

DAÑO GENOTÓXICO DE LA APLICACIÓN CLÍNICA DE FLUORURO

Patricia Vázquez Alvarado,*² Francisco Prieto García,¹
Claudia Coronel Olivares,¹ Alberto José Gordillo Martínez,¹
Alejandra Hernández Ceruelos²

¹Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Área Académica de Química.

²Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias de la Salud, Área Académica de Medicina. *e-mail: patriciadear@gmail.com

Resumen

El daño genotóxico en la mucosa bucal inducido por NaF al 2% que se aplicó clínicamente a escolares no se ha documentado anteriormente. Se examinaron 30 escolares (doce mujeres, 18 hombres) de doce a quince años de edad (13 ± 1.14) en estudio transversal comparativo. El daño al ADN se determinó por ensayo Cometa, de cada sujeto se tomaron dos muestras, antes (controles negativos) y después de la aplicación (controles positivos). La electroforesis fue alcalina pH > 13; el análisis visual se hizo con microscopio epifluorescente. La información analizada ic 95% $P < 0.05$ con GraphPad InStat V 3.10. El índice de daño fue 58.3% con rupturas del ADN, en la prueba de Wilcoxon pareada $P < 0.0001$, existió diferencia estadísticamente significativa entre células epiteliales de controles negativos y positivos. La prueba t pareada se aplicó al momento de la cola, $P < 0.0001$; con diferencias estadísticas entre controles negativos ic (3.66, 9.42) y positivos ic (104.91, 131.83), con fuerte poder estadístico. La prueba t en la longitud de la cola $P < 0.0001$, altamente significativo; los controles negativos ic (113.64, 143.30), los positivos ic (113.64, 143.30). El NaF es un agente genotóxico, indujo la formación de rupturas en el ADN en exposiciones agudas en las células epiteliales de la mucosa oral.

Palabras clave: fluoruro de sodio, escolares, control positivo, control negativo, ensayo Cometa.

Introducción

El flúor es un elemento esencial en bajos niveles de concentraciones, tanto para los seres humanos como para los animales (Ling y Jian, 2006) y juega un papel importante en la

formación dental (principalmente en niños) y esquelética de los seres humanos (Griffin *et al.*, 2007). La exposición crónica a concentraciones de fluoruro mayores a lo establecido, causa problemas de fluorosis dental y esquelética y una mayor susceptibilidad a enfermedades renales y cáncer (WHO, 2004), así como daño al cerebro, reduciendo el coeficiente intelectual de niños en edad escolar (Wang *et al.*, 2007). El flúor es considerado un elemento traza potencialmente tóxico y tiene un margen de seguridad muy pequeño. Existen reportes controversiales sobre el beneficio de los fluoruros ya que en pequeñas cantidades ayudan a la prevención de la caries dental y es el principal uso que se le da en Odontología y en grandes concentraciones pueden perjudicar la salud dental y sistémica. Asimismo, causar múltiples efectos a nivel celular alterando la proliferación celular, la permeabilidad de membranas celulares y la apoptosis entre otros (Yan *et al.*, 2007).

El ensayo Cometa o gel de electroforesis unicelular (SCGE por sus siglas en inglés) es el método de elección para medir daño en el ADN de varias especies en células humanas tales como linfocitos. Se ha aplicado a estudios de poblaciones expuestas al medio ambiente y a diferentes agentes genotóxicos, incluyendo radiación, estrés químico y oxidativo (diabetes y enfermedad cardiovascular). El ensayo Cometa ha incrementado su popularidad en el uso de biomonitorio humano en estudios epidemiológicos (Lee *et al.*, 2004). Es notable por su versatilidad y la amplitud de sus posibles aplicaciones (Dusinska y Collins, 2008); ha demostrado ser valioso como método general para la detección de exposición genotóxica en humanos (Tice *et al.*, 2000; Dusinska y Collins, 2008). Cuando una medición individual de cometas es utilizada para grupos de población, se debe

obtener un error estándar bajo (Dusinska y Collins, 2008). Partiendo de esta premisa se destaca en gráficas el error estándar, en la presente investigación.

