosotros observamos que la mayor cantidad de renovación celular está dada en el epitelio de unión y en el epitelio externo.

También observamos que la dieta es un factor que debe tomarse en consideración debido a los resultados que se observaron en el epitelio externo, en donde hubo una cantidad significativa de renovación celular basados en el estudio estadístico.

Otro punto importante para subsecuentes estudios, será la calidad de la dieta y no solamente el tipo de dieta como se realizó en este estudio, observando significancia en los grupos experimentales.

Otro de los factores es el cepillado que de no usarse correc

tamente actuará como un factor traumático, lo cual fue observado a nivel de epitelio de unión, donde encontramos un número considerable de leucocitos polimorfonucleares neutrófilos.

Es importante mencionar que para redondear este estudio sea necesario realizar otras investigaciones que determinen la importancia de la erupción activa en roedores, punto que no tomamos en consideración durante este estudio, ya sea utilizando esta técnica, la de colchicina o la de marcas en DNA.

Por último he de mencionarles que este estudio que realizamos, después de revisar la literatura, es un estudio que ningún otro investigador había realizado con las variables de dieta y cepillado.

RESUMEN

El objetivo principal de éste trabajo, es la determinación de actividad mitótica de la papila interdentaria en el epitelio gingival de rata cepa wistar, dividido en cuatro zonas:

Epitelio de unión I

Epitelio crevicular III

Punta de la papila II

Epitelio externo IV

Empleando la técnica de colchicina (Dustin 1934)

El estudio se realizó en la Facultad de Odontología, utilizando como material biológico ratas blancas (cepa wistar) divididas en un grupo control y dos grupos experimentales, utilizando como variables 2 tipos de dieta y el cepillado con técnica de barrido. Se sacrificaron a razón de una diaria tres días después de iniciada la investigación, inyectándoseles colchicina 1 cm / 100 grms. al 0.01 % via intraperitoneal., y sacrificándose después de 6 hrs.

Posteriormente se obtuvieron muestras de incisivos inferiores fijándolos con formalina al 10 %; se decalcificó con ácido fórmico al 5 % ; se deshidrató en Histokinette, se hicieron cortes seriados en sentido mesio - distal, escogiéndose sólo aquéllos donde las muestras fueran representativas del estudio. Se tiñeron con Hematoxilina y Eosina, obteniéndose alrededor de 190 laminillas; se procedió a la

observación en microscopio óptico a 200 x, 400 x, y bajo inmersión, dividiendo el campo de observación en cuatro áreas; epitelio de unión, epitelio crevicular, punta de la papila y epitelio externo.

El resultado del estudio fué que la actividad mitósica revelada por las células medidas, se llevó a cabo en áreas generativas del epitelio; existe distribución variable de células en mitosis entre el estrato espinoso y el basal, la medición indica que las células se dividen, variablemente dependiendo de la migración hacia la superficie.

El número de mitosis en el grupo A es menor que en el grupo B y que en el grupo C, de acuerdo con el cambio de variables, posiblemente debido a la dieta o a trauma mecánico, estableciéndose parámetros de medida.

Para observar si los resultados fueron significativos realizamos χ^2 y Huskal Wallis (H) que nos arrojaron los siguientes datos:

Valores de H y χ^2 (de las tablas)

$$\chi^2 (2, .05) = 5.991$$

$$H (5, 5, 1 \dots .05) = 5.13$$

Resultados de H y χ^2 del estudio:

$$H_I = 8.17$$

$$H_{II} = 8.17$$

$$H_{III} = 7.52$$

$$H_{IV} = 6.67$$

Donde concluimos que el estudio fue significativo en todas las áreas, pero principalmente en el epitelio de unión y en el epitelio externo.

BIBLIOGRAFIA

1 - TROTT J R & GORENSTEIN S L (1963)

MITOTIC RATES IN THE ORAL AND GINGIVAL EPITHELIUM OF THE
RAT

ARCHS. ORAL BIOL., 8, 425 - 434 1963

2 - BRILL N. & BRONNEMAM R.

