

CONCENTRACION Y BIOSINTESIS DE PROTEINAS TOTALES Y  
COLAGENICAS EN TEJIDO GINGIVAL HUMANO.  
ACTIVIDAD COLAGENOLITICA EN FLUIDO CREVICULAR GINGIVAL.

Por

C.D. Enriqueta Bello Maldonado

TESIS

Presentada como requisito para obtener el Grado de  
Maestría en Odontología

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

1984

**BELLO  
MALDONADO  
ENRIQUETA**

**TESIS**



**1984**



**K(1) UNAM**

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



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

T E S I S

CONCENTRACION Y BIOSINTESIS DE PROTEINAS TOTALES Y  
COLAGENICAS EN TEJIDO GINGIVAL HUMANO.  
ACTIVIDAD COLAGENOLITICA EN FLUIDO CREVICULAR GINGIVAL.

Por

C.D. Enriqueta Bello Maldonado

1984



CONCENTRACION Y BIOSINTESIS DE PROTEINAS TOTALES Y  
COLAGENICAS EN TEJIDO GINGIVAL HUMANO.  
ACTIVIDAD COLAGENOLITICA EN FLUIDO CREVICULAR GINGIVAL.

Aprobado por:

DR. ANTONIO ZIMBRON LEVY

DR. ROGELIO REY BOSCH

C.D.M.O. FILIBERTO ENRIQUEZ HABIB

C.D.M.O. MANUEL SAAVEDRA GARCIA

DR. LINO DIAZ DE LEON HERNANDEZ

Director de la tesis

El trabajo experimental de esta Tesis se llevó a cabo en el Departamento de Biología del Desarrollo del Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M., bajo la Dirección del Dr. Lino Díaz de León Hernández.

A G R A D E C I M I E N T O S

AL DEPARTAMENTO DE PARODONCIA DE LA DIVISION DE ESTUDIOS  
DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGIA, U.N.A.M.

AL DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA DEL DESARROLLO  
DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS DE LA U.N.A.M.

AL DEPARTAMENTO DE BECAS DE LA DIRECCION GENERAL  
DE ASUNTOS DEL PERSONAL ACADEMICO, U.N.A.M.

AL C.D.M.O. FILIBERTO ENRIQUEZ HABIB.

Por el apoyo y estímulo recibidos  
durante el desarrollo de esta Tesis  
y como muestra de un gran afecto.

AL DR. LINO DIAZ DE LEON HERNANDEZ

A quien agradezco sinceramente la Oportunidad,  
la Dirección, Asesoría y Orientación en la  
Realización de esta Tesis.

A LA M.EN C, HORTENSIA SOTO TREJO

a quien agradezco muy especialmente  
todas sus enseñanzas en las prácticas  
del laboratorio durante la realización  
de esta Tesis.



Agradezco también sinceramente por la ayuda recibida durante la realización de esta Tesis a:

DR. ANTONIO ZIMBRON LEVY

Director de la Facultad de Odontología

DR. ROGELIO REY BOSCH

Jefe de la División de Estudios de  
Posgrado, Facultad de Odontología,  
U.N.A.M.

Con todo cariño a mi MADRE

"A TODA MI FAMILIA"

A MIS AMIGOS

Muy especialmente agradezo  
a la Sra. Yolanda Sánchez  
por el Manuscrito de la Tesis.

# I N D I C E

|   | Página |
|---|--------|
| INTRODUCCION -----                          | 1      |
| Características Generales de la Colágena -- | 4      |
| Biosíntesis de la Colágena -----            | 12     |
| Colagenasas -----                           | 16     |
| Revisión Bibliográfica -----                | 19     |
| <br>  |        |
| OBJETIVOS -----                             | 29     |
| <br>  |        |
| MATERIALES -----                            | 30     |
| <br>  |        |
| METODOS -----                               | 32     |
| <br>  |        |
| RESULTADOS -----                            | 42     |
| <br>  |        |
| ESTUDIOS HISTOLOGICOS -----                 | 64     |
| <br>  |        |
| DISCUSION -----                             | 69     |
| <br>  |        |
| RESUMEN -----                               | 80     |
| <br>  |        |
| CONCLUSIONES -----                          | 82     |
| <br>  |        |
| BIBLIOGRAFIA -----                          | 84     |

## I N T R O D U C C I O N

El estudio de los componentes macromoleculares del tejido conjuntivo gingival, así como los mecanismos patogénicos que intervienen en los diferentes estadios de la enfermedad periodontal, ha tenido gran avance en los últimos años. Se sabe que la colágena y los proteoglicanos son los componentes principales del tejido conjuntivo de la encía.

Las fibras de colágena tienen una disposición altamente organizada de acuerdo a su función, clasificándose en diferentes grupos de acuerdo a su localización, origen e inserción. Proveen la fuerza tensil al margen gingival y a la encía insertada, necesaria para soportar las fuerzas de masticación; mantienen unido el tejido conjuntivo de la encía al diente y sirven como barrera para evitar que migre la adherencia epitelial.

La colágena gingival tiene un alto grado de renovación poco común en otras partes del organismo, aún cuando se compara con la piel (Page & Ammons, 1974). El componente colagénico de la encía normal ha sido estudiado por análisis cualitativo con digestiones de Bromuro de Cianógeno (CNBr), para determinar el tipo de colágena existente (Ballard J. Butter, 1974, Dabbous & Brinkley, 1977), e indicaron que consiste predominantemente de colágena tipo I y pequeñas cantida-

Golub et al., 1971). El flujo del fluido crevicular se asocia con el grado de inflamación del tejido conjuntivo debido a la presencia de células inflamatorias y a la degradación de las fibras de colágena. Tomando en cuenta que la colágena constituye un porcentaje importante de los tejidos duros y blandos del periodonto (Melcher & Eastoe, 1969) y que la pérdida de colágena es una de las características tempranas y la más importante de la enfermedad periodontal (Page & Schroeder, 1976), se han realizado múltiples estudios en cuanto a la actividad de colagenasa en la encía y en el fluido crevicular. Las colagenasas son las únicas enzimas capaces de degradar la colágena nativa a un pH y temperatura fisiológicas (Barret 1972, Robertson & Simpson, 1976). Pueden originarse de los neutrófilos (Lazarus et al., 1968), de los macrófagos (Werb & Gordon, 1975), de los fibroblastos (Bikedal-Hansen et al. 1976) y de las células epiteliales (Fullmer et al., 1969), así como también pueden tener un origen bacteriano (microorganismos de la placa dento-bacteriana), Bacteroides melaninogenicus (Gibbons & MacDonald, 1961) y el Clostridium histolyticum (Alfano et al., 1974). La actividad colagenolítica en el fluido crevicular gingival ha sido utilizada como un medio de diagnóstico en cuanto a la severidad de la inflamación gingival y periodontal (Golub & Kleinberg, 1976).

## CARACTERISTICAS GENERALES DE LA COLAGENA.

COLAGENA. La colágena es una proteína estructural fibrosa y una de las más abundantes en los mamíferos. El término colágena no se refiere a una proteína específica, sino que es el nombre genérico que se ha dado a una familia de proteínas que aún cuando comparten ciertas características, se asocian de diferente manera formando un grupo variado desde el punto de vista genético.

Se ha establecido que las fibras de colágena son polímeros compuestos de la agregación repetida de monómeros, llamados tropocolágena. La tropocolágena está compuesta de tres cadenas alfa con aproximadamente 1000 a 1050 aminoácidos en cada una de ellas. Estas cadenas se encuentran en forma de  $\alpha$  hélice, las cuales se unen unas con otras durante la fibrogénesis a través de enlaces covalentes.

Un análisis de la composición de aminoácidos de una preparación de tropocolágena pura obtenida de la piel humana, muestra varias características sobresalientes:

- 1.º Un contenido alto de glicina (33%) alanina (12%) prolina (13%).
2. Bajo contenido de cisteína y tirosina.
3. Ausencia de triptofano.

4. Presencia de hidroxilisina (6%) e hidroxiprolina (9%-11%).

La glicina representa el 33% de todos los aminoácidos, lo cual permite que cada tercer aminoácido de la cadena polipeptídica sea glicina. La colágena puede ser considerada como un polímero de unidades tripeptídicas con la fórmula Gly-X-Y: La "X" corresponde frecuentemente a prolina y la "Y" a hidroxiprolina, aminoácido originado de la hidroxilación de la prolina. Ambos iminoácidos por su estructura cíclica limitan la rotación de las cadenas polipeptídicas.

La ausencia de cisteína en la colágena madura previene la formación de puentes disulfuro tanto inter como intramoleculares, excepto en la colágena tipo III en donde se ha demostrado la presencia de cisteína y este tipo de enlaces. La presencia de hidroxilisina originada por la hidroxilación de ciertos residuos de lisina, la cual se presenta raramente en otras proteínas, explica la pequeña cantidad de carbohidrato en colágena (galactosa o glucosil galactosa) que se une solamente al grupo hidroxilo de hidroxilisina.

El monómero de tropocolágena consiste de tres cadenas polipeptídicas o subunidades ( $\alpha$ ) que están enrolladas dentro de una estructura helicoidal rígida. Las tres cadenas son paralelas, cada cadena  $\alpha$  tiene un giro hacia la derecha y las

tres cadenas se enrollan en una superhélice que tiene un giro hacia la izquierda y se extiende en la longitud total del monómero, el cual tiene un peso molecular de aproximadamente 300 000 daltones, 300 nm (nanómetros) de longitud y 1.5 nm de diámetro.

En los espacios extracelulares se asocia con otras moléculas de colágena por unión terminal cabeza-cola formando microfibrillas en un arreglo conocido como "quarter staggered" con una periodicidad de 640 Å. Las moléculas de tropocolágena se unen con otras para formar fibrillas, fibras y haces de fibras.

#### HETEROGENEIDAD MOLECULAR DE LA COLAGENA.

La colágena no es el nombre de una proteína específica simple sino más bien es un término genérico que abarca muchos tipos de moléculas que pueden agregarse en los tejidos en varias formas y también en asociación con diferentes clases de moléculas. Por lo tanto la colágena puede ser examinada a tres diferentes niveles de organización:

- a) Estructura primaria.
- b) Tipo de agregación extracelular.
- c) Interacciones con otras macromoléculas.



Las células de los organismos superiores contienen un cierto número de genes estructurales para colágena. Actualmente no se ha determinado el potencial total genético para la síntesis de colágena, pero se sabe que existen por lo menos cinco tipos moleculares distintos para colágena en los tejidos de vertebrados. Cada tipo de colágena es diferente con respecto a la composición de sus cadenas y la estructura primaria de la constitución de sus cadenas  $\alpha$ . Estos datos indican que la expresión de los genes de colágena es selectiva en la mayoría de las células, resultando en un grado de especificidad respecto a los tipos de colágena prevalentes en varios tejidos.

En la Tabla I se presentan los diferentes tipos de colágena reportados en la literatura.

A continuación se describen las características sobresalientes de los distintos tipos:

Colágena tipo I: Es el tipo predominante en el organismo y se localiza en los tejidos en donde la fuerza y rigidez son necesarias, y se requiere de extensibilidad limitada, como por ejemplo: tendón, hueso, dentina, esclera y en las capas más profundas de piel y arterias. Generalmente aparece como fibras largas, compactas y de diámetros variables. Sin embargo, en la córnea toma forma de fibrillas finas de un diámetro

TABLA I

COLAGENAS QUE SON DIFERENTES GENETICA Y ESTRUCTURALMENTE

| COLAGENA  | CELULA  | DISTRIBUCION EN LOS TEJIDOS  |
|---|---|--|
| Tipo I<br>( $\alpha_1(I)$ ) <sub>2</sub> $\alpha_2$ | Fibroblastos<br>Osteoblastos<br>Odontoblastos<br>Cementoblastos | Hueso, tendón, piel, pulmón,<br>hígado, paredes arteriales,<br>pared uterina, encía, dentina,<br>cemento radicular, ligamento<br>periodontal, dentina, tendón,<br>tumores. |
| Tipo I Trímero<br>( $\alpha_1(I)$ ) <sub>3</sub>    | "   | Dentina, tendón, tumores, teji-<br>dos embrionarios, pulmón, etc.  |
| Tipo II<br>( $\alpha_1(II)$ ) <sub>3</sub>          | Condroblastos   | Pulmón, cartilago, hueso, es-<br>clera, membrana sinovial.   |
| Tipo III<br>( $\alpha_1(III)$ ) <sub>3</sub>        | Células Músculo<br>liso   | Vasos sanguíneos, liomas uteri-<br>nos, piel de fetos, órganos in-<br>ternos, tejidos de cicatriza-<br>ción, encía.  |
| Tipo IV<br>( $\alpha_1(IV)$ ) <sub>3</sub>          | Células endote-<br>liales                                       | Membranas basales.   |
| Tipo V<br>(A B <sub>2</sub> )                       | Células de los<br>miotúbulos                                    | Células de teratocarcinomas,<br>placenta, corión y líquido<br>amniótico.   |

uniforme debido quizá al mayor número de residuos de hexosa que se encuentran presentes en comparación con otros tejidos que contienen tipo I. Tiene un peso molecular aparente de -- 95,000 daltones.

Colágena tipo II: Este tipo de colágena se presenta generalmente como fibrillas finas en los tejidos con una alta concentración de proteoglicanos y tiene un contenido relativamente alto de hidroxilisina e hidroxilisina glicosilada. La interacción de estos dos componentes junto con el contenido de agua, provee una estructura con deformabilidad limitada capaz de resistir la compresión tal como es requerido en el fibrocartílago y en el humor vítreo del ojo. La concentración relativamente alta de hexosas en el tipo II pudiera determinar el pequeño diámetro de las fibras encontradas en esta estructura. Su peso molecular aparente es de 95,000 daltones.

Colágena tipo III: Este tipo se encuentra invariablemente asociado a la presencia de colágena tipo I, pero en contraste a ésta se presenta como fibrillas muy finas, las cuales se correlacionan con las de reticulina definidas histológicamente cuando se observan al microscopio de luz en tinciones de fragmentos de tejido conjuntivo con soluciones alcalinas de sales de plata. Se encuentran frecuentemente por debajo de la membrana basal y contribuyen al soporte del estroma del tejido epitelial. Al ser muy delgadas las fibrillas de -

"reticulina", se teñían menos que las fibras de colágena tipo I, por lo tanto se pensaba que diferían de éstas; sin embargo, se cree que la mayoría de reticulina es colágena tipo III.

Tiende a localizarse en los tejidos más elásticos tales como aorta y algunos órganos internos y en las capas más superficiales. Está frecuentemente adyacente a las membranas basales tales como endotelio vascular y subepitelio de la piel. Esto es importante en la respuesta al daño en heridas tisulares, ya que existen evidencias que sugieren que el tipo III promueve la agregación de las plaquetas. Normalmente las plaquetas se encuentran en contacto con la colágena tipo III y con membranas basales que contienen colágena tipo IV. Se ha sugerido que en el daño tisular tal como ocurre en las heridas de piel y/o del endotelio vascular, la agregación de plaquetas libera factores estimuladores de la proliferación de fibroblastos y/o células de músculo liso. Tal daño tisular expondría por supuesto, las plaquetas a la colágena tipo III subyacente. Es alta en hidroxiprolina y baja en hidroxilisina con puentes de disulfuro intercadena, tiene un peso molecular aparente de 95,000 daltones.

Colágena tipo IV: La función de la colágena tipo IV puede estar relacionada con la retención de los extremos amino y carboxi terminal. Esto le permite permanecer relativa-

mente más soluble en el espacio extracelular, lo cual favorece la interacción con los componentes glicoproteicos para formar una membrana más que una fibrilla. Los residuos de cisteína encontrados en las extensiones peptídicas permitiría la interacción con los residuos correspondientes en las glicoproteínas para formar puentes disulfuro, permitiendo un aumento más elevado en la estabilidad estructural. Es notable que estas estructuras no son susceptibles a la mayoría de las colagenasas de mamíferos.