El propósito de este estudio fue evaluar si la aplicación clínica de NaF al 2% en gel indujo a daño tóxico en células epiteliales bucales. Para la medición de daño en el ADN en la mucosa bucal en 30 escolares de doce a quince años de edad que demandan atención bucodental en el Instituto de Ciencias de la Salud, se aplicó el ensayo Cometa de acuerdo con la técnica descrita por Tice *et ál.*, 2000, la metodología de Faccioni *et ál.*, 2003 para la obtención de células de la mucosa bucal, y Szeto *et ál.*, 2005 para la remoción de las membranas celulares. Los parámetros que se midieron tanto en los controles negativos como en los controles positivos fueron: índice de daño, momento de la cola (TM por sus siglas en inglés) y longitud de la cola (TL por sus siglas en inglés).

Materiales y métodos

Tamaño de la muestra. El tamaño de la muestra (n) no se pudo obtener a través del paquete estadístico epidemiológico de datos tabulados (Epidat, 2003), debido a que ya no se eligen escolares sino células bucales de escolares. Para determinar cuál sería la n real, se revisó la metodología de la literatura especializada en daño al ADN en células epiteliales bucales, y el ensayo Cometa por lo que la selección de la unidad final de muestreo se realizó con base en la n de 30 (Faccioni *et ál.*, 2003).

Selección de los escolares. Para la determinación de potencial genotóxico del fluoruro aplicado clínicamente se seleccionaron 30 escolares activos al azar que deberían cumplir con los siguientes criterios de inclusión: 1. Escolares de ambos sexos, 2. Escolares de doce a quince años de edad, 3. Escolares que aceptaran ser revisados, 4. Escolares que no presentaran fluorosis dental, 5. Escolares sin caries dental, 6. Escolares que no estuvieran en tratamiento ortodóncico, 7. Escolares que no fumaran, 8. Escolares que no tomaran alcohol, 9. Escolares que no se hubieran tomado radiografías recientemente y 10. Haber nacido en Pachuca, Hidalgo. Criterios de exclusión: 1. Escolares menores de doce y mayores de quince que no estén dentro del margen establecido. 2. Escolares que por alguna enferme-

dad infecto-contagiosa hiciera imposible la inspección bucal. 3. Escolares que no acepten colaborar con la investigación. 4. Escolares que no hayan nacido en Pachuca, Hidalgo. Criterios de eliminación: 1. Cambio de residencia, 2. Negación del permiso de la madre del escolar y 3. Muerte del escolar.

De cada sujeto se tomaron dos muestras, una antes de la aplicación tópica de NaF con cucharillas y la segunda al finalizar la aplicación la cual duró cuatro minutos en la boca; después se le retiraron las cucharillas y se le pidió al sujeto que escupiera e inmediatamente se procedió a tomar la muestra. El tiempo transcurrido entre retirar las cucharillas y la toma de la muestra fue aproximadamente de 30 segundos. Se prepararon por duplicado los portaobjetos antes de la aplicación y después de acuerdo con la siguiente metodología:

Los portaobjetos para el ensayo Cometa fueron preparados de acuerdo con el procedimiento estándar (Tice *et ál.*, 2000), sumergidos en agarosa normal 1% (APFN, In-vitrogen) fundida en PBS y derretida, y secados en la estufa a 37 °C. Para obtener la suspensión celular se le pidió al sujeto de estudio que se enjuagara la boca con agua bidestilada tibia varias veces, enseguida se le frotó gentilmente con el cepillo interdental la cara interna de la mejilla cuidando de no tocar la lengua, los dientes y la encía. El cepillo fue sumergido en tubo Eppendorf que contenía 200 μ L de PBS a 37 °C, se colocó en el agitador de tubos Vortex durante cinco segundos. Se utilizaron 10 μ L de la suspensión celular y 75 μ L de agarosa de bajo punto de fusión (ABPF, Sigma) al 0.5%, la mezcla anterior se sirvió sobre el microgel de agarosa normal extendiéndose sobre cada portaobjeto dejándolo endurecer sobre la placa de hielo. Se adicionó una segunda capa de ABPF y al solidificar se retiró el cubreobjetos del microgel, se sumergió en tripsina diluida en SSF al 0.25% por 30 minutos a 37 °C, seguido de un enjuague en solución de SSF a temperatura ambiente y se pasaron a la solución de lisis 4 °C y pH 10 por tres horas en condiciones de oscuridad y empleando únicamente luz amarilla indirecta. Transcurrido este tiempo se introdujeron los microgeles en una cámara de electroforesis submarina durante 30 minutos, inmersos en un amortiguador alcalino pH > 13 para desnaturalizar al ADN. Se corrió la electroforesis por 20 minutos a 25V y 300A, después de lo cual las células fueron

enjuagadas tres veces con *buffer* de neutralización. Los geles se deshidrataron en metanol absoluto durante cincuenta minutos y se secaron al aire. Los portaobjetos fueron teñidos con bromuro de etidio (Sigma). Se realizó el análisis visual con el microscopio de epifluorescencia Axiomager (Zeiss, Alemania) con objetivo calibrado para todas las lecturas de 20x/0.65 seco, filtro de excitación 515-560 nm y filtro barrera 590 nm. Se analizaron los parámetros: índice de daño, momento de la cola y longitud de la cola. Se leyeron 200 células antes de la aplicación de NaF y 200 después, haciendo un total de 400 por escolar; de los 30 escolares se analizaron visualmente 12 mil células.

Índice de daño. En cien células por escolar antes de la aplicación de NaF y cien células después de la misma se determinó el grado de daño que presentaban los núcleos, asignándoles valores del cero al cuatro de acuerdo con los criterios de Dhawan que fueron utilizados como patrón para contabilizar visualmente el grado de daño (Figura 1).

Con los datos obtenidos se calculó el índice de daño de acuerdo con la siguiente fórmula:

$ID = \# \text{ de núcleos grado } 0 (0) + \# \text{ de núcleos grado } 1 (1) + \# \text{ de núcleos grado } 2 (2) + \# \text{ de núcleos grado } 3 (3) + \# \text{ de núcleos grado } 4 (4)$ (Hernández A., 2003).

Análisis estadístico. Para el estudio comparativo entre

los controles negativo y positivo se utilizó la prueba pareada de Wilcoxon para índice de daño. Para determinar el momento de la cola y la longitud de la cola se usó la prueba t pareada. Se examinaron las diferencias estadísticas significativas con un intervalo de confianza (IC) de 95% y valor de $P < 0.05$. Todos los análisis fueron realizados en el paquete estadístico GraphPad InStat V 3.10 (2009).

Resultados y discusión

Se realizó una valoración transversal del índice de daño, TM y TL mediante el protocolo de ensayo Cometa sugerido por Tice *et al.*, (2000). Los 30 escolares de doce a quince años de edad cumplieron con todos los criterios de inclusión. De los escolares analizados, doce fueron mujeres y 18 hombres. Se obtuvo una media de edad de 13 ± 1.14 y varianza de 1.31.

Éste es el primer estudio que describió los efectos del NaF aplicado clínicamente usando como biomarcadores las células epiteliales de la mucosa bucal, utilizando el ensayo Cometa. Estas células son importantes debido a que son los sitios más comunes de transformación maligna (Szeto *et al.*, 2005).