INMUNO - ELECTROPHORETIC STUDY OF TISSUE FLUID FROM -
GINGIVAL POCKETS

ACT ODONT SCAND 18:95 - 100

3 - SKOUGAARD M (1965)

TURNOVER OF GINGIVAL EPITHELIUM IN MARMOSETS

ACTA ODONT. SCAND 23, 623 - 643

4 - HANSEN E R (1967)

MITOTIC ACTIVITY AND MITOTIC DURATION IN TONGUE AND -
GINGIVAL EPITHELIUM OF MICE - EFFECTS OF CHALONE

ODONT T 75:480 - 487

5 - BEAGRIE G S. & SKOUGAARD M.S. (1962)

OBSERVATIONS ON THE LIFE CYCLE OF GINGIVAL EPITHELIAL -

CELLS OF MICE REVEALED BY AUTORADIOGRAPHY.

ACT. ODONT SCAND. 20:153.

6 - SKOUGAARD M (1970).

CELL RENEWALL WITH SPECIAL REFERENCE TO THE GINGIVAL -
EPITHELIUM.

ADVANCES OF ORAL BIOL , 4,261 - 288

7.- EPSTEIN W.L & MALBACH H.I. (1965).

CELL RENEWAL IN HUMAN EPIDERMIS

ARCHS. DERM., 92:426 - 468

8 - GREULICH R.C., CAMERON I.L. & THASHER J D. (1961)

STIMULATION OF MITOSIS IN ADULT MICE BY ADMINISTRATION -
OF THYMIDINE

PROC NAT SCI USA: 47,743-748

9 - KARRING T & LOE H (1973)

THE EFFECT OF AGE ON MITOTIC ACTIVITY IN RAT ORAL
EPITHELIUM

JOURNAL PERIODONT RES. , 8, 164- 170

10.- CUTRIGHT D E & BAUER H (1967)

CELL RENEWAL IN THE ORAL MUCOSA AND SKIN OF THE RAT I.

TURNOVER TIME

ORAL SURG. 23:249 - 257

11. - BULLOUGH N S & LAURENCE E. B. (1966)

THE DIURNAL CYCLE IN EPIDERMAL MITOTIC RURATION AND ITS
RELATION TO CHALONE AND ADRENALINE.

EXPTL CELL RES , 43:343 - 350.

12 - BLENKINSOPP W K (1968)

CELL PROLIFERATION IN STRATIFIED SQUAMOSOS EPITHELIUM -
IN MICE.

EXP CELL, RES , 50:265 - 276.

13.- ENGLER W.O. , RAMFJORD S.P & HINIKER J.J (1965)

HEALING FOLLOWING SIMPLE GINGIVECTOMY A TRITHIATED —

THYMIDINE RADIOAUTOGRAPHIC STUDY I. EPITHELIZATION

JOURNAL PERIODONT 37:298 - 308

14 - COWDRY E.U & THOMPSON H C (1944).

LOCALISATION OF MAXIMUM CELL DIVISION IN EPIDERMIS.

AMAT. REC. , 88:403 - 409

15.- CAMERON I L (1968)

CELL PROLIFERATION, MIGRATION AND SPECIALISATION IN THE -
EPITHELIUM OF THE MOUSE TONGUE

JOURNAL EXP ZOOL; 163:271 - 284

16.- NIKAT H. , ROSE G.C. & CATTONIM (1971).

MERKEL CELL IN HUMAN AND RAT GINGIVA.

ARCHS. ORAL BIOL , 16:835 - 843

17 - BARAKAT N.J , TOTO P.P. & CHOUKAS N.C (1969).

AGEING AND CELL RENEWALL OF ORAL EPITHELIUM

JOURNAL PERIODONTOLOGY 40:599 - 602.

18 - LISTGARTEN M A. (1975).

SIMILARITY OF EPITHELIAL RELATIONS SHIPS IN THE GINGIVA-
OF RAT, AND MAN

J PERIODONTOL. NOV PP 667-680.

19 - GLICKMAN I. (1980)

PERIODONTOLOGIA CLINICA 4^a ED.

MEXICO EDITORIAL INTERAMERICANA : 21 - 22.

20 - HAM ARTHUR W. (1970)

TRATADO DE HISTOLOGIA 6^a ED.

MEXICO EDITORIAL INTERAMERICANA : 75 - 83.

21 - JUNQUEIRA L.C. & CARNEIRO J. (1977)

HISTOLOGIA BASICA 1^a E.D.

MEXICO SALVAT EDITORES S.A. : 42 - 47

22.- DOWNIE W. N. (1977)

DESCRIPTIVE AND INFERENTIAL STATISTICS

HARPER & ROWN E.D.