Las membranas por sí mismas difieren entre sí tanto en estructura como en función. La membrana basal glomerular del riñón, el endotelio vascular y la lámina basal subepitelial tienen propiedades de filtración mientras que la del cristalino tiene las propiedades elásticas necesarias para su implicación en los fenómenos de acomodación del cristalino. La colágena tipo IV tiene un alto contenido de hidroxilisina glicosilada, presenta regiones globulares y con un peso molecular aparente de 140,000 daltones.

Colágena tipo V: Este tipo de colágena es la más recientemente descubierta y por lo tanto no se ha definido exactamente su función; se ha encontrado en células de teratocarcinomas, en placenta, corión y líquido amniótico. Fue descrita e identificada por primera vez en tejidos ricos en membranas basales. Se le ha definido como la colágena "pericelular". -

Tiene un peso molecular aparente de 104,000 daltones para las cadenas A y de 99,000 daltones para las cadenas B.

### BIOSINTESIS DE LA COLAGENA.

La síntesis de esta proteína que constituye el componente principal de la mayor parte de los tejidos conjuntivos en el organismo, es muy compleja. Se han realizado numerosos estudios e investigaciones para llegar a conocer los mecanismos involucrados en la biosíntesis y secreción de esta proteína estructural, la cual se distingue de otras debido a que sufre un gran número de modificaciones postraduccionales, poco comunes en otras proteínas.

Podemos dividir los diferentes pasos involucrados en la síntesis de la colágena en: eventos intracelulares y eventos extracelulares.

#### Eventos Intracelulares.

El primer paso en la formación de la cadena polipeptídica es la transcripción y traducción de los ARN mensajeros - que codifican para colágena, los cuales se unen a los polisomas unidos al retículo endoplásmico rugoso (RER) de la célula, con las cadenas nacientes vectorialmente orientadas hacia la cisterna de este organelo subcelular. La incorporación de am

noácidos en las cadenas nacientes vía ARN de transferencia, procede por los mecanismos comunes de la síntesis de proteínas, con la excepción de hidroxiprolina e hidroxilisina, los cuales se derivan por la hidroxilación enzimática de residuos específicos de prolina y lisina durante el crecimiento de la cadena polipeptídica. Las dos enzimas involucradas en estas reacciones son la prolil-hidroxilasa y la lisil-hidroxilasa que se localizan dentro del RER y requieren oxígeno,  $\alpha$ -cetoglutaratato,  $Fe^{+2}$  y ácido ascórbico como cofactores para llevar a cabo dichas hidroxilaciones.

Una vez realizada la hidroxilación de ciertos residuos de prolina y lisina, se lleva a cabo la glicosilación de algunos residuos de hidroxilisina en la molécula de colágena por medio de las enzimas glucosil y galactosil transferasas que catalizan la adición de galactosa y después glucosa formando glucosil-galactosil-hidroxilisina en las cadenas polipeptídicas nacientes liberadas de los polisomas y que pasan a las cisternas del RER.

Esta molécula que es un precursor soluble de la colágena se denomina procolágena, la cual tiene dos extremos no helicoidales denominados aminoterminal y carboxiterminal. El extremo carboxiterminal también se glicosila posteriormente y se forman puentes disulfuro inter e intracadena en las tres regiones carboxiterminales y exclusivamente intracadena en las regiones amino terminales.

La procolágena pasa al aparato de Golgi y es transportada en vesículas secretoras hacia la superficie celular donde son secretadas al espacio extracelular. El movimiento extracelular y la secreción requieren de energía y de un sistema microtubular para la translocación de los elementos vacuolares. Una vez que es secretada la procolágena de la célula, se llevan a cabo los eventos extracelulares.

#### Eventos Extracelulares.

Existen enzimas que transforman la molécula de procolágena, la cual tiene un peso molecular de aproximadamente 450,000 daltones, a colágena. Estas enzimas denominadas procolágena peptidasas, inciden los extremos amino y carboxilo terminales generando tropocolágena, que contiene telopéptidos y tiene un peso molecular aproximado de 300,000 daltones.

Las moléculas de tropocolágena se agregan en el espacio extracelular y se unen covalentemente entre sí formando fibras durante la fibrillogénesis. Con este fin, el grupo  $\epsilon$ -amino de ciertos residuos de lisina o hidroxilisina, es deaminado oxidativamente por medio de la enzima lisil oxidasa, dando origen a la formación de aldehidos en cadenas vecinas, lo cual permite formar uniones estables inter e intracadena por una condensación aldólica y las uniones entre moléculas de colágena forman grupos aldehídos  $\alpha$  -  $\beta$  insaturados



que reaccionan posteriormente con otros grupos  $\xi$ -amino de lisina e hidroxilisina, para formar bases de Schiff.

La Revisión Bibliográfica realizada para el desarrollo de las características generales de la colágena, diferentes tipos de colágena y biosíntesis de la colágena fueron: Bornstein & Sage 1978; Díaz de León 1984; Goldberg & Rabino-  
vitch 1977; Jenkins 1978; Pérez Tamayo 1978; Prockop & Guzmán 1977; Rojkind et al 1972; Woolley & Evanson 1980.

## C O L A G E N A S A S

Las colagenasas son enzimas específicas capaces de degradar a la colágena en su estado nativo. En 1962, Gross & Lapiere demostraron la existencia de la primera colagenasa animal en la cola del renacuajo durante su metamorfosis. Tres años después, Fullmer & Gibson en 1965 demostraron por vez primera la presencia de colagenasa en tejidos humanos (explantes de encía).

Las enzimas colagenolíticas se han obtenido de tejidos y cultivos celulares de una gran variedad de especies animales, en los cuales la colágena es metabolizada bajo condiciones fisiológicas y patológicas (Woolley & Evanson, 1980). Estas enzimas tienen propiedades fundamentales en común: todas tienen un pH óptimo neutro de 8.5, y no son almacenadas, sino que se sintetizan de novo y son secretadas tanto en forma activa o como precursores inactivos al espacio extracelular y henden a la molécula de colágena nativa en un sitio específico a 3/4 de la longitud del extremo AMINO-TERMINAL, generando un fragmento largo denominado TC<sub>A</sub> y el 1/4 de la molécula representado por un fragmento corto denominado TC<sub>B</sub>.

Todas las colagenasas son metalo-enzimas, es decir, requieren de iones calcio para su actividad (Fullmer et al. 1972) y son inhibidas por agentes quelantes de este ión, ta-

les como el etilen-diamino-tetra-acético (EDTA), 1, 10-orto-fenantrolina y otros compuestos como la cisteína. Se han reportado pesos moleculares aproximados para las colagenasas - que varían entre 25,000 y 60,000 daltones (Harper, 1980):

También se ha demostrado que las colagenasas pueden - ser de origen tisular, por ejemplo: células epiteliales, en- cía humana, piel, hueso, córnea, líquido sinovial reumatoide humano, carcinoma epidermoide, granulomas inducidos en conejo, hueso de cobayo, granulocitos humanos (PMN), etc., (Harris & Krane, 1974), así como de origen bacteriano. Los microorganismos que producen colagenasa son el Bacteroide melaninogenicus (Gibbons & MacDonald, 1961), y el Clostridium histolyticum - (Alfano et al., 1974). Las colagenasas bacterianas difieren - de las tisulares en que degradan a la molécula en cualquier - sitio en que exista la secuencia Gly-Pro-Y, reduciendo la ca- dena polipeptídica a pequeños fragmentos dializables, mientras que las colagenasas de vertebrado únicamente reconocen la se- cuencia Gli-Ileu localizada a 3/4 de longitud de la cadena.

Se ha demostrado la presencia de un gran número de in- hibidores de actividad colagenolítica en el suero, (Eisen et al., 1971), extractos tisulares y en medios de cultivo celu- lares o tisulares. Entre los más estudiados podemos citar: la  $\alpha_2$ -Macroglobulina (Ohlson et al., 1973), que es el inhi- bidor sérico más importante, la  $\beta_1$ -anticolagenasa y la - -

$\alpha$ 1-antitripsina. Por otra parte, se ha demostrado que existen diferentes sustancias capaces de estimular la síntesis y/o la liberación de colagenasa como son: la colchicina, la citocalisina B, la dexametasona, las endotoxinas y las linfoquinas (Harper, 1980).

Durante la enfermedad periodontal crónica ocurren cambios importantes en cuanto a la actividad metabólica del surco gingival, así como en la producción, composición y flujo del fluido crevicular gingival, (Golub et al., 1976). Algunos investigadores han demostrado una disminución significativa en el contenido de colágena de los tejidos afectados, durante la inflamación gingival y periodontal (Robertson & Simpson, 1976). La colagenasa y las proteasas neutras juegan un papel trascendental en los mecanismos de degradación de la colágena (Cimasoni, Ishikawa & Jaccard, 1977). Se ha demostrado que la actividad de la colagenasa en el fluido crevicular gingival está relacionada con la severidad de la inflamación gingival y periodontal (Sueda & Cimasoni, 1968; Golub et al., 1976).

## R E V I S I O N      B Í B L I O G R A F I C A

Harold M. Fullmer y William Gibson en 1966 realizaron pruebas de actividad colagenolítica en más de 100 fragmentos de encía humana obtenida de pacientes con enfermedad periodontal. Utilizaron geles de colágena (Gross y Lapiere 1962) a los cuales les colocaban fragmentos de tejido gingival de 1 a 2 mm, para ver la capacidad que tenían de degradarlos a una temperatura de 37°C durante 72 a 96 hrs. Después de 24 hrs, observaron zonas claras alrededor de los fragmentos de tejido gingival, por lo cual fué evidente que existía actividad colagenolítica; las zonas claras se incrementaban con el tiempo. Estos experimentos indicaron que el tejido gingival enfermo producía, cuando se realizaban cultivos in vitro, un factor colagenolítico activo a 37°C.

Page, Ammons, Schectman y Dillingham en 1974 realizaron un estudio de la arquitectura de los haces de fibras de colágena de la encía normal en marmosetas adultas-jóvenes - (Saguimus oedipus). Los animales no presentaban manifestaciones clínicas o histológicas de enfermedad inflamatoria gingival. Se observaron además de los grupos de fibras gingivales ya descritos otros grupos de fibras: las fibras semicirculares procedentes del cemento a nivel de la unión amelocementaria atravesando la encía marginal en vestibular y lingual, - insertándose en el lado opuesto en una posición comparable -

del otro lado del diente a un nivel justamente por debajo de las fibras circulares; el otro grupo de fibras observadas - fueron las transgingivales, las cuales salen desde el cemento de un diente y atraviesan la encía marginal libre del diente adyacente y las fibras intergingivales que corren a lo largo de la encía marginal libre, tanto por vestibular como por lingual. Debido a la existencia de estos grupos de fibras, - existe una mayor interdependencia entre los diferentes segmentos de la encía.

En 1976 Sampath, Narayanan y Page estudiaron la síntesis de proteínas colagénicas utilizando aminoácidos radiactivos en fibroblastos obtenidos de encía humana sana y con enfermedad periodontal. Los fibroblastos de tejido sano sintetizaron ambos tipos de colágena I y III. El tipo I fué el predominante, constituyendo un 70 a 95% y el tipo III un 5 a 30%. Los fibroblastos de encía con enfermedad periodontal sintetizaron cantidades comparables de proteínas colagénicas a las células normales. Sin embargo, el producto predominante fué el tipo I y las moléculas de colágena tipo III no estaban presentes en cantidades suficientes para su detección.

Sodek en 1977 realizó estudios sobre la actividad metabólica de la colágena en tejidos periodontales del molar de rata, midiendo la incorporación de  $^3\text{H}$ -prolina a hidroxiprolina. La velocidad de síntesis de colágena en el ligamento pe-

riodontal fué dos veces más rápida que en la encía insertada, cuatro veces más rápida que la piel y seis veces mayor que - en el hueso alveolar, correspondiendo al ligamento periodontal el mayor grado de incorporación de prolina radiactiva en la colágena madura, la cual era cinco veces mayor que en la encía insertada, seis veces más que en el hueso y quince veces más que en la piel. Se calculó una vida media de la colágena recién sintetizada de 24 minutos para el hueso alveolar, de 40 minutos para el ligamento periodontal y de 80 minutos para la encía insertada, la vida media de colágena en la piel fué de 360 minutos. La vida media para el recambio de la colágena madura fué de 1 día para el ligamento periodontal, de 5 días para la encía, de 6 días para el hueso alveolar y de 15 días para la piel.

Rose y Robertson en 1977 evaluaron la actividad colagenolítica en cultivos de fibroblastos gingivales humanos obtenidos de pacientes con enfermedad periodontal (periodontitis), fibromatosis e hiperplasia dilatónica. Determinaron que existía actividad colagenolítica fibroblástica, la cual aumentaba en ausencia de suero y se inhibía en presencia de éste y que implicaba una relación directa con el recambio normal de colágena y una disrupción de este equilibrio en la enfermedad periodontal.

Narayanan, Page y Kuzan en 1978 compararon la síntesis

de colágena de fibroblastos obtenidos de encía humana normal con fibroblastos de encía con enfermedad periodontal crónica. Las células fueron marcadas con aminoácidos radiactivos para caracterizar la síntesis de proteínas colagénicas por fraccionamiento con NaCl, por cromatografía en CM-celulosa y análisis de péptidos obtenidos con Bromuro de Cianógeno. Se estudiaron 14 líneas celulares, 6 de encía sana, 6 de encía con periodontitis crónica y 2 de encía con inflamación aguda. La mayoría de las líneas celulares sintetizaron predominantemente colágena tipo I. La colágena tipo III fué un producto mínimo para todas las líneas celulares excepto para uno de los tejidos inflamados.

Posteriormente, Orłowski en 1978 estudió el metabolismo de la colágena gingival en ratas, midiendo el recambio del tejido gingival determinando la incorporación de prolina tritiada y su degradación tanto en prolina como en hidroxiprolina, durante 18 días después de su administración. Encontró que la actividad específica de la colágena fué mucho mayor en los tejidos orales que en la piel y que la proporción relativa de radiactividad en la colágena aumentó de 24% en el 2º día al 82% en el día 18 después de la inyección, mientras que al mismo tiempo hubo una rápida disminución en la actividad de los componentes no colagénicos. En base a estos resultados, Orłowski sugirió en este estudio que existe una variación marcada en la actividad metabólica de la encía, de acuerdo



do a la región analizada.

Hardy, Limeback, Sodek y Brussette en 1978 realizaron un estudio con el objeto de determinar la naturaleza y síntesis de colágena de fibroblastos obtenidos del ligamento periodontal de monos, Macaca fascicularis, de 2 a 3 años de edad. Observaron que sintetizaban cantidades significativas de colágena tipo I y tipo III y que la producción de colágena tipo III fue de aproximadamente el 20% de la colágena total sintetizada, demostrando que los fibroblastos del ligamento periodontal in vitro, manifiestan las mismas capacidades de síntesis de colágena que los fibroblastos del ligamento periodontal in vivo.

Woolley, Akroyd, Evanson, Soames y Davies en 1978 caracterizaron la colagenasa neutra y los inhibidores del suero en cultivos de tejido gingival de perros. Demostraron que la actividad colagenolítica liberada en los cultivos tenía todas las propiedades de una colagenasa verdadera: era dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$ , se activaba a un pH neutro y a 25°C degradaba la molécula de colágena, mostró un peso molecular aparente de 35,000 daltones y sus inhibidores séricos fueron la  $\alpha 2$ -macroglobulina y  $\beta_1$ -anticolagenasa.

Uitto, Turto y Saxén en 1978 realizaron la extracción de colagenasa de tejido gingival de pacientes con enfermedad

periodontal, encontraron que la colagenasa obtenida era de origen tisular y estaba presente principalmente en forma latente, la cual fué activada por la exposición breve a tripsina.