En los controles negativos se detectaron cometas de grado cero a cuatro, de los cuales 2.7% (82 cometas) fueron grado cuatro; 0.8% (24) grado tres; 1% (26) grado

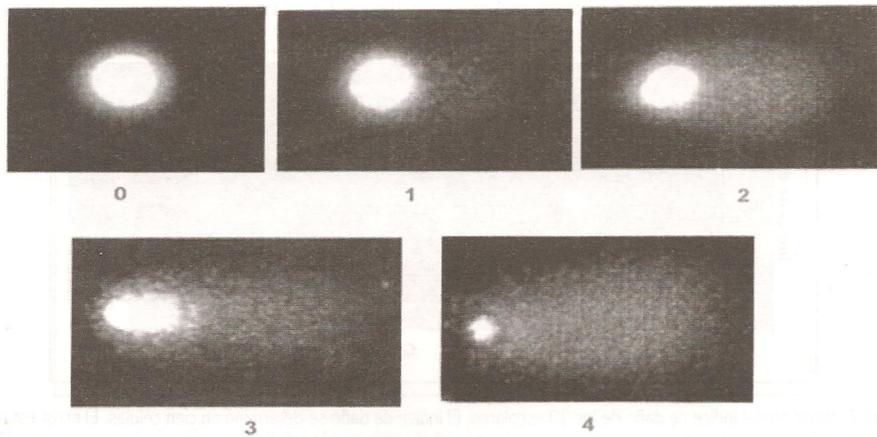


Figura 1. Categorías de cometas para contabilidad visual, clasificación de cien cometas del cero al cuatro según los criterios de Dhawan.

dos; 0.3% (10) grado uno y 95.2% (2858) grado cero; sólo 9.5% (142 células) presentó cometas de 3 mil células analizadas. En los controles positivos, 45% (1 354 cometas) fueron grado cuatro; 7% (213) grado tres; 3% (83) grado dos; 3.3% (99) grado uno y 41.7% (1 253) grado cero. El 58.3% (1 749 células) presentó cometas de 3 mil células analizadas, lo cual indica que más de la mitad de las células leídas presentaron rupturas de ADN. Se aplicó la prueba de Wilcoxon pareada con una estimación de confianza de IC 95%; $P < 0.05$, y se obtuvo una media de medias con un valor de P de doble cola < 0.0001 . Se comprobó que existe diferencia estadísticamente significativa entre las células epiteliales de los controles negativos antes de la aplicación de NaF y los controles positivos después de la aplicación. Los controles negativos tuvieron Intervalos de Confianza (IC) de (10.20, 20.53) y los positivos, IC (188.27, 233.66) denotan un fuerte poder estadístico y permiten una seguridad de un 95% de que los IC incluyen la media de la población. La prueba de normalidad de Kolmogorov y Smirnov (KS) en los controles positivos y en los negativos obtuvo $P > 0.10$ en todas las pruebas y pasó la prueba de normalidad (distribución Gaussiana). La media de medias fue de 210.97 para los controles positivos y un error es-

tándar bajo de 11.09. El error estándar cuantifica con qué precisión se conoce la verdadera media de la población. Entre más bajo o alejado de la media mayor es la precisión de ésta. La media de los controles negativos fue de 15.36 con un error estándar de 2.52 (Figura 2).

Momento de la cola (TM). De todos los parámetros el momento de la cola provee la estimación más estable de daño en el ADN porque tiene un grado muy largo de uniformidad en las dispersiones de cuartiles. Es el parámetro más apropiado de comparación, ya que se expresa en unidades reales. El momento de la cola (*Tail moment*) se ha definido como el porcentaje de ADN en la cola multiplicado por la longitud entre el centro de la cabeza y la cola (Lee et al., 2004). La prueba t pareada, con una estimación de confianza de 95%; $P < 0.05$, se aplicó al TM de las células epiteliales antes y después de la aplicación de NaF, y se obtuvo una media de medias con un valor de P en doble cola < 0.0001 , lo que confirma que existen diferencias significativas entre las células epiteliales que no tuvieron contacto con fluoruro y las que sí lo tuvieron. Los controles negativos con IC (3.66, 9.42) y los positivos IC (104.91, 131.83) observaron fuerte poder estadístico. La media de medias del TM para los controles positivos fue de 118.37 con un

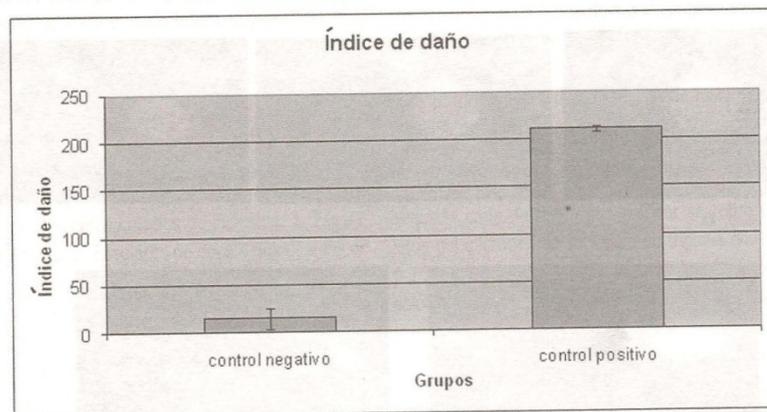


Figura 2. Medición del índice de daño de los 30 escolares. El índice de daño se determinó en cien células. El error estándar para el control positivo fue de 11.09 y para el negativo 2.52.

* Diferencia estadísticamente significativa ANOVA y t de Student $p < 0.05$.

error estándar de 6.58 y para los negativos fue 6.54 y un error estándar de 1.40. Podemos aseverar que la media es correcta en los dos controles ya que el error estándar está bastante alejado de la media (Figura 3).

Longitud de la cola (π). El valor en P de doble cola fue >0.0001 , considerado extremadamente significativo; establece diferencias estadísticas entre las células no expuestas y las expuestas a fluoruro, que indujo al daño tóxico de las células epiteliales. Los controles negativos con la IC (113.64, 143.30) y los positivos con la IC (113.64, 143.30). El valor de la media en los controles positivos fue de 128.47, con un error estándar de 7.25 y en los negativos 10.29, y 2.25 respectivamente. El error estándar en ambos grupos fue bajo lo cual determinó que la media en ambas poblaciones fuera verdadera (Figura 4).

Además de los efectos adversos ya señalados, ha sido reportado que la fluorosis (aguda, crónica o subcrónica) produce en el organismo un aumento en la producción de radicales libres derivados del oxígeno (RLO) los cuales pueden producir alteraciones a proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos (Chinoy, 2003). La lipoperoxidación es el resultado de la agresión de los radicales libres superóxido (O_2^-) a los ácidos grasos polinsaturados de las membranas celulares. El producto secundario a esta reacción es el malondialdehído (MDA) cuya presencia se considera un indicador de daño a la célula provocado por los RLO.

El fluoruro puede causar lipoperoxidación, daño en el ADN y apoptosis y existir una relación entre estos cambios (Wang *et ál.*, 2007). Puede inducir a la producción excesiva de RLO y disminuir actividades biológicas de algunas sustancias como la catalasa, superóxido dismutasa, xantina oxidasa y glutatión peroxidasa que juegan un papel muy importante como antioxidantes y en la eliminación de radicales libres (Karaoz *et ál.*, 2004).

Cuando a nivel celular existe un aumento importante en la producción de RLO debido a la disminución de antioxidantes o una sobreproducción de los mismos, se produce estrés oxidativo, el cual se caracteriza por el ataque de los RLO a las macromoléculas, esto puede derivar en un daño irreparable a los ácidos nucleicos lo que produce apoptosis (Chinoy, 2003). Asimismo, se ha reportado que el fluoruro puede tener dos efectos, por un lado promover la proliferación de células y por otro apoptosis (Yan *et ál.*, 2007). Una de las manifestaciones de intoxicación por fluoruro es la producción excesiva de RLO en diferentes tejidos. Sin embargo, no hay ningún estudio que reporte cometas con la aplicación clínica del NaF y el efecto que tiene en las células epiteliales de la mucosa bucal. Para la medición de daño en el ADN en la mucosa bucal de 30 escolares de doce a quince años de edad se aplicó el ensayo Cometa de acuerdo con la técnica descrita por Tice *et ál.*, 2000. En el presente trabajo se demostró que la exposición aguda a NaF provo-