Uitto y Raeste en 1978 estudiaron la activación de colagenasa latente en leucocitos humanos y fluido crevicular gingival, por la placa dento-bacteriana utilizando colágena radiactiva soluble como substrato. Obtuvieron fluido crevicular gingival de 38 individuos con encía sana y de 26 pacientes con enfermedad periodontal crónica. La colagenasa presente en fluido crevicular de encías inflamadas, era colagenasa en forma activa y la obtenida del fluido de encía sana fué en forma latente, la cual fue activada con tripsina o por la placa bacteriana. La placa dento-bacteriana también estimuló a cultivos de leucocitos para liberar colagenasa en las formas latente y activa.

Kowashi, Jaccard y Cimasoni en 1979 midieron la actividad de colagenasa libre y proteasas neutras en lavados del surco gingival de gingivitis experimental en humanos durante un periodo de 21 días. La concentración de colagenasa y proteasas neutras se incrementó significativamente durante la abstención del cepillado dental, así como también la actividad específica de las enzimas. La actividad enzimática de la colagenasa y proteasas neutras correlacionadas al aumento de leu-

cocitos polimorfonucleares neutrófilos, sugiere un incremento durante el período de gingivitis experimental. La electroforesis en geles de poliacrilamida de los productos de digestión de colágena nativa mezclada con lavados gingivales concentrados, mostraron que la colagenasa del surco gingival es predominantemente de origen tisular. La inhibición con suero y EDTA en este estudio, sugiere una contribución mínima de colagenasa bacteriana.

Page, Narayanan y Schroeder en 1980, realizaron un estudio en perros beagles adultos, referente a la composición y síntesis de colágena en encía normal y encía con periodontitis espontánea. En los perros beagles, la periodontitis presenta algunas características semejantes a las que se manifiestan en humanos, pero en otras difiere notablemente. En los perros beagles, la periodontitis crónica espontánea se caracteriza clínicamente por una conversión gradual del tejido gingival marginal normal a tejido hiperplásico inflamado agudamente y no se presenta la fibrosis que ocurre en humanos. Existe un infiltrado inflamatorio denso y cerca de 6 veces menos colágena que en el tejido normal cuando existe poco tejido granulomatoso. De la población celular total, los fibroblastos constituyen un 5%, los linfocitos 44%, las células plasmáticas un 43% y los polimorfonucleares neutrófilos (PMN) 5%. Cuando existen cantidades extensas de tejido granulomato

so en estadios avanzados de la enfermedad periodontal (pérdida ósea, bolsas periodontales, etc.), el contenido de colágena disminuye de 4 a 5 veces en relación al tejido sano y los fibroblastos constituyen un 12%, los linfocitos un 40%, las células plasmáticas un 40% y los PMN un 21% del contenido celular. No se observaron alteraciones en los fibroblastos como ocurre en el hombre y otras especies animales. Estudios de incorporación de aminoácidos radiactivos demostraron que la síntesis de proteínas totales y colagénicas fue mucho mayor en los cultivos que contenían tejidos hiperplásicos enfermos que en aquellos que contenían tejido sano.

Narayanan, Page y Meyers en 1980 realizaron la extracción de colágena de tejido gingival humano enfermo, para estudiar las alteraciones en cuanto al tipo de colágena existente en dichos tejidos con enfermedad periodontal. Sus datos demostraron que el tejido conjuntivo de la encía humana clínicamente inflamada, contenía colágenas tipo I, tipo III, AB y trímero de  $\alpha 1(I)$ , las cuales fueron caracterizadas de acuerdo a su solubilidad en NaCl, por migración electroforética y de acuerdo a su elución en columnas de cromatografía por intercambio iónico, así como el patrón de péptidos obtenidos con Bromuro de Cianógeno y su composición de aminoácidos. Del total de las colágenas extraídas, la colágena tipo I fué del 87% siendo el componente predominante, el 8% del tipo AB los porcentajes correspondientes al tipo III y el trímero de  $\alpha 1(I)$  fueron 4% y

2% del total respectivamente.

Simpson, Makler y Mailman en 1980, identificaron la colagenasa de cultivos de células mononucleares sanguíneas (linfocitos B y T). Estos estudios establecieron que tanto las células mononucleares sanguíneas, así como subpoblaciones de las mismas, tienen la capacidad de producir colagenasa, lo cual sugiere que la presencia de linfocitos en la enfermedad periodontal inflamatoria puede jugar un papel importante en la degradación de la colágena durante el desarrollo de la misma.

Geiger y Harper en 1980 realizaron una investigación respecto a la liberación de colagenasa gingival humana y la degradación de colágena endógena en explantes gingivales con enfermedad periodontal en diferentes estadios de inflamación gingival. En estos estudios se encontró que la actividad colagenolítica, así como la actividad de proteasas inespecíficas - era significativamente mayor en encías con inflamación severa cuando se comparaban con encías moderadamente inflamadas y - con tejido gingival sano, lo cual fué demostrado por medio de estudios electroforéticos de los productos de degradación en cultivos de tejido gingival con inflamación severa y moderada y en tejido sano. La liberación de hidroxiprolina de los tejidos en el medio de cultivo se encontró de 3 a 4 veces más incrementada en los casos de inflamación severa que en la infla

mación moderada.

Hammouda, Seif, Brinkley, Dabbous y Jurand en 1980 aislaron y caracterizaron péptidos de Bromuro de Cianógeno derivados de colágena gingival humana de pacientes con periodontitis crónica. Estos estudios revelaron la presencia de colágena tipo I y tipo III, siendo menor la cantidad de colágena tipo III que la presente en tejido sano. Además, observaron diferencias cualitativas y cuantitativas en la composición de aminoácidos de tejidos con enfermedad periodontal, respecto a los tejidos sanos.

Ubaidy, Janabi y Tai en 1981 estudiaron el efecto de la fenitoína sobre la actividad mitótica del tejido gingival humano y en cultivos de fibroblastos de rata, el cual fué medido cuantitativamente usando técnicas de autorradiografía con timidina tritiada. Se eliminó la encía hiperplásica de pacientes que ingerían fenitoína y se sujetó a autorradiografía mostrando un marcado incremento en la actividad mitótica de las células gingivales. El índice mitótico en cultivos de fibroblastos de rata fue mucho mayor en los tratados con fenitoína que en el control. Estos resultados están de acuerdo con otros estudios que sugieren que la fenitoína puede ser un factor determinante en la estimulación directa de la actividad mitótica y en la hiperplasia gingival observada en pacientes que ingieren este medicamento.

## O B J E T I V O S

Los objetivos de la presente investigación fueron determinar la capacidad de síntesis de proteínas totales y colagénicas, así como la concentración de colágena en fragmentos de tejido gingival humano de pacientes que presentaban enfermedad periodontal crónica (periodontitis), agrandamiento gingival de origen inflamatorio (placa-dentobacteriana), agrandamiento gingival por difenil-hidantoína, tejido gingival de zonas de erupción dentaria y un grupo de pacientes control con encía clínicamente sana.

Se efectuó la extracción y purificación de colágena a partir de piel de conejo, la cual fue acetilada posteriormente. Se realizaron ensayos de actividad colagenolítica con fluido crevicular gingival de pacientes con gingivitis, periodontitis y un grupo control con encía clínicamente sana, utilizando colágena soluble acetilada. También se tomaron biopsias para llevar a cabo estudios histológicos de las diferentes muestras de tejido gingival y de éste modo corroborar el diagnóstico clínico con los hallazgos morfológicos.

## M A T E R I A L E S

Para el exámen clínico se utilizaron: sillón dental, lámpara, espejo bucal, pinzas de curación, sonda milimetrada, gasas, algodón, jeringa triple (agua y aire) y portavasos.

### CIRUGIA PERIODONTAL.

Para la obtención de las muestras se utilizó el instrumental quirúrgico necesario para cada técnica implementada; en pacientes que requerían cirugía periodontal, ya sea por que presentaban agrandamiento gingival de tipo inflamatorio (placa-dentobacteriana), o bien producido por difenil-hidantoína, así como pacientes con enfermedad periodontal crónica (periodontitis), pacientes con zonas de erupción dentaria y un grupo control (tejido sano). Estas muestras se utilizaron para los estudios bioquímicos correspondientes.

### ACTIVIDAD COLAGENOLITICA.

Se preparó colágena acetilada con  $^3\text{H}$ -anhídrido acético (extraída a partir de piel de conejo).

Se utilizó fluido crevicular gingival de 52 pacientes con enfermedad periodontal crónica (gingivitis y periodonti-



tis) y un grupo de 7 pacientes con encía clínicamente sana.

#### REACTIVOS UTILIZADOS.

Todos los reactivos utilizados se obtuvieron de fuentes comerciales y del mejor grado de pureza existente. El medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) se obtuvo de Gibco Laboratories; la L-2,3,4,5-<sup>3</sup>H prolina (actividad específica: 139.1 Ci/mmol) de New England Nuclear Corp.; la estreptomicina y la penicilina G sódica cristalizada de los Laboratorios Lakeside; el fumarato de  $\beta$ -amino propionitrilo, la L-prolina y la L-hidroxiprolina de Sigma Chemical Corporation; los filtros de fibra de vidrio (34 AW) de Whatman Inc.; la cloramina T, el 4-dimetil-amino-benzaldehído, el reactivo de difenilamina, la ninhidrina y la pepsina cristalizados (100  $\mu$ m/mg) de Merck. Los líquidos de centelleo de Bray y tolueno-PPO se prepararon en el laboratorio.

## M E T O D O S

DETERMINACION DE PROLINA E HIDROXIPROLINA Y CONCENTRACION DE COLAGENA EN HIDROLIZADOS ACIDOS DE BIOPSIAS DE TEJIDO GINGIVAL HUMANO.

Se analizaron 6 muestras de tejido gingival sano; 2 obtenidas de zonas de erupción dentaria; 8 muestras correspondieron a pacientes con enfermedad periodontal crónica (periodontitis) y 14 pacientes con agrandamiento gingival inflamatorio. También se analizaron 11 muestras de agrandamiento gingival causado por difenil-hidantofna.

Para cuantificar prolina e hidroxiprolina, así como el contenido de colágena en las muestras analizadas, cada muestra de aproximadamente 80 a 100 mg. de tejido húmedo se secó en papel filtro. Se pesaron para determinar el peso del tejido húmedo, y se llevaron a peso seco (peso constante) por medio de deshidratación en un horno a 100°C durante 72 hrs. o más. Posteriormente, el tejido se hidrolizó en HCl 6N en ampollitas de vidrio selladas al vacío, las cuales se incubaron a 100°C durante 24 hrs.

Las muestras hidrolizadas se filtraron y se pusieron a secar para eliminar el exceso de HCl lavando los tubos varias veces con agua destilada y repitiendo el proceso de evaporación, las muestras evaporadas se resuspendieron en 5 ml.

de agua bidestilada y se tomaron alicuotas apropiadas para la determinación de prolina e hidroxiprolina.

#### DETERMINACION DE HIDROXIPROLINA

(Método de Woessner 1961).

Se tomaron alicuotas de 25  $\mu$ l y 50  $\mu$ l que se llevaron a un volúmen final de 2 ml con agua destilada, se les agregó 1.0 ml de solución de cloramina T\*, se agitaron las muestras y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente y en el mismo orden se agregó 1.0 ml de ácido perclórico+, se agitaron los tubos y se incubaron 5 min a temperatura ambiente. Se agregó 1.0 ml de para-dimetil-amino-benzaldehido\*\*, se agitaron vigorosamente y se incubaron a 60°C durante 20 min., después se enfriaron en agua corriente durante 5 min. Se determinó la absorbancia a 557 nm en un espectrofotómetro.

#### Soluciones Empleadas:

- \* Cloramina T solución 0.05 M.
- + Acido perclorico 3.15 M.
- \*\* Para-dimetil-amino-benzaldehido solución al 20% en metilcelosolve.

## DETERMINACION DE PROLINA

(Método de Trolly y Linsdley 1955).

Se tomaron alicuotas de 100  $\mu$ l de los hidrolizados y se llevaron a 3 ml con agua destilada, se adicionaron 3 ml de ácido acético glacial y 3 ml de solución de ninhidrina\* se agitaron vigorosamente y se incubaron en baño maría a ebullición durante 60 min. Se enfriaron en agua corriente y posteriormente se determinó la absorbancia a 515 nm.

\* Solución de ninhidrina

1.25 gr. de ninhidrina

30 ml. de ácido acético glacial

20 ml. de ácido fosfórico 6 M.

Biosíntesis de Proteínas Totales y Colagénicas en Tejido Gingival Humano.

Se evaluaron 20 muestras de tejido gingival de pacientes que requerían de cirugía periodontal:

- cuatro pacientes que presentaban agrandamiento gingival de tipo inflamatorio (placa bacteriana);
- cuatro pacientes con agrandamiento gingival causado por difenil-hidantoína (epilépticos);
- cuatro pacientes con enfermedad periodontal crónica (periodontitis) que necesitaban gingivoplastia;

- dos pacientes cuyo tejido se tomó de zonas de erupción dentaria.
- Un paciente control (tejido sano, en donde por la dificultad de obtener suficiente tejido para la biosíntesis, no se pudieron obtener más donadores).

Las muestras de tejido gingival se incubaron por periodos variables (2 y 4 hrs) en medio de cultivo Dulbeco (DMEM) el cual contenía además: ácido ascórbico, Fumarato de  $\beta$ -aminopropionitrilo, penicilina, estreptomycinina, prolina tritiada ( $^3\text{H-PRO}$ ) como marcador radiactivo según el método para cultivo de tejidos (Breitkreutz et al. 1979). El peso de los fragmentos de tejido varió entre 50 y 100 mg. Las muestras fueron secadas sobre papel filtro estéril para eliminar el exceso del medio de cultivo y se colocaron en frascos de vidrio de 20 ml que contenían 4 ml de medio de cultivo DMEM y se fragmentaron lo más pequeño posible. Después se adicionaron 20  $\mu\text{Ci}$ , de  $^3\text{H}$ -prolina y 50  $\mu\text{g/ml}$  de  $\beta$ -aminopropionitrilo para cada vial, (esto fue con el fin de evitar la formación de enlaces intra e intermoleculares en la colágena durante la biosíntesis. Además se agregaron 100  $\mu\text{g/ml}$  de ácido ascórbico para favorecer la hidroxilación de prolina y lisina y 100 U/ml de penicilina y 100  $\mu\text{g/ml}$  de estreptomycinina para evitar la contaminación por microorganismos.

Los viales se taparon ligeramente y se colocaron en un

agitador rotatorio a 100 revoluciones por minuto (rpm) en un incubador metabólico a 37°C en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub> durante un período de dos y cuatro horas. La reacción se terminó incubando las muestras a 4°C ó -20°C. Posteriormente, a cada vial se adicionaron 2 ml de ácido acético 1.5 N y se procedió a homogeneizar las muestras en un polytron (Brinkmann, Inst.). De los homogeneizados se tomaron alicuotas apropiadas para determinar la incorporación de <sup>3</sup>H-prolina en proteínas totales y en proteínas colagénicas.

#### Determinación de <sup>3</sup>H-Prolina incorporada en proteínas totales.

Se utilizó ácido tricloracético (TCA) al 8% como precipitante para la cuantificación de <sup>3</sup>H-prolina incorporada a proteínas totales. Se tomaron 200 µl de las muestras homogeneizadas y se llevaron a 1 ml con agua destilada, se le adicionaron 0.5 ml de solución decolorante (25 ml de NaOH 10 M, 15 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%, 250 mg de L-prolina y se aforó a 250 ml con agua destilada) y 1 ml de TCA al 25%. Las muestras se agitaron inmediatamente y se incubaron a 4°C durante 30 min. Después se filtraron por vacío a través de filtros de fibra de vidrio que se lavaron varias veces con TCA al 8%. Los filtros se colocaron en frascos de plástico y se les adicionaron 0.5 ml de H<sub>2</sub>O y 10 ml de líquido de centelleo de Bray. La radiactividad incorporada se determinó y cuantificó en un espectrofotómetro de centelleo líquido (Packard). Todas las

determinaciones se hicieron por duplicado para cada una de las muestras.

### Determinación de Colágena Radiactiva

La cuantificación de radiactividad incorporada en colágena se realizó sometiendo las muestras a digestión enzimática con pepsina (concentración final 1.0 mg/ml). Se tomaron 1.5 ml del homogeneizado inicial al cual se le agregó la pepsina (que se sabe degrada todas las proteínas excepto colágena nativa) y se incubó a 4°C durante 72 horas. Posteriormente, se homogenizaron nuevamente las muestras y se determinó la incorporación en colágena por precipitación con TCA al 8% como se describió para la determinación de síntesis de proteínas totales.

### Pruebas de Actividad Colagenolítica

La extracción y purificación de colágena a partir de piel de conejo (145.7 g), se realizó de acuerdo al método de Gross (1958). Se fragmentó la piel lo más pequeño posible y se deslipidizó con cloroformo y etanol. Posteriormente se filtró la piel en gasa y para eliminar el cloroformo y el etanol se lavó con ácido acético 0.5 M varias veces. Se sometió a digestión con pepsina (1 mg/ml) incubando a 4°C durante 72 horas con agitación constante. Después se centrifu-

gó a 18,000 rpm durante 30 min (rotor SS34) y el sobrenadante obtenido se precipitó con NaCl al 5% durante 24 horas. Inmediatamente se volvió a centrifugar a 16,000 rpm durante 40 minutos y el precipitado se resuspendió en ácido acético 2.5 M y se agitó a 4°C durante 48 horas. Después se dializó contra buffer de fosfatos 0.1 M, realizando varios cambios durante 24 hrs., y con agitación constante. Se centrifugó el dializado a 18,000 rpm durante 30 min y el sobrenadante se precipitó nuevamente con NaCl al 2% durante 24 hrs a 4°C. Se centrifugó a 18,000 rpm, 30 min a 4°C y el precipitado obtenido se resuspendió en ácido acético 0.5 M. Se dializó nuevamente contra buffer de fosfatos realizando varios cambios del buffer durante 24 hrs. Se centrifugó y el sobrenadante se dializó con  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.001 M para precipitar la colágena soluble con cambios del buffer cada 3 hrs durante 24 hrs. Se centrifugó y el precipitado obtenido se resuspendió en ácido acético 0.5 M y se dializó posteriormente contra ácido acético 0.5 M durante 48 hrs. Con cambios cada 3 hrs. Se centrifugó a 18,000 rpm durante 60 min a 4°C para eliminar el material insoluble y después se liofilizó.

Para determinar la pureza de la preparación de colágena, se tomaron 400 mg de la colágena liofilizada y se resuspendieron en ácido acético 0.5 M. Se tomó una alícuota apropiada para electroforesis en geles de poliacrilamida. Debido a que se observaron varias bandas por debajo de las cadenas



alfa, se decidió repetir el proceso de purificación de la colágena. El material liofilizado se dializó contra ácido acético 0.5 M con cambios cada 24 hrs durante 3 días. Posteriormente se dializó contra H<sub>2</sub>O destilada (2 cambios cada 12 hrs.) y nuevamente contra ácido acético .01 M (3 cambios en 24 hrs.) y se centrifugó a 39,000 rpm, 1 hora (ULTRACENTRIFUGA BECKMAN).

Con el objetivo de determinar la estabilidad y pureza de la colágena obtenida, se realizaron incubaciones de la colágena durante 20 hrs, a 30°C y se realizó una electroforésis en gel de poliacrilamida. Una vez que se obtuvo el grado de pureza requerido para la colágena, se procedió a la acetilación de la misma.

#### Acetilación de Colágena (Lefeveye, Slegers and Claeys, 1978)

Se llevó a cabo con <sup>3</sup>H-anhidrido acético (100 mCi/mol) utilizando 205 mg de colágena dializada primero contra ácido acético 0.005 M durante 24 hrs y después contra ácido acético 0.01 M. Finalmente los 205 mg de colágena se disolvieron en 90 ml de ácido acético al 0.01% a 4°C toda la noche. El <sup>3</sup>H-anhidrido acético (0.98 mCi/mg, 25.5 mg en 3 ml de benzeno) se añadió por goteo durante 3 hrs con agitación continua. Se ajustó el pH de la solución de colágena a 8.0 agregando K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1M y NaOH 1M. La reacción se terminó una hora después de haber agregado todo el anhidrido acético -

ajustando el pH de la solución a 4.0 con ácido acético glacial. El benceno se eliminó burbujeando nitrógeno lentamente durante 4 hrs. La colágena acetilada se dializó contra un volumen de 1 l de agua destilada, con cambios frecuentes (0.5 l/hora). Posteriormente se dializó la colágena contra ácido acético 0.5 M por 24 hrs a 4°C y después contra ácido acético 0.005 M. Finalmente, esta preparación de colágena acetilada se utilizó en los ensayos para determinar la actividad de colagenasa en fluido crevicular gingival.

#### Obtención del fluido crevicular gingival

Los 59 pacientes a los cuales se les tomó fluido crevicular gingival eran sujetos sometidos a control personal de placa (C.P.P.) por lo menos durante un mes con 1 C.P.P. una vez a la semana, y tenían un buen C.P.P. Cada paciente se sometió a cepillado dental (técnica Stillman modificada) durante 3 minutos, se enjuagó, se aisló con rollos de algodón, se secó el área con aire a presión y se colocaron tiras de papel filtro estériles en el surco gingival durante 5 minutos. Estas se retiraron y se colocaron en un tubo de plástico estéril que contenía 120  $\mu$ l de buffer Tris-HCl 0.05 M pH 4.0 y  $\text{CaCl}_2$  0.005 M con el objeto de eluir el fluido crevicular del papel filtro.

Las incubaciones para determinar la actividad colage-

nolítica, se llevaron a cabo durante 20 hrs a 37°C. La mezcla de reacción contenía: 50  $\mu$ l de colágena radiactiva soluble - (aproximadamente 34,000 cpm); 50  $\mu$ l buffer Tris 1 M, pH 7.8 +  $\text{CaCl}_2$  0.01 M; 50  $\mu$ l glucosa 2.5 M; 50  $\mu$ l del fluido crevicular (en buffer Tris 0.05 M pH 4 +  $\text{CaCl}_2$  0.005 M). Todas las determinaciones se hicieron por duplicado. En cada ensayo se utilizaron 3 controles (sin fluido crevicular) y la reacción se terminó por adición de 50  $\mu$ l de etilen-diamino-tetraacético (EDTA) 0.04 M.

La mitad de cada una de las muestras de fluido se incubaron adicionando EDTA desde el principio con el objeto de determinar la degradación inespecífica del sustrato radiactivo no atribuible a actividad colagenolítica. Después de la incubación a cada una de las muestras se les adicionaron 50  $\mu$ l de ácido fosfotúngstico al 4% + 50  $\mu$ l de HCl 4 M. Las muestras se agitaron y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente con el objeto de precipitar la colágena no degradada durante la incubación. Posteriormente se centrifugaron a - - 15,000 rpm por 5 min. Del sobrenadante obtenido (500  $\mu$ l) se tomaron alícuotas de 100  $\mu$ l y se transfirieron a viales de plástico que contenían 10 ml de líquido de centelleo de Bray. La determinación de radiactividad se hizo en un espectrofotómetro de centelleo líquido (PACKARD).

## R E S U L T A D O S

CONCENTRACION DE COLAGENA Y RELACION PROLINA/HIDROXIPROLINA EN HIDROLIZADOS ACIDOS DE BIOPSIAS DE TEJIDO GINGIVAL HUMANO.

En la Tabla II se muestran los resultados obtenidos al determinar la concentración de colágena y la relación prolina/hidroxiprolina (Pro/OH-Pro), en biopsias de tejido gingival humano divididas en 5 grupos de pacientes. En la Tabla III se muestran los valores promedios obtenidos, así como la desviación estándar en cada uno de los grupos con respecto al grupo control.

Los resultados en estas determinaciones podemos resumirlos de la siguiente manera:

A.- Con el objeto de comparar los posibles cambios cuantitativos de los diferentes grupos experimentales se determinó la cantidad de colágena en 6 muestras de tejido sano donde el máximo valor observado fué de 261.48 mg/gts; y el menor fué de 182.72 mg/gts. En cuanto a la relación Pro/OH-Pro se encontró que el valor más alto fué de 3.3 y el menor de 2.4.

Los valores promedio obtenidos para la concentración de -

colágena fueron de  $228.79 \pm (30.14 \text{ mg/gts})$ . Para la relación Pro/OH-Pro se obtuvo un valor de  $2.80 \pm (0.50)$ . Estos valores fueron tomados como parámetros de referencia del grupo control para ser comparados los diferentes grupos experimentales.

- B.- En el grupo de pacientes donde se tomaron tejidos de zonas de erupción dentaria se observó un incremento considerable del 157%, considerando un valor máximo de 397.12 mg/gts. El valor promedio de colágena obtenido para este grupo fué de  $361.29 \pm (35.82) \text{ mg/gts}$  (ver Tabla III). En cuanto a los valores obtenidos para la relación Pro/OH-Pro no se observó una variación considerable en relación al grupo control siendo el valor promedio de  $2.45 \pm (0.35)$ .
- C.- En el grupo de periodontitis (ver Tabla II), se analizaron 8 muestras diferentes de tejido en donde existieron algunas diferencias en cuanto a la concentración de colágena, ya que se obtuvieron valores mínimos de 102.27 mg/gts (muestra No. 5) lo cual se reflejó en la relación Pro/OH-Pro que fué de 5.2. En los casos No. 3 y 7 se determinaron valores para la concentración de colágena de 178.43 y 193.17 mg/gts y la relación Pro/OH-Pro fué de 3.6 y 3.2 respectivamente, lo cual también nos indica una tendencia similar a la muestra No. 5 aunque menos

pronunciada. No obstante el valor promedio obtenido para este grupo de pacientes fué de  $209.91 \pm 36.12$  mg/gts, valor que al compararlo con el grupo control demuestra que no existieron diferencias significativas. El valor promedio de la relación Pro/OH-Pro fué de  $3.20 \pm (0.90)$ .

D.- En el grupo de agrandamiento gingival de tipo inflamatorio, se analizaron 14 muestras diferentes encontrándose volores mínimos de 107.84 (muestra No. 3) y 120.40 mg/gts (muestra No.10). En este grupo de pacientes consideramos que existen diferencias significativas en cuanto al grado de inflamación gingival asociado a la placa dentobacteriana. Los valores obtenidos en la relación Pro/OH-Pro (ver Tabla II) de las muestras No. 3 y 10 fueron de 4.1 y 3.2 respectivamente, en donde la concentración de prolina fue muy semejante al grupo control. Sin embargo, la concentración de OH-Pro se encontró disminuída. El valor promedio obtenido en la relación Pro/OH-Pro fue de  $3.30 \pm (0.60)$  y la concentración de colágena fue de  $171.83 \pm (39.58)$ ; valor que al compararse con el grupo control nos indica una disminución significativa de la concentración de colágena en este grupo experimental.

E.- Para este grupo se analizaron 11 muestras de agrandamiento gingival causado por difenil-hidantoína. En este grupo también se observaron diferencias en cuanto a la concen-

TABLA II  
 CONCENTRACION DE COLAGENA Y RELACION PROLINA/HIDROXIPROLINA EN TEJIDO  
 GINGIVAL HUMANO

| GRUPO                | PESO TEJIDO<br>(mg) | PESO SECO<br>(%) | PROLINA<br>(mg/gts) | HIDROXIPROLINA<br>(mg/gts) | RELACION<br>Pro/OH-Pro | COLAGENA<br>(mg/gts) |
|----------------------|---------------------|------------------|---------------------|----------------------------|------------------------|----------------------|
| SANO                 |                     |                  |                     |                            |                        |                      |
| 1                    | 89.2                | 18.38            | 81.52               | 24.63                      | 3.3                    | 182.78               |
| 2                    | 67.9                | 22.38            | 81.24               | 32.99                      | 2.4                    | 244.81               |
| 3                    | 123.7               | 18.51            | 92.01               | 34.82                      | 2.6                    | 258.40               |
| 4                    | 95.8                | 20.87            | 95.91               | 35.20                      | 2.7                    | 261.18               |
| 5                    | 101.6               | 18.60            | 81.49               | 26.27                      | 3.1                    | 194.90               |
| 6                    | 77.0                | 18.83            | 88.20               | 31.03                      | 2.8                    | 230.72               |
| Z.E.D. <sup>a)</sup> |                     |                  |                     |                            |                        |                      |
| 1                    | 29.2                | 19.83*           | 125.46              | 43.82                      | 2.8                    | 325.46               |
| 2                    | 72.4                | 19.83*           | 116.88              | 53.45                      | 2.1                    | 397.12               |
| E.P.C. <sup>b)</sup> |                     |                  |                     |                            |                        |                      |
| 1                    | 84.7                | 17.82            | 126.09              | 38.27                      | 3.2                    | 284.02               |
| 2                    | 10.8                | 32.40            | 78.85               | 32.15                      | 2.4                    | 238.56               |
| 3                    | 66.4                | 24.54            | 87.36               | 24.04                      | 3.6                    | 178.43               |
| 4                    | 44.5                | 30.33            | 96.88               | 32.47                      | 2.9                    | 241.00               |
| 5                    | 68.3                | 21.66            | 72.64               | 13.77                      | 5.2                    | 102.27               |
| 6                    | 114.4               | 16.17            | 75.38               | 31.24                      | 2.4                    | 231.82               |
| 7                    | 119.0               | 15.63            | 85.92               | 26.04                      | 3.2                    | 193.17               |
| 8                    | 100.5               | 21.19            | 68.90               | 28.16                      | 2.4                    | 209.00               |

TABLA II (Continuación)

| GRUPO                | PESO TEJIDO<br>(mg) | PESO SECO<br>(%) | PROLINA<br>(mg/gts) | HIDROXIPROLINA<br>(mg/gts) | RELACION<br>Pro/OH-Pro | COLAGENA<br>(mg/gts) |
|----------------------|---------------------|------------------|---------------------|----------------------------|------------------------|----------------------|
| A.G.I. <sup>c)</sup> |                     |                  |                     |                            |                        |                      |
| 1                    | 89.4                | 19.01            | 78.64               | 27.85                      | 2.8                    | 206.66               |
| 2                    | 97.2                | 17.69            | 92.93               | 29.53                      | 3.1                    | 219.19               |
| 3                    | 9.4                 | 45.74            | 60.81               | 14.53                      | 4.1                    | 107.84               |
| 4                    | 78.5                | 22.67            | 84.09               | 20.08                      | 4.1                    | 149.02               |
| 5                    | 40.6                | 17.48            | 104.36              | 29.30                      | 3.5                    | 217.37               |
| 6                    | 28.0                | 22.85            | 55.58               | 17.90                      | 3.1                    | 132.74               |
| 7                    | 74.3                | 21.39            | 78.60               | 24.32                      | 3.2                    | 169.40               |
| 8                    | 53.6                | 20.52            | 73.95               | 19.95                      | 3.7                    | 148.06               |
| 9                    | 58.2                | 18.72            | 58.64               | 16.38                      | 3.5                    | 121.50               |
| 10                   | 54.6                | 24.35            | 52.42               | 16.23                      | 3.2                    | 120.40               |
| 11                   | 110.0               | 17.36            | 82.15               | 26.90                      | 3.0                    | 199.67               |
| 12                   | 112.3               | 17.18            | 79.80               | 25.09                      | 3.1                    | 189.26               |
| 13                   | 184.4               | 15.67            | 85.99               | 28.37                      | 3.0                    | 210.53               |
| 14                   | 182.7               | 16.73            | 83.64               | 29.24                      | 2.8                    | 216.98               |
| A.G.D. <sup>d)</sup> |                     |                  |                     |                            |                        |                      |
| 1                    | 85.2                | 19.83*           | 65.35               | 21.38                      | 2.9                    | 116.12               |
| 2                    | 80.5                | 19.83*           | 81.89               | 28.54                      | 2.8                    | 212.05               |
| 3                    | 55.4                | 19.83*           | 114.17              | 30.45                      | 3.7                    | 226.37               |
| 4                    | 72.3                | 19.83*           | 64.85               | 14.47                      | 4.4                    | 107.61               |



TABLA II (Continuación)

| GRUPO | PESO TEJIDO<br>(mg) | PESO SECO<br>(%) | PROLINA<br>(mg/gts) | HIDROXIPROLINA<br>(mg/gts) | RELACION<br>Pro/OH-Pro | COLAGENA<br>(mg/gts) |
|-------|---------------------|------------------|---------------------|----------------------------|------------------------|----------------------|
| 5     | 148.6               | 22.88            | 76.94               | 23.10                      | 3.3                    | 171.42               |
| 6     | 111.4               | 23.78            | 75.67               | 27.65                      | 2.7                    | 205.23               |
| 7     | 92.3                | 25.02            | 83.03               | 27.23                      | 3.0                    | 202.04               |
| 8     | 163.8               | 20.57            | 69.86               | 20.20                      | 3.4                    | 149.94               |
| 9     | 147.8               | 21.51            | 73.12               | 23.78                      | 3.0                    | 176.51               |
| 10    | 156.5               | 19.16            | 45.53               | 20.40                      | 2.2                    | 151.36               |
| 11    | 149.8               | 20.22            | 84.45               | 20.33                      | 4.1                    | 150.92               |

\* El porcentaje de peso seco para estos casos se obtuvo al calcular el valor promedio de los correspondientes a los otros grupos experimentales.

a) Z.E.D. = Zona de Erupción Dentaria

b) E.P.C. = Enfermedad Periodontal Crónica (Periodontitis).

c) A.G.I. = Agrandamiento Gingival Inflamatorio

d) A.G.D. = Agrandamiento gingival por Difenil-hidantoína.