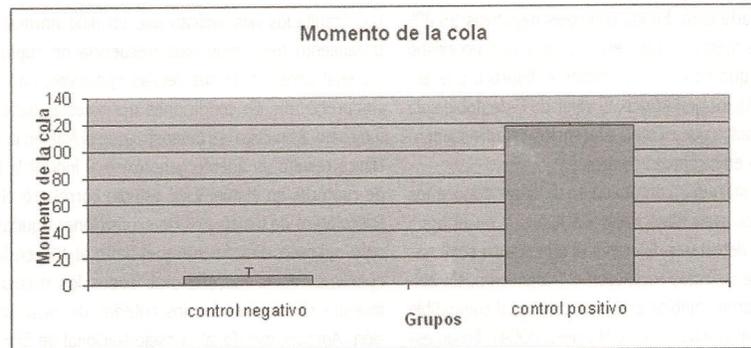


Figura 3. El momento de la cola fue determinado en cien células. Se observó un error estándar bajo, tanto en los controles positivos 6.58 como en los negativos 1.40.

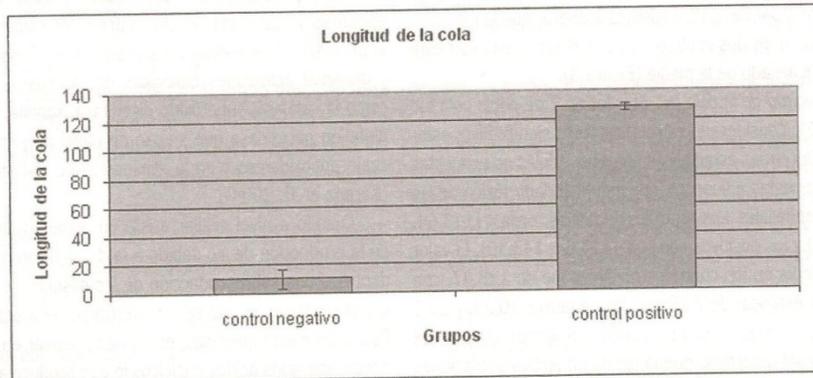


Figura 4. La media de medias tanto para los controles positivos como para los negativos obtuvo un error estándar bajo de 7.25 para los positivos y 2.25 para los negativos.

* Diferencia estadísticamente significativa ANOVA y t de Student $p < 0.05$.

có genotoxicidad posiblemente a través de mecanismos de estrés oxidativo inductor de daño al ADN, sin embargo, se requieren más estudios para conocer cómo se realiza este proceso en humanos.

Al medir el índice de daño en los controles positivos, 45% (1 354 cometas) fueron grado cuatro; 7% (213) grado tres; 3% (83) grado dos; 3.3% (99) grado uno. Esto implica que 58.3% presentaron daño basal inducido por la presencia de fluoruro posterior a la aplicación. El 41.7% (1 253) fue grado cero. En los controles negativos 95.2% de los cometas fueron grado cero, es decir que no existió daño basal ya que no estuvo presente el fluoruro que actuara como inductor genotóxico. El valor de P de doble cola < 0.0001 demostró que existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos controles.

Estudios realizados con animales de laboratorio a los que les suministraron altas dosis de fluoruro en el agua para beber no detectaron fluorosis ni aun cuatro semanas después de que las ratas recibieron el tratamiento, sin embargo, presentaron cambios en la mucosa bucal compatible con estrés oxidativo (Gutiérrez y Morales, 2004). En un estudio *in vitro* a dientes extraídos de fetos humanos de 21 a 22 semanas se les administró fluoruro por 48 horas para observar baja proliferación celular y alto incremento en la

apoptosis (Yan *et ál.*, 2007). Los resultados indican que la aplicación clínica de fluoruro incrementa significativamente las rupturas del material genético y este potencial genotóxico en una exposición aguda concuerda con el potencial tóxico descrito en la literatura, sin embargo, es necesario realizar más estudios para determinar el impacto de este compuesto sobre las células de la mucosa oral.