TABLA III

VALORES PROMEDIO PARA LA CONCENTRACION DE COLAGENA Y LA RELACION  
 PROLINA/HIDROXIPROLINA EN TEJIDO GINGIVAL HUMANO

| GRUPO   | PROLINA<br>(mg/gts)        | HIDROXIPROLINA<br>(mg/gts) | RELACION<br>Pro/OH-Pro   | COLAGENA<br>(mg/gts)        |
|---|----------------------------|----------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| SANO.   | 86.72 <sub>±</sub> (5.75)  | 30.82 <sub>±</sub> (4.00)  | 2.80 <sub>±</sub> (0.50) | 228.79 <sub>±</sub> (30.14) |
| ZONA DE ERUPCION<br>DENTARIA                          | 120.89 <sub>±</sub> (4.50) | 48.63 <sub>±</sub> (4.80)  | 2.45 <sub>±</sub> (0.35) | 361.29 <sub>±</sub> (35.82) |
| ENFERMEDAD PERIO<br>DONTAL CRONICA<br>(PERIODONTITIS) | 89.01 <sub>±</sub> (16.90) | 28.28 <sub>±</sub> (7.31)  | 3.20 <sub>±</sub> (0.90) | 209.91 <sub>±</sub> (36.12) |
| AGRANDAMIENTO<br>GINGIVAL<br>INFLAMATORIO             | 76.54 <sub>±</sub> (14.35) | 23.26 <sub>±</sub> (5.33)  | 3.30 <sub>±</sub> (0.60) | 171.83 <sub>±</sub> (39.58) |
| AGRANDAMIENTO GIN<br>GIVAL POR DIFENIL-<br>HIDANTOINA | 81.56 <sub>±</sub> (20.03) | 23.82 <sub>±</sub> (6.27)  | 3.40 <sub>±</sub> (0.70) | 177.03 <sub>±</sub> (46.64) |

tación de colágena correspondiendo a la muestra No. 4 (ver Tabla II), el menor valor (107.61 mg/gts) y el valor más alto fue de 226.37 mg/gts y correspondió a la muestra No. 3. En cuanto a la relación Pro/OH-Pro se obtuvieron en algunas muestras valores mayores al correspondiente del grupo control, muestra No. 3: 3.7; muestra No. 4: 4.4 y muestra No. 11: 4.1.

El valor promedio para la concentración de colágena fue de  $177.03 \pm (46.64)$ , siendo menor en comparación al grupo control y la relación Pro/OH-Pro fue  $3.40 \pm (0.70)$ , la cual se encontró considerablemente incrementada en relación al grupo control, así como comparativamente mayor a los demás grupos experimentales. Se observó un incremento considerable de prolina en relación a hidroxiprolina, lo cual sugiere un aumento de proteínas no colagénicas en los tejidos obtenidos de pacientes con agrandamiento gingival causado por difenil-hidantoína y la concentración de colágena se encontró disminuída.

#### BIOSINTESIS DE PROTEINAS TOTALES Y COLAGENICAS EN BIOPSIAS DE TEJIDO GINGIVAL HUMANO.

La capacidad biosintética de los tejidos gingivales - de los diferentes grupos experimentales se evaluó midiendo la incorporación de  $^3\text{H}$ -prolina en proteínas totales determi-

nada por la radiactividad incorporada, precipitable con TCA al 8% y utilizando el método para cultivo de tejidos (Beitkreutz et al. 1978).

Posteriormente se determinó la radiactividad resistente a la digestión con pepsina en homogenados del tejido, con el objeto de determinar la incorporación a proteínas colagénicas.

Se analizó sólo un control de tejido sano como parámetro de los demás grupos experimentales ya que la obtención del tejido sano necesario para la biosíntesis fué difícil de lograr, los valores obtenidos para los cuatro grupos analizados se presentan en la Tabla IV, y los valores promedios se muestran en la Tabla V.

A.- El valor encontrado para el tejido sano en la incorporación de radiactividad en proteínas totales fué de  $11.37 \times 10^{-6}$  dpm/gth; correspondiendo un 25.85% de la incorporación a proteínas colagénicas (ver Tabla IV).

Tomando como parámetro estas cifras, se obtuvieron los siguientes resultados:

B.- Para el grupo de pacientes donde se obtuvieron biopsias de tejido de zonas de erupción dentaria, se determinó un

valor comparable al grupo control en cuanto a la incorporación de radiactividad a colágena siendo este de  $26.51\% \pm (4.59)$ . Con respecto a la incorporación de radiactividad en proteínas totales, el valor promedio obtenido fue de  $7.03 \times 10^{-6}$  dpm/gth, siendo ligeramente menor en comparación al grupo normal.

C.- En el grupo de pacientes con Periodontitis, se analizaron muestras de cuatro pacientes diferentes, en donde el valor promedio de la incorporación de radiactividad a colágena fué  $34.41\% \pm (4.34)$  por lo que se encontró incrementada en relación al control en un 48.40%. En cuanto a la incorporación de radiactividad en proteínas totales, ésta se encontró significativamente disminuída, siendo un - - 44.43%, en comparación al grupo control y encontrándose también estos valores menores en relación a los demás grupos experimentales (ver Tabla V).

D.- En el grupo de agrandamiento gingival de tipo inflamatorio se evaluaron muestras de 4 pacientes distintos. Se observó una disminución de la incorporación de radiactividad en proteínas colagénicas con un valor promedio de - 19.50%  $\pm (4.70)$ , correspondiendo a una disminución del 23.21% con respecto al control. Sin embargo, la radiactividad incorporada se encontró aumentada en más de un - 100%, siendo el grupo de pacientes en donde se encontró

TABLA IV

BIOSINTESIS DE COLAGENA Y PROTEINAS TOTALES EN EXPLANTES DE TEJIDO GINGIVAL  
SANO Y DE PACIENTES CON ENFERMEDAD PERIODONTAL.

| GRUPO  | PESO TEJIDO<br>(mg) | RADIOACTIVIDAD<br>TOTAL<br>INCORPORADA<br>(dpm x 10 <sup>-6</sup> /gth) | RADIOACTIVIDAD<br>RESISTENTE A<br>PEPSINA<br>(dpm x 10 <sup>-6</sup> /gth) | INCORPORACION<br>A<br>COLAGENA<br>(%) |
|--|---------------------|---|--|---------------------------------------|
| SANO   |                     |   |  |                                       |
| 1  | 69.2                | 11.37   | 2.94   | 25.88                                 |
| ZONA DE ERUPCION<br>DENTARIA                           |                     |   |  |                                       |
| 1  | 157.7               | 7.41  | 1.62   | 21.92                                 |
| 2  | 82.6                | 6.66  | 2.07   | 31.11                                 |
| ENFERMEDAD PERIO-<br>DONTAL CRONICA<br>(PERIODONTITIS) |                     |   |  |                                       |
| 1  | 101.2               | 6.69  | 2.02   | 30.16                                 |
| 2  | 156.7               | 9.71  | 3.10   | 31.92                                 |
| 3  | 184.6               | 3.56  | 1.21   | 34.01                                 |
| 4  | 56.7                | 2.85  | 1.18   | 41.55                                 |

TABLA IV (Continuación)

| GRUPO   | PESO TEJIDO<br>(mg) | RADIOACTIVIDAD<br>TOTAL<br>INCORPORADA<br>(dpm x 10 <sup>-6</sup> /gth) | RADIOACTIVIDAD<br>RESISTENTE A<br>PEPSINA<br>(dpm x 10 <sup>-6</sup> /gth) | INCORPORACION<br>A<br>COLAGENA<br>(%) |
|---|---------------------|---|--|---------------------------------------|
| <b>AGRANDAMIENTO<br/>GINGIVAL<br/>INFLAMATORIO</b>          |                     |   |  |                                       |
| 1   | 75.6                | 57.90   | 15.09  | 26.04                                 |
| 2   | 133.9               | 9.18  | 1.43   | 15.57                                 |
| 3   | 40.6                | 17.68   | 2.57   | 14.54                                 |
| 4   | 97.7                | 12.84   | 2.80   | 21.87                                 |
| <b>AGRANDAMIENTO<br/>GINGIVAL POR<br/>DIFENILHIDANTOINA</b> |                     |   |  |                                       |
| 1   | 72.4                | 4.10  | 1.50   | 37.60                                 |
| 2   | 59.7                | 23.56   | 8.50   | 36.07                                 |
|   | 71.8                | 24.66   | 8.71   | 35.32                                 |
| 3   | 82.6                | 22.11   | 7.82   | 35.36                                 |
|   | 66.5                | 31.80   | 13.70  | 43.08                                 |
| 4   | 108.1               | 5.14  | 1.64   | 32.04                                 |

TABLA V

VALORES PROMEDIO PARA LA BIOSINTESIS DE COLAGENA Y PROTEINAS TOTALES EN  
EXPLANTES DE TEJIDO GINGIVAL SANO Y PACIENTES CON  
ENFERMEDAD PERIODONTAL

| GRUPO   | RADIOACTIVIDAD<br>TOTAL<br>INCORPORADA<br>(dpm x 10 <sup>6</sup> /gth) | RADIOACTIVIDAD<br>RESISTENTE A<br>PEPSINA<br>(dpm x 10 <sup>6</sup> /gth) | INCORPORACION<br>A<br>COLAGENA<br>(%) |
|---|--|---|---------------------------------------|
| SANO  | 11.37  | 2.94  | 25.85                                 |
| ZONA DE ERUPCION<br>DENTARIA                          | 7.03   | 1.84  | 26.17                                 |
| ENFERMEDAD PERIO-<br>DONTAL CRONICA<br>(PERIODONTITS) | 5.70   | 1.87  | 34.41                                 |
| AGRANDAMIENTO<br>GINGIVAL<br>INFLAMATORIO             | 24.40  | 5.47  | 19.50                                 |
| AGRANDAMIENTO<br>GINGIVAL POR<br>DIFENILHIDANTOINA    | 18.56  | 6.97  | 36.57                                 |



una mayor capacidad biosintética, con respecto al grupo control y a los demás grupos analizados (ver Tabla V).

E.- En el grupo de agrandamiento gingival causado por difenil hidantoína se evaluaron 6 muestras de 4 pacientes diferentes. Los valores obtenidos en cuanto a la radiactividad incorporada a proteínas totales varió en cada una de las muestras (ver Tabla IV), pero se mantuvo incrementada en comparación al grupo control. La incorporación de radiactividad incorporada a colágena, fué en promedio de  $36.54\% \pm (3.34)$  (ver Tabla V), lo cual indica un 15% de aumento en la capacidad biosintética de este grupo respecto al control. La radiactividad total incorporada en promedio fué de  $18.56 \times 10^{-6}$  dpm/gth siendo mayor la capacidad biosintética tanto para proteínas totales como en el porcentaje de incorporación a colágena (Tabla V).

#### ACTIVIDAD COLAGÉNOLÍTICA EN FLUIDO CREVICULAR GINGIVAL DE INDIVIDUOS SANOS Y PACIENTES CON ENFERMEDAD PERIODONTAL.

Para realizar los ensayos de actividad colagenolítica en fluido crevicular gingival se efectuó la extracción y purificación de colágena a partir de piel de conejo, la cual se acetiló posteriormente con  $^3\text{H}$ -anhídrido acético.

Se evaluaron 52 pacientes con enfermedad periodontal

crónica: 21 con gingivitis, 31 con periodontitis, así como 7 individuos con encía clínicamente sana como grupo control.

En la Tabla VI se muestran los resultados obtenidos en la determinación de actividad colagenolítica en fluido crevicular y en la Tabla VII los valores promedio. En la primera columna se enlistan las cuentas por minuto (cpm) totales que se determinaron en cada ensayo; en la segunda columna se muestra la radiactividad total sin inhibidor; en la tercera columna la radiactividad total con inhibidor (EDTA); de cada una de las muestras analizadas, en la cuarta columna la radiactividad susceptible a colagenasa y en la última columna se muestra el porcentaje de degradación.

Los resultados obtenidos en estos ensayos se pueden resumir de la siguiente manera:

A.- Grupo Control. Las muestras de este grupo experimental se obtuvieron de 7 estudiantes de Posgrado del Departamento de Parodoncia de la Facultad de Odontología, a los cuales no se les realizaron controles de placa-bacteriana, únicamente por medio del diagnóstico clínico de acuerdo al Índice de Løe & Silness, 1966, se determinó que presentaban encía clínicamente sana. En este grupo, los valores obtenidos fueron para el porcentaje mínimo de degradación de 0.31% y el valor máximo de 2.42%, con un valor promedio

de  $1.47\% \pm (0.69)$  tomando estos datos como control de los demás grupos experimentales.

B.- Grupo con Gingivitis. De acuerdo al Índice de Inflamación Gingival de Løe & Silness, 1966, los grupos de gingivitis se clasificaron en: inflamación leve, moderada y severa (ver Tabla VI). Se analizaron 13 pacientes con gingivitis leve, 4 con gingivitis moderada y 4 con gingivitis severa.

En el grupo de gingivitis leve, los resultados obtenidos para el porcentaje de degradación variaron entre 0.13% y 2.82%. El valor promedio fue de  $1.13\% \pm (0.82)$  lo cual indica que no hubo una diferencia significativa en relación del grupo control.

En el grupo de gingivitis moderada se determinó 3.71% como valor mínimo de porcentaje de degradación y de 4.98% como valor máximo, con un promedio de  $4.27\% \pm (0.47)$ . Este resultado sugiere un incremento de la actividad colagenolítica para este grupo experimental.

En el grupo de gingivitis severa se obtuvieron porcentajes de degradación de 9.25% como valor mínimo y 19.98% como valor máximo, con un valor promedio de  $16.13\% \pm (4.31)$ . En este grupo experimental se obtuvo un aumento considerable de actividad colagenolítica, en comparación a los

otros dos grupos de gingivitis y al grupo control.

C.- Grupo con Periodontitis. El grupo de periodontitis se clasificó de acuerdo al Índice de Enfermedad Periodontal (I.P.D.) en: Periodontitis leve, donde la profundidad de la bolsa periodontal fue entre 3 y 4 mm, periodontitis moderada en donde la profundidad de la bolsa fue de 4 a 5 mm y Periodontitis avanzada de 5 a 7 mm. o más. También se tomó en cuenta el Índice de Løe & Silness para el diagnóstico de la inflamación gingival. Se analizaron 8 muestras de Periodontitis leve, 7 de Periodontitis moderada y 16 de Periodontitis avanzada.

Periodontitis leve: En este grupo de pacientes el porcentaje de degradación varió entre 0.89% y 4.92% como valor máximo, siendo el valor promedio de  $2.74\% \pm (1.28)$ . Estos resultados sugieren un ligero incremento de actividad colagenolítica en relación al grupo control.

En el grupo de Periodontitis moderada se obtuvieron valores de 3.10% (mínimo) y de 7.66% como valor máximo, con un valor promedio de  $5.41\% \pm (1.55)$ , lo cual determina un incremento considerable en la actividad colagenolítica de este grupo experimental.

En el grupo de Periodontitis avanzada se separaron 4 mueses

tras las cuales se colocaron al final de la Tabla VI, ya que en ellas se determinaron los valores más elevados de actividad colagenolítica. Estos pacientes presentaban inflamación gingival severa, la profundidad de la bolsa periodontal fue mayor de 7 mm, con pérdida ósea avanzada. Los porcentajes de degradación fueron de 45.31%, 40.12%, 33.97% y 42.56%, lo cual indica una actividad colagenolítica significativamente incrementada al ser comparada - con los demás grupos experimentales y obviamente con el grupo control.

En las demás muestras analizadas de este grupo, el valor mínimo obtenido en porcentaje de degradación fue de 6.70%. Sin embargo, un valor semejante a éste fue el valor máximo de porcentaje de degradación del grupo de Periodontitis moderada. Otros valores obtenidos para el porcentaje de degradación fueron más elevados que los determinados en los demás grupos experimentales variando entre 10.05%, 14.01%, 20.85% y 23.73%, con un valor promedio de 14.40% ± (5.74). Lo anterior indica que en este grupo experimental se obtuvieron los porcentajes más altos y por lo tanto un incremento significativo de la actividad colagenolítica.

TABLA VI  
 ACTIVIDAD COLAGENOLITICA EN FLUIDO CREVICULAR GINGIVAL DE INDIVIDUOS SANOS Y  
 PACIENTES CON ENFERMEDAD PERIODONTAL CRONICA.

| GRUPO          | RADIOACTIVIDAD<br>TOTAL<br>(cpm/ensayo) | RADIOACTIVIDAD<br>TOTAL SIN<br>INHIBIDOR (cpm) | RADIOACTIVIDAD<br>TOTAL CON<br>INHIBIDOR (cpm) | RADIOACTIVIDAD<br>SUSCEPTIBLE A<br>COLAGENASA (cpm) | DEGRADACION<br>(%) |
|----------------|---|--|--|---|--------------------|
| CONTROL (sano) | 33,548                                  | 4,917  | 4,628  | 235   | 0.70               |
|                |   | 5,002  | 4,897  | 105   | 0.31               |
|                |   | 5,587  | 4,897  | 690   | 2.05               |
|                |   | 5,642  | 5,012  | 630   | 1.87               |
|                |   | 4,862  | 4,415  | 447   | 1.33               |
|                |   | 4,890  | 4,077  | 812   | 2.42               |
|                |   | 5,425  | 4,872  | 552   | 1.66               |
| <hr/>          |   |  |  |   |                    |
| GINGIVITIS     |   |  |  |   |                    |
| Leve           | 33,585                                  | 5,405  | 4,832  | 572   | 1.70               |
|                |   | 5,420  | 4,722  | 697   | 2.07               |
|                |   | 4,595  | 4,550  | 45  | 0.13               |
|                | 33,548                                  | 4,662  | 4,430  | 232   | 0.71               |
|                |   | 4,722  | 4,665  | 57  | 0.17               |
|                |   | 5,030  | 4,570  | 460   | 1.41               |
|                |   | 4,140  | 3,960  | 180   | 0.55               |
|                |   | 4,640  | 4,025  | 615   | 1.88               |
|                | 32,769                                  | 5,742  | 5,170  | 572   | 1.70               |
|                |   | 5,965  | 5,860  | 105   | 0.32               |
|                | 32,867                                  | 4,907  | 4,622  | 285   | 0.86               |
|                | 33,125                                  | 5,007  | 4,897  | 110   | 0.33               |
|                |   | 5,212  | 4,277  | 934   | 2.82               |

TABLA VI (Continuación)

| GRUPO                | RADIOACTIVIDAD<br>TOTAL<br>(cpm/ensayo) | RADIOACTIVIDAD<br>TOTAL SIN<br>INHIBIDOR (cpm) | RADIOACTIVIDAD<br>TOTAL CON<br>INHIBIDOR (cpm) | RADIOACTIVIDAD<br>SUSCEPTIBLE A<br>COLAGENASA (cpm) | DEGRADACION<br>(%) |
|----------------------|---|--|--|---|--------------------|
| Moderada             | 33,585                                  | 6,092  | 4,417  | 1,675   | 4.98               |
|                      | 32,548                                  | 6,502  | 5,292  | 1,210   | 3.71               |
|                      | 32,769                                  | 7,112  | 5,667  | 1,445   | 4.40               |
|                      | 32,867                                  | 6,345  | 5,032  | 1,312   | 3.99               |
| Severa               | 33,585                                  | 9,957  | 4,695  | 5,262   | 15.66              |
|                      |   | 8,835  | 5,527  | 3,307   | 9.25               |
|                      | 33,223                                  | 10,475   | 3,953  | 6,522   | 19.63              |
|                      |   | 11,697   | 5,057  | 6,640   | 19.98              |
| <b>PERIODONTITIS</b> |   |  |  |   |                    |
| Leve                 | 33,585                                  | 6,282  | 5,020  | 1,262   | 3.76               |
|                      | 33,223                                  | 5,380  | 4,212  | 1,167   | 3.15               |
|                      | 32,548                                  | 6,015  | 5,210  | 805   | 2.47               |
|                      |   | 4,990  | 4,697  | 292   | 0.89               |
|                      |   | 5,005  | 4,037  | 967   | 2.97               |
|                      | 33,125                                  | 4,285  | 4,600  | 315   | 0.95               |
|                      |   | 6,662  | 5,032  | 1,630   | 4.92               |
|                      |   | 5,277  | 4,450  | 827   | 2.49               |

TABLA VI (Continuación)

| GRUPO    | RADIOACTIVIDAD<br>TOTAL<br>(cpm/ensayo) | RADIOACTIVIDAD<br>TOTAL SIN<br>INHIBIDOR (cpm) | RADIOACTIVIDAD<br>TOTAL CON<br>INHIBIDOR (cpm) | RADIOACTIVIDAD<br>SUSCEPTIBLE A<br>COLAGENASA (cpm) | DEGRADACION<br>(%) |      |
|----------|---|--|--|---|--------------------|------|
| Moderada | 33,223                                  | 5,930  | 4,927  | 1,002   | 3.01               |      |
|          |   | 8,572  | 6,027  | 2,545   | 7.66               |      |
|          |   | 7,267  | 5,127  | 2,140   | 6.44               |      |
|          | 32,548                                  | 6,317  | 5,027  | 1,290   | 3.88               |      |
|          |   | 6,847  | 4,732  | 2,115   | 6.49               |      |
|          |   | 33,125   | 7,392  | 5,957   | 1,435              | 4.33 |
|          |   | 6,960  | 4,947  | 2,012   | 6.07               |      |
| Avanzada | 33,585                                  | 7,132  | 4,880  | 2,252   | 6.70               |      |
|          |   | 8,072  | 4,697  | 3,375   | 10.05              |      |
|          | 33,223                                  | 8,925  | 4,267  | 4,657   | 14.01              |      |
|          |   | 8,805  | 5,095  | 3,710   | 11.16              |      |
|          |   | 11,227   | 5,202  | 6,025   | 18.13              |      |
|          | 32,769                                  | 13,675   | 5,897  | 7,777   | 23.73              |      |
|          | 32,867                                  | 9,132  | 5,515  | 3,617   | 11.00              |      |
|          |   | 12,227   | 5,372  | 6,855   | 20.85              |      |
|          |   | 9,187  | 5,922  | 3,265   | 9.93               |      |
|          | 33,125                                  | 12,197   | 4,755  | 7,442   | 22.46              |      |
|          |   | 7,512  | 5,222  | 2,290   | 6.91               |      |
|          |   | 11,180   | 5,237  | 5,942   | 17.93              |      |
|          | 33,223                                  | 22,522   | 7,467  | 15,055  | 45.31              |      |
|          | 32,769                                  | 19,460   | 6,310  | 13,150  | 40.12              |      |
|          | 32,867                                  | 17,467   | 6,302  | 11,165  | 33.97              |      |
| 33,125   | 19,657                                  | 5,557  | 14,100   | 42.56   |                    |      |



TABLA VII

VALORES PROMEDIO DE LA DETERMINACION DE ACTIVIDAD COLAGENOLITICA EN MUESTRAS  
DE FLUIDO CREVICULAR GINGIVAL DE INDIVIDUOS SANOS Y PACIENTES  
CON ENFERMEDAD PERIODONTAL CRONICA<sup>a)</sup>

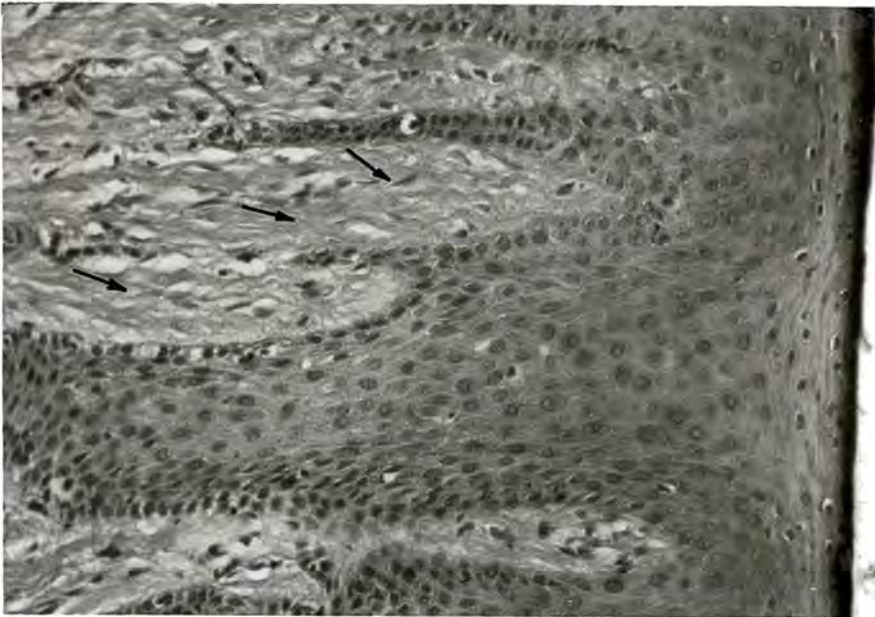
| GRUPO         | COLAGENA<br>RADIATIVA<br>(cmp/ensayo) | RADIATIVIDAD<br>SIN INHIBIDOR<br>(cpm/vol.total) | RADIATIVIDAD<br>CON INHIBIDOR <sup>b)</sup><br>(cpm/vol.total) | RADIATIVIDAD<br>SUSCEPTIBLE A<br>COLAGENASA<br>(cpm) | PORCIENTO<br>DE<br>DEGRADACION |
|---------------|---------------------------------------|--|--|--|--------------------------------|
| CONTROL       |                                       |  |  |  |                                |
| GINGIVITIS    | 33,336.87                             | 5,302.14   | 4,806.07   | 496  | 1.47 $\pm$ (0.69)              |
| Leve          | 32,979.12                             | 5,029.58   | 4,691.91   | 358  | 1.13 $\pm$ (0.82)              |
| Moderada      | 32,942.65                             | 6,513.12   | 5,102.50   | 1,410  | 4.27 $\pm$ (0.47)              |
| Severa        | 33,404.37                             | 10,241.25  | 4,808.25   | 5,433  | 16.13 $\pm$ (4.31)             |
| PERIODONTITIS |                                       |  |  |  |                                |
| Leve          |                                       |  |  |  |                                |
| 3-4 mm        | 33,120.62                             | 5,487.18   | 4,657.56   | 908.43   | 2.74 $\pm$ (1.28)              |
| Moderada      |                                       |  |  |  |                                |
| 4-5 mm        | 33,005.62                             | 7,041.07   | 5,249.64   | 1,791.42   | 5.41 $\pm$ (1.55)              |
| Avanzada      |                                       |  |  |  |                                |
| 5-7           | 33,114.12                             | 9,939.58   | 5,172.08   | 4,767.50   | 14.40 $\pm$ (5.74)             |
|               | 32,996.40                             | 19,776.87  | 6,409.37   | 13,367.50  | 40.49 $\pm$ (4.18)             |

a) Las muestras de fluido crevicular gingival se dividieron en dos partes, para realizar las dcterminaciones en ausencia y presencia del inhibidor de colagenasa.

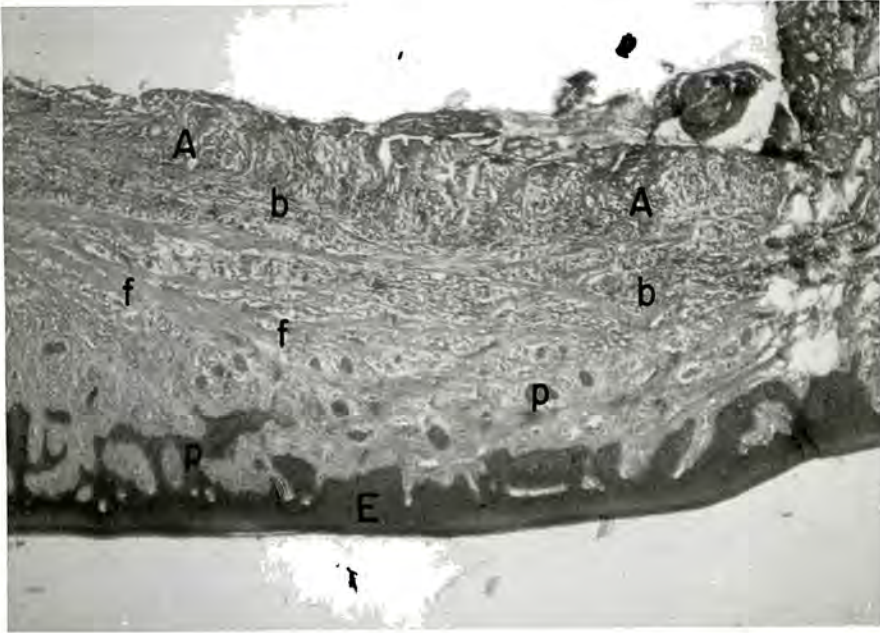
b) Se utilizó EDTA (40 mM) como inhibidor de colagenasa.

## E S T U D I O S      H I S T O L O G I C O S

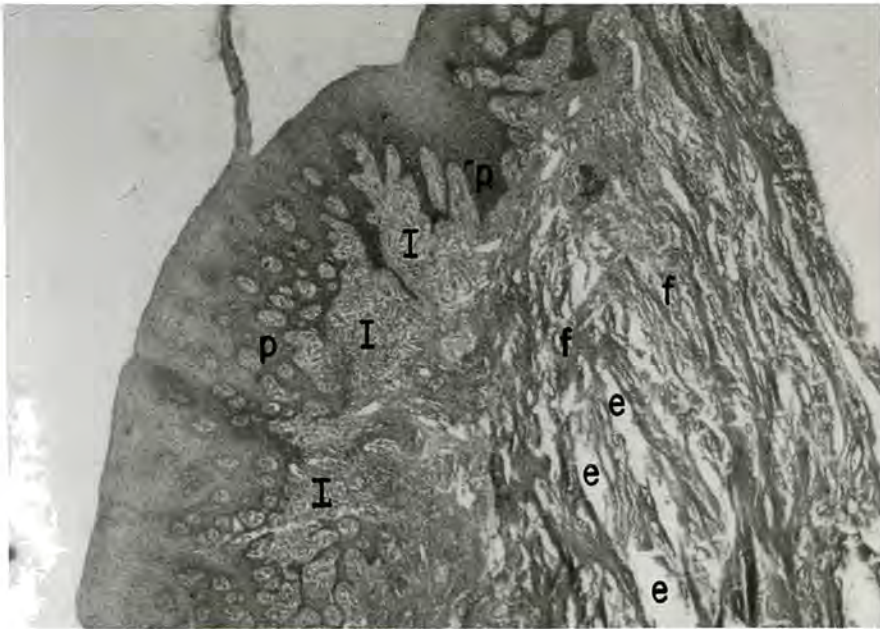
De las diferentes biopsias estudiadas se escogió un corte histológico representativo para: tejido sano, periodontitis, agrandamiento gingival inflamatorio y una de agrandamiento gingival causado por difenil-hidantofna. Se realizaron tinciones con hematoxilina-eosina y tricrómica de Masson. En las siguientes microfotografías se muestran los cortes histológicos con tinciones de tricrómico de Massón.