Conclusiones

Los resultados nos indican que un niño normal antes del tratamiento tiene muy baja frecuencia de rupturas en el material genético de sus células epiteliales, con lo cual se comprobó que en condiciones normales el daño basal es muy bajo. Asimismo, se demostró que el NaF en la aplicación clínica resultó un agente genotóxico al inducir la formación de rupturas en el ADN. Este estudio corroboró el potencial toxicológico de los efectos de exposiciones agudas del fluoruro aplicado clínicamente y el daño al ADN en las células epiteliales de la mucosa oral. Todos los escolares de la muestra cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión. *Agradecimientos:* al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por otorgar la beca 231158/2163929.

Referencias

- Chinoy, N. J. 2003. Fluoride stress on antioxidant defence systems. *Fluoride* 36:141-148.
- Dhawan, A. 2009. Royal Society of Chemistry. www.rsc.org
- Dusinska, M. y A. Collins. 2008. The comet assay in human Biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis* 23(3):191-205.
- Faccioni, F., P. Franceschetti, M. Cerpelloni y M. Fracasso. 2003. *In vivo* Study on metal release from fixed orthodontic appliances and DNA damage in oral mucosa cells. *Am J. Orthod Dentofacial Orthop* 124:687-694.
- Griffin, S. O., E. Regnier, P. M. Griffin y V. Huntley. 2007. Effectiveness of fluoride in preventing caries in adults. *J. Dent Res* 86(5):410-415.
- Gutiérrez, J. y A. Morales. 2006. La ingesta de fluoruro de sodio produce estrés oxidativo en la mucosa bucal de la rata. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*: 11-22.
- Hernández, A. 2003. Antigenotoxicidad de aceite esencial *Matricaria chamomilla* evaluada en células somáticas y germinales de ratón. Tesis doctoral en prensa, 91.
- Karaoz, E., M. Oncu, K. Gulle, M. Kanter, F. Gultekin, S. Karaoz y E. Mumcu. 2004. Effect of chronic fluorosis on lipid peroxidation and histology of kidney tissues in first—and second— generation rats. *Biol Trace Elem. Res.* 102:199-208.
- Lee, E., E. Oh, J. Lee, D. Sul y J. Lee. 2004. Use of the Tail Moment of the Lymphocytes to Evaluate DNA Damage in Human Biomonitoring Studies. *Toxicol. Sci.* 81:121-132.
- Ling, F. H. y G. C. Jian. 2006. DNA damage, apoptosis and cell cycle changes induced by fluoride in rat oral mucosal cells and hepatocytes. *World J. of Gastroent* 12(7):1144-1148.
- Szeto, Y. T., I. F. F. Benzie, A. R. Collins, S. W. Choi, C. Y. Cheng, C. M. N. Yow y M. M. Tse. 2005. A buccal cell model comet assay: Development and evaluation for human biomonitoring and nutritional studies. *Mutat Res* 578:371-381.
- Tice R., E. Aguerri, D. Anderson y B. Burlinson. 2000. Single cell gel/comet assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ Molec Mutag* 35:206-221.
- Wang, S. X., Z. H. Wang, X. T. Cheng, J. Li, Z. P. Sang, X. D. Zhang, L. L. Han, S. Y. QIAO, Z. M. Wu y Z. Q. Wang. 2007. Arsenic and fluoride exposure in drinking water: children's IQ and growth in Shanyin County, Shanxi province, China. *Environ Health Perspec.* 115(4):643-7.
- World Health Organization (WHO). 2004. Fluoride in drinking water. Background document for development of WHO Guidelines for drinking-water quality, 9 p.
- Yang, Q., Y. Zhang, W. Li y P. K. Den Besten. 2007. Micromolar fluoride alters ameloblast lineage cells *in vitro*. *J Dent. Res.* 86(4):336-340.