MICROFOTOGRAFIA 1. Corte histológico de encía sana, en donde se muestran los haces de fibras de colágena bien orientados y con una distribución uniforme en el espesor del tejido conjuntivo gingival; el epitelio externo muestra los diferentes estratos celulares y la interdigitación característica del epitelio-tejido conjuntivo.

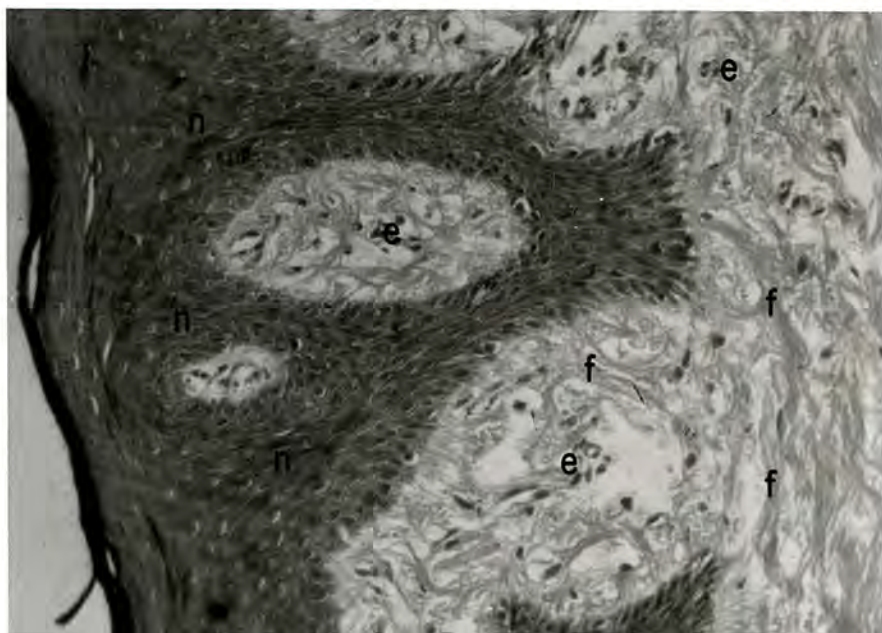


MICROFOTOGRAFIA 2. Corte histológico de periodontitis. La parte superior corresponde a la pared blanda de la bolsa periodontal (A), donde se observa disrupción de las fibras de colágena y (b) zonas de infiltrado celular inflamatorio. En la parte inferior se observan haces de fibras de colágena bien orientadas (f). El epitelio muestra pérdida de la interdigitación normal con el tejido conjuntivo (E) y existen proliferaciones del epitelio hacia el tejido conjuntivo subyacente (p).



MICROFOTOGRAFIA 3. Corte histológico de agrandamiento gingival de tipo inflamatorio. Se observa una marcada acumulación de infiltrado celular inflamatorio subyacente al epitelio - (I); los haces de fibras de colágena se encuentran disgregados (f) y separados por espacios tisulares provocados por el edema (e) y por el infiltrado inflamatorio. También se observan proliferaciones del epitelio hacia el tejido conjuntivo (p).





MICROFOTOGRAFIA 4. Corte histológico de agrandamiento gingival causado por difenil-hidantoína. Se observa acantosis del epitelio (n); existe un incremento en el número de fibroblastos y los haces de fibras de colágena no tienen una disposición ni orientación definidas (f), las fibras son más delgadas y cortas, además de que existen zonas de infiltración celular inflamatoria: células plasmáticas y linfocitos (e).

## D I S C U S I O N

La forma más comun de enfermedad inflamatoria de los tejidos periodontales (gingivitis y periodontitis) en la mayoría de los individuos, parece que se inicia durante la niñez o pocos años después durante la adolescencia. Está relacionada a la acumulación de placa dentobacteriana alrededor de la superficie de los dientes, siendo los microorganismos y las substancias que liberan el agente etiológico primario y quizá el único que constituye la causa de esta enfermedad. Los microorganismos de la placa dentobacteriana liberan toxinas y enzimas que afectan al epitelio de unión y al tejido conjuntivo de la encía, las cuales sirven como inductores de los mecanismos patogénicos que se desencadenan como una respuesta del huésped, siendo estos principalmente la respuesta inflamatoria y los mecanismos inmunopatológicos. Existen múltiples estudios, los cuales describen los cambios que se manifiestan en los tejidos tratando de explicar y entender la secuencia de los eventos que ocurren en la enfermedad periodontal inflamatoria (Page & Schroeder 1976, 1982).

CONCENTRACION DE COLAGENA, RELACION PROLINA/HIDROXIPROLINA Y SINTESIS DE PROTEINAS EN TEJIDO GINGIVAL HUMANO.

De acuerdo a los resultados obtenidos en los diferentes parámetros estudiados en los grupos experimentales, así

como en el grupo control, se discutirán a continuación los cambios cuantitativos determinados en el tejido gingival y la capacidad de síntesis de proteínas totales y colagénicas.

En cuanto a la concentración de colágena y la relación Pro/OH-Pro en el grupo de pacientes donde se obtuvo tejido de zonas de erupción dentaria, se observó un aumento considerable en prolina (proteínas totales), así como también en hidroxiprolina (colágena), con respecto al grupo control, siendo este grupo experimental el que presentó el mayor incremento. Sin embargo, el valor la relación Pro/OH-Pro fue muy semejante al del grupo control. Respecto a la síntesis de proteínas totales y colagénicas en las muestras obtenidas de pacientes en zonas de erupción dentaria se observó una capacidad biosintética muy semejante al grupo control, tanto para la síntesis de proteínas totales como para la síntesis de proteínas colagénicas. Los resultados obtenidos nos sugieren que en zonas de erupción dentaria pudiera existir una mayor actividad celular en el tejido, que se refleja tanto en la concentración como en la síntesis de colágena y otras proteínas no colagénicas, pero manteniendo una relación equilibrada en el recambio tisular.

En el grupo con periodontitis se observaron algunas variaciones en cuanto a la concentración de colágena. Debemos considerar que el tejido gingival analizado varió en cuanto a



las zonas en que se obtuvieron las muestras, así como el grado de enfermedad periodontal. Sin embargo, el contenido de prolina al compararse con el grupo control se mantuvo muy semejante a éste; en cuanto a los niveles de hidroxiprolina en algunas muestras se determinaron incrementos en hidroxiprolina y en otras disminuciones. Por ejemplo: en la muestra No. 5 (Tabla II), prolina se mantuvo muy semejante al valor del grupo control pero OH-Pro se encontró muy disminuída, por lo tanto la relación Pro-OH-Pro se incrementó. En este caso y a pesar de obtener una relación alta de Pro/OH-Pro, lo que nos sugieren estos datos es una disminución de concentración de colágena en un 50%, con respecto al grupo control. Sin embargo, en este grupo de pacientes en donde existió suficiente tejido gingival para obtener muestras con diferentes grados de periodontitis, se encontró que se mantiene una relación equilibrada de concentración de colágena y proteínas no colagénicas; por lo cual se sugiere que a pesar de que existe pérdida de substancia en esta enfermedad, el tejido gingival puede llegar a mantener su estructura siempre y cuando el factor causal sea eliminado o controlado (placa dentobacteriana).

En cuanto a la síntesis de proteínas totales y colagénicas, las muestras obtenidas de pacientes con periodontitis mostraron una mayor actividad de síntesis en proteínas colagénicas. Page et al. 1980, encontraron que la síntesis de proteínas totales y colagénicas en tejidos gingivales de perros

con periodontitis era mayor que en los tejidos sanos in vi-  
tro, y sugirieron que debido a la presencia de un gran número de células inflamatorias activas probablemente se inducen niveles elevados de síntesis proteica en los cultivos de tejido enfermo. Además, sugieren que la disminución de colágena madura en estos tejidos enfermos, se debe principalmente a degradación.

En el grupo de agrandamiento gingival inflamatorio (A.G.I.), debemos también considerar que las muestras obtenidas fueron tomadas de diferentes zonas, así como con distintos grados de agrandamiento gingival. Por lo cual existieron algunas variaciones en las muestras estudiadas. Al analizar los valores obtenidos en prolina tisular, podemos considerar una ligera disminución al comparar los valores obtenidos en este grupo experimental con los del grupo control. Sin embargo, en algunos casos se mantiene muy semejante a éste, lo cual resulta en un incremento de la relación Pro/OH-Pro. Los valores obtenidos para hidroxiprolina se encontraron por debajo de los del grupo control, lo cual nos indica una disminución considerable en cuanto a la concentración de colágena.

Las muestras utilizadas en los ensayos de biosíntesis mostraron una mayor capacidad para la síntesis de proteínas no colagénicas, correspondiendo a este grupo el valor mayor de síntesis con respecto a los demás grupos experimentales.

La capacidad biosintética para proteínas colagénicas se encontró disminuída, lo cual nos sugiere que el agrandamiento gingival inflamatorio se debe principalmente al edema extracelular y al infiltrado celular inflamatorio.

El agrandamiento gingival causado por difenil-hidantoína (A.G.D.), fármaco utilizado en el tratamiento de pacientes epilépticos, se presenta aproximadamente en un 50% de los sujetos que ingieren esta droga, observándose con mayor frecuencia en adultos-jóvenes y niños. El A.G.D. varía en sus manifestaciones clínicas de un sujeto a otro y también se ha observado que varía de una zona a otra en un mismo individuo, siendo más extenso en la zona de dientes anteriores superiores en la superficie vestibular y menos pronunciado en la superficie palatina o lingual. El mecanismo de acción de la droga en este aspecto y la razón por la cual tiene un efecto hiperplástico muy selectivo por este tejido son totalmente desconocidos.

En las muestras analizadas en este grupo se observó que los valores encontrados para prolina fueron semejantes al grupo control. Sin embargo, los valores obtenidos para hidroxiprolina se encontraron disminuídos, lo cual sugiere una menor concentración de colágena con respecto al grupo control, así como los demás grupos experimentales. Las muestras analizadas para biosíntesis mostraron una mayor capacidad de sínte

sis tanto para proteínas no colagénicas como para proteínas colagénicas, siendo este grupo experimental el que demostró tener una mayor actividad celular. Estos resultados sugieren que al existir un incremento en el número de células, y en consecuencia un mayor metabolismo, se puede sintetizar una mayor cantidad de proteínas. De acuerdo a estudios realizados por Aas 1963, describe que los haces de fibras se incrementan en número; sin embargo, las fibras son más delgadas, cortas y no tienen una orientación definida. Ubaidy et al. 1981, observaron un índice mitótico mayor en cultivos de fibroblastos de rata tratados con fenitoína que en fibroblastos normales. - Hassel et al. 1978, demostraron que los fibroblastos aislados de tejidos afectados por difenil-hidantoina producen colágena a una velocidad mayor que las células control.

#### ACTIVIDAD COLAGENOLITICA EN FLUIDO CREVICULAR GINGIVAL DE PACIENTES CON ENFERMEDAD PERIODONTAL CRONICA.

Brill & Krasse en 1958 introdujeron puntas de papel filtro estériles en el surco gingival de perros, a los cuales les inyectaron por vía parenteral fluoresceína de sodio como marcador y demostraron que podía ser recuperada después de colocar las tiras de papel filtro durante 3 minutos.

Egelberg en 1966 y Theilade en 1971, notaron que la irritación ligera ocasionada cuando se secaba la encía con -

jeringa de aire, podía estimular el aumento en el flujo del fluido crevicular. Egelberg 1966 al estudiar la microcirculación gingival determinó que el plexo vascular terminal subyacente al epitelio del surco gingival, estaba localizado superficialmente, lo cual corroboró posteriormente con estudios relacionados a las cantidades obtenidas de fluido crevicular gingival correlacionadas con la permeabilidad vascular alterada. Estos resultados también aclararon la gran controversia que existía respecto a la presencia o ausencia del fluido crevicular en encías sanas de perros en donde no se encontró producción de fluido. Se observó que se producía fluido únicamente cuando el epitelio crevicular del surco gingival era irritado, lo cual se explicó se debía a un incremento en la permeabilidad vascular. Es importante mencionar que la aparición de fluido crevicular gingival relacionada al aumento de la permeabilidad vascular es característica de la inflamación aguda. Sin embargo, en encías con inflamación crónica después del secado con jeringa de aire, con el cepillo dental o con la irritación mecánica, al colocar puntas de papel filtro en el surco gingival se puede producir o incrementar el flujo del fluido crevicular. Posteriormente Egelberg y Attstrom en 1974, confirmaron que las cantidades obtenidas de fluido crevicular estaban directamente relacionadas al grado de inflamación gingival. Borden et al. 1974, demostraron que no todas las encías sanas producían un aumento en el flujo del fluido crevicular cuando se colocaban puntas de papel filtro

en el surco gingival. Después de todos estos estudios se concluyó que la inserción de puntas de papel filtro no estimulaba el flujo del fluido en encías verdaderamente sanas, pero podía estimularlo en encías subclínicamente inflamadas.

Se han realizado múltiples estudios en cuanto a actividades enzimáticas en fluido crevicular, así como en la actividad colagenolítica que ha sido estudiada por Sueda & Cima-soni 1968, Ohlson et al. 1973, Golub et al. 1974, 1976, etc. Como se mencionó anteriormente la actividad colagenolítica en el fluido crevicular ha sido utilizada como un medio de diagnóstico en cuanto a la severidad de la inflamación gingival y periodontal.

En el presente trabajo se evaluó la actividad colagenolítica en fluido crevicular gingival de pacientes con gingivitis y periodontitis y un grupo de individuos con encía clínicamente sana. De acuerdo a los resultados obtenidos en el grupo de pacientes con gingivitis al compararse con el grupo control encontramos que en la forma de gingivitis leve prácticamente no existieron diferencias significativas. Consideramos que existe un límite muy estrecho en cuanto a las manifestaciones clínicas de una encía clínicamente sana y una gingivitis leve, por lo cual si observamos los porcentajes de degradación en las diferentes muestras (ver Tabla VI), encontramos tanto en el grupo control como en el de gingivi-

tis leve, escasa o nula actividad colagenolítica. En el grupo de gingivitis moderada, la actividad de colagenasa se incrementó aproximadamente tres veces con respecto al valor correspondiente al grupo control, lo cual nos sugiere que en este grado de inflamación gingival ya existe una degradación colagenolítica más activa. En el grupo de gingivitis severa el porcentaje de degradación se incrementó considerablemente, lo cual nos sugiere que en estos casos existen cambios significativos en cuanto a la capacidad tisular en degradar colágena. También consideramos que estos pacientes están en una etapa transitoria entre gingivitis y periodontitis, por lo que puede existir una etapa activa de la enfermedad periodontal y por lo tanto los mecanismos degradativos pueden estar incrementados.

En el grupo de periodontitis, las muestras correspondientes a periodontitis leve variaron entre si, encontrándose valores de entre 0 y 4.92% de degradación, en este grupo experimental; por lo cual podríamos sugerir que en algunos casos la enfermedad puede estar en una etapa de "remisión" o descanso, es decir, que podríamos estar evaluando una muestra de fluido crevicular de pacientes, cuya enfermedad periodontal se encuentra en una etapa pasiva. Sin embargo, algunas muestras analizadas demostraron que existía una apreciable actividad colagenolítica (3.76 y 4.92% de degradación), lo cual nos sugiere que también puede existir una etapa activa

de la enfermedad periodontal que puede llegar a estadios más avanzados.

En el grupo de periodontitis moderada se encontró también variación en las diferentes muestras, existiendo valores muy semejantes a los valores más elevados del grupo de periodontitis leve, es decir, de 3.88 y 4.33% de degradación así como valores mayores: 7.66% y 6.49%; lo cual nos sugiere que pueden existir etapas más activas de enfermedad periodontal.

En el grupo de periodontitis avanzada se encontraron los valores más elevados de actividad colagenolítica; de las 16 muestras analizadas, tres mostraron porcentajes de degradación de 6.70, 6.91 y 9.93% siendo los menores valores de degradación en este grupo experimental; cuatro muestras de pacientes con periodontitis en una etapa muy activa, los cuales presentaban bolsas periodontales con profundidad mayor de 7 mm, sangrado espontáneo y zonas eritematosas gingivales, la actividad colagenolítica correspondió a una degradación del 40.49%. Lo anterior nos sugiere que en estos pacientes el grado de destrucción gingival y periodontal está directamente relacionada a la actividad colagenolítica.

En las nueve muestras restantes, los porcentajes de degradación en promedio fueron muy semejantes a los valores



encontrados en el grupo de gingivitis severa. Estos resultados nos sugieren que en la inflamación severa y en estadios avanzados de la enfermedad periodontal crónica, existe un aumento muy importante en la actividad colagenolítica en el fluído crevicular gingival. Es importante mencionar que las muestras de fluído crevicular de los diferentes grupos analizados se obtuvieron después de un cepillado dental de 3 minutos, aislado; secado con jeringa de aire de la zona requerida y las puntas de papel filtro estériles se mantuvieron intracrevicularmente durante 5 minutos. Se consideró que esta técnica utilizada, estimulaba e incrementaba el flujo del fluído crevicular gingival en pacientes con enfermedad periodontal crónica, de acuerdo a los estudios hechos por Egelberg en 1966, Theilade en 1971 y Golub et al. 1974, 1976.



## R E S U M E N

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo con el objeto de analizar los posibles cambios cuantitativos en la concentración de colágena, así como la capacidad biosintética de proteínas totales y colagénicas de tejido gingival humano, obtenido de pacientes con zonas de erupción dentaria, periodontitis, agrandamiento gingival inflamatorio (A.G.I.), agrandamiento gingival causado por difenil-hidantoína (A.G.D.), y un grupo de tejido sano. Se tomaron biopsias para el estudio histológico. También se estudió la actividad colagenolítica en fluido crevicular de pacientes con enfermedad periodontal crónica (gingivitis y periodontitis) en colágena soluble acetilada, para lo cual se realizó la extracción y purificación de colágena a partir de piel de conejo.

En la concentración de colágena en el grupo de tejido sano se encontró un valor promedio de  $228.79 \pm (30.14)$  mg/gts, en el grupo con zonas de erupción dentaria  $361.29 \pm (35.82)$  mg/gts, en el grupo de periodontitis  $209.91 \pm (36.12)$  mg/gts, en el grupo de A.G.I.  $171.83 \pm (39.58)$  mg/gts, en el grupo de A.G.D. fue de  $177.03 \pm (46.64)$  mg/gts. En la síntesis de proteínas colagénicas se encontró un valor promedio de 25.85% de incorporación radiactiva para el grupo de tejido sano;  $26.51\% \pm (4.59)$  para el grupo de zonas de erupción dentaria;  $34.41\% \pm (4.34)$  para el grupo de periodontitis; en A.G.I.  $19.50\% \pm$

(4.70); en A.G.D. fue de  $36.54\% \pm (3.34)$ .

Para la actividad colagenolítica en fluido crevicular se encontraron los siguientes valores promedio de degradación. Grupo de Gingivitis: gingivitis leve  $1.13\% \pm (0.82)$ ; gingivitis moderada  $4.27\% \pm (0.47)$ ; gingivitis severa  $16.13\% \pm (4.31)$ . Para el grupo de Periodontitis: periodontitis leve  $2.74\% \pm (1.28)$ ; periodontitis moderada  $5.41\% \pm (1.55)$ ; periodontitis avanzada  $14.40\% \pm (5.74)$ ,  $40.49\% \pm (4.18)$ .

## C O N C L U S I O N E S

La concentración de colágena en los tejidos obtenidos de zonas de erupción dentaria se encontró ligeramente augmentada con respecto al grupo sano, en periodontitis se mantuvo un promedio muy semejante al grupo control. En los grupos de agrandamiento gingival de tipo inflamatorio y el causado por difenil-hidantoína se encontró disminuida.

Los tejidos obtenidos de sujetos sanos y con enfermedad periodontal demostraron tener capacidad biosintética de proteínas totales y colagénicas; el grupo de periodontitis demostró tener una mayor capacidad de síntesis de proteínas colagénicas. En el grupo de agrandamiento gingival de tipo inflamatorio se observó una mayor síntesis de proteínas no colagénicas, y en el grupo de agrandamiento gingival causado por difenil-hidantoína demostró tener una mayor capacidad para la síntesis de proteínas totales y colagénicas. El grupo de zonas de erupción dentaria se encontró muy semejante al grupo control.

El estudio histológico corroboró el diagnóstico clínico así como los hallazgos bioquímicos.

La actividad colagenolítica en fluido crevicular de pacientes con enfermedad periodontal crónica (gingivitis y

periodontitis) se encontró directamente proporcional al grado de inflamación gingival y periodontal.

## B I B L I O G R A F I A

- 1.- Aas F., 1963. Hyperplasia gingival diphenyl-hydantoin.  
Acta Odontol. Scand. 34:11.
- 2.- Abbott B.H. and R.G. Caffesse 1977. Crevicular Fluid.  
J. West Soc. Period., Period. Abst. Vol 25, No. 4: 164-  
178.
- 3.- Alfano M.C., Morhart R.E., Metcalf G. and Drummond J.F.  
1974. Presence of Collagenase from Clostridium histolyticum  
in gingival sulcal debris of a primitive population. J.  
Dent. Res. 53, 142.
- 4.- Bornstein P. and H. Sage 1980. Structurally distinct  
collagen types. Ann. Rev. Biochem. Vol. 49: 957-1003.
- 5.- Breitkreutz D., Díaz de León L., Paglia L., Zeichner M.,  
Wilczek J., Stern R. 1978. The synthesis of presumptive  
procollagen messenger ribonucleic acid in the calvaria  
of the developing chick embryo. Biochem. Biophys. Acta.  
Vol. 517: 349-359.
- 6.- Brill N. and Krasse B. 1958. The passage of tissue fluid  
into the clinically healthy gingival pocket. Acta. Odont.  
Scand. Vol. 16: 233.

- 7.- Cimasoni G., 1974. The crevicular fluid. Monographs in Oral Science, Vol. 3. ed. H.M. Myers, S. Karger Basel.
- 8.- Cimasoni G., Ishikawa I. and Jaccard F. 1977. Enzyme activity in the gingival crevice In: The borderland between caries and periodontal disease. Edited by Lehner T. pp. 13-41. Acad. Press. London.
- 9.- Díaz de León. L. Regulación de la Biosíntesis de la Colágena. 1984. Bol. Est. Med. Biol. (En prensa).
- 10.- Egelberg J. 1966. Permeability of the dentogingival blood vassels. II Clinically healthy gingiva. J. Period. Res. I: 276.
- 11.- Eisen, A.Z., Bauer E.A. and Jeffrey, J.J. 1971. Human Skin Collagenase: the role of alpha globulins in the control of activity in vivo and in vitro. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Vol. 68: 248-251.
- 12.- Fullmer H.M. and Gibson W. 1966. Collagenolytic activity in gingivae of man. Nature. Vol. 209, 12: 728-729 February.

- 13.- Geiger, S. and Harper E., 1980. Human gingival collagenase in periodontal disease: The release of collagen in gingival explants. J. Dent. Res. Vol. 59 No. 1: 11-16.
- 14.- Gibbons R.J. and MacDonald J.B. 1961. Degradation of Collagenous Substrates by *Bacteroides melaninogenicus*. J. Bact. Vol. 81: 614-621.
- 15.- Goldberg B. and Ravinovitch M. 1977. Connective Tissue Histology. Chap. 4 Leon Weiss. Ed. R.O. Greep.
- 16.- Golub L. M. and Kleinberg, I., 1976. Gingival Crevicular Fluid: A new diagnostic aid in Managing the periodontal patient. Oral. Sci. Rev. Vol. 8: 49.
- 17.- Gross J. and Lapiere, C.M., 1962. Proc. Acad. Sci. U.S. Vol. 48: 1014.
- 18.- Hammouda Mohamed S., S.R., Burcharda Brinkley, Mustafa, K.H. Dabbous and Jerry Jurand. 1980. Gingival Matrix Collagen in Chronic Periodontitis. J. Dent. Res. Vol. 59 (1): 17-22.



- 19.- Hardy F. Limeback., J. Sodek and Don M. Brunette. 1978. Nature of Collagens Synthesized by Monkey Periodontal Ligament Fibroblast in vitro. J. Biochem. Vol. 170: 63-71.
- 20.- Harris E.D. and Krane S.M. 1974. Collagenases. N. Engl. J. Med. Vol. 291: 557-563.
- 21.- Harper Elvin. Collagenases. 1980. Ann. Rev. Biochem. Vol. 49: 1063-1078.
- 22.- Hassel T.M., Page R.C. and Lindhe J. 1978. Histologic Evidence for impairment growth control in difenylhydantoin gingival overgrowth in man. Archives of oral Biology Vol. 23: 381.
- 23.- Jenkins Neil G. 1978. The Physiology and Biochemistry of the mouth. Blackwell Sci. Public. Fouth Ed. Chapter 2.
- 24.- Kowashi, Y., F. Jaccard and G. Cimasoni, 1979. Increase of free collagenase and neutral protease activities in the gingival crevice during experimental gingivitis in Man. Arch. Oral. Biol. Vol. 24: 645-650.

- 25.- Kuboki Yoshinori, Tohru Takagi, Satoshi Sasoki, Shigeru Saito, and Gerald L. Mechanic. 1981. Comparative Collagen Biochemistry of Bovine periodontium, Gingiva and Dental pulp. J. Dent. Res. Vol. 60 No.2: 159-163. Feb.
- 26.- Lazaruz, G.S., Daniels J.R., Brown R.S., Bladen, H.A. and Fullmer H.M. 1968. Degradation of Collagen by a human granulocyte collagenolytic system. J. Clin. Invest. Vol. 147: 2622-2629.
- 27.- Lefevere, M.F., G.A. Slegers and A.E. Claeys 1979. Evaluation of a rapid, sensitive and specific assay for the determination of Collagenolytic Activity in Biological Samples. Clin. Chimica Acta. Vol. 92: 167-175.
- 28.- Narayan A.S., and Page R.C. 1976. Biochemical Characterization of Collagen Synthesized by Fibroblast derived from normal and diseased human gingiva. Journal of Biol. Chemistry, Vol. 25, No. 18.
- 29.- Narayan A.S., Page R.C. and Kuzan F. 1978. Collagen Synthesized in vitro by Diploid Fibroblasts obtained from chronically inflamed human connective tissue. Lab. Inv. Vol. 39 No. 1: 61.

- 30.- Narayan A.S., Page R.C. and Meyers D.F. 1980.  
Characterization of Collagens of Disease Human Gingiva  
J. Biochemistry Vol. 19: 5037.
- 31.- Ohlsson K., Olsson I. and Tynelius B.G. 1973.  
Neutrophil leukocyte collagenase, elastase and serum  
protease inhibitors in human gingival crevices. Acta.  
Odont. Scand. Vol. 31: 51-59.
- 32.- Orłowski W.A. 1978. Metabolism of Gingival Collagen in  
a Rat. J. Dent. Res. Vol. 57 No. 2: 529-533. February
- 33.- Page, R.C., Ammons L.S., Schectman and Dillingham L.A.  
1974. Collagen fibre bundles of the normal marginal  
gingiva in the marmoset. Archs. Oral. Biol. Vol. 19:  
1039-1043. Pergamon Press.
- 34.- Page R.C. and Schroeder H.E. 1976. Pathogenesis of  
Inflammatory Periodontal Disease: A Summary of Current  
Work. Lab. Invest. Vol. 33 No. 3: 235-248.
- 35.- Page R.C., Narayanan. A.S. and Schroeder H.E. 1980.  
Connective tissue Composition and Collagen Synthesis  
in Diseased and Normal Gingiva of adult dogs with  
Spontaneous Periodontitis. Arch. Oral. Biol. Vol. 25:  
727-736.

- 36.- Page R.C. and Schroeder H.E. 1982. Periodontitis in Man and Other Animals. A Comparative Review. Basel; New York. Karger.
- 37.- Pérez Tamayo R. 1978. Pathology of Collagen Degradation. American Journal of Pathology. Vol. 92 No. 2. August.
- 38.- Prockop D.J. and Guzman N.A. 1977. Collagen Diseases and the Biosynthesis of Collagen Hospital Practice. December.
- 39.- Ramos A. Carlos 1981. Contenido y Síntesis de Colágena de Pulmón de Rata y Después de la Intoxicación Aguda con Paraquat.- Oxígeno. Tesis Fac. de Ciencias.
- 40.- Robertson P.B. and Simpson J. 1976. Collagenase: Current Concepts and Relevance to Periodontal Disease. J. Periodontal Vol. 47. No. 1 January.
- 41.- Rojkind M., Zincher S. and Díaz de León L. 1972. Regulation of Collagen Biosynthesis: A Regulatory Mechanism, Molecular Basis of Biological Activity. Gaede. K. Horecker. B and Wheland, W. eds. Acad. Press. New York.

- 42.- Rose G.G. and Robertson P.B. 1977. Collagenolysis by Human Gingival Fibroblast Cell Lines. J. Dent. Res. Vol. 56 No. 4. April.
- 43.- Simpson J.W., Mackler B.F., O'Neill P. and Mailman M.L. 1980. Identification of Collagenase in Cultured Blood Mononuclear Cells. J. Dent. Res. Vol. 59 No. 1: 2-10 January.
- 44.- Sodek J. 1977. A Comparison of the Rates of Synthesis and Turnover of Collagen and Non-Collagen Proteins in Adult Rat Periodontal Tissues and Skin Using a Microassay. Arch Oral. Biol. Vol. 22: 655-665.
- 45.- Ubaidy Al S., Janabi N. Y. Al, and Al-Tai S.A. 1981. Effect of Phenytoin on Mitotic Activity of Gingival Tissue and Cultured Fibroblasts. J. Periodontal. Vol. 52. No. 12 December.
- 46.- Uitto Veli J. and Raeste A.M. 1978 Activation of Latent Collagenase of Human Leukocytes and Gingival Fluid by Bacterial Plaque. J. Dent. Res. Vol. 57 No. 7-8 July - August.

- 47.- Uitto Veli J., Turto H. and Saxén L. 1978. Extraction of Collagenase from Human Gingiva. J. Periodontal Res. Vol. 13: 207-214.
- 48.- Woessner J.F. Jr. 1961. The Determination of Hydroxyproline in Tissue and Protein Samples Containing Small Proportions of this Imino Acid. Archives of Biochemistry and Biophysics. Vol. 93: 440-447.
- 49.- Woolley D.E. and Evanson J.M. 1980. Collagenase in Normal and Pathological Connective Tissues, Ed. Niley & Sons. Chapter 1.

Trabajo de Investigación en la Tesis para Obtener el Grado de Maestría, del 30 de abril de 1980 a Diciembre 1982, en el Departamento de Biología del Desarrollo en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M.