



Daño a la mucosa bucal inducido por fluoruro de sodio en la rata: Aumento en los parámetros apoptóticos

Dr. José Gutiérrez-Salinas*

* Laboratorio de Bioquímica y Medicina Experimental, División de Investigación Biomédica.

Resumen

Objetivo: Determinar los efectos de la ingesta de fluoruro de sodio (NaF) sobre la mucosa bucal de la rata, manifestado por cambios en la expresión de las proteínas p53, bcl-2 y caspasa-3 como indicadoras de un proceso de apoptosis, así como en la actividad de la enzima amilasa salival como indicador de la función de la mucosa. **Material y métodos:** ratas macho fueron expuestas a NaF (1 y 50 ppm) hasta por ocho semanas, las cuales fueron sacrificadas semanalmente. La mucosa bucal fue aislada y se determinó la expresión de las proteínas p53, bcl-2 y caspasa-3 por medio de técnicas de Western-blot mientras que la actividad de la enzima amilasa fue determinada por métodos espectrofotométricos. **Resultados:** mostraron que el tratamiento con 50 ppm de NaF produce un incremento en la expresión de las proteínas p53 y caspasa-3 así como una disminución importante en la actividad de la enzima amilasa. Estos resultados señalan que la intoxicación con NaF puede ser un inductor de apoptosis en la mucosa bucal en ratas intoxicadas hasta por ocho semanas.

Palabras clave: Amilasa salival, apoptosis, bcl-2, caspasa-3, fluoruro de sodio, mucosa bucal, p53.

Abstract

*The purpose of the present work is to determine the effects of the ingestion of sodium fluoride (NaF) on the buccal mucosa of the rat manifested by changes in the expression of proteins p53, bcl-2 and caspase-3 as indicative of an apoptosis process as well as in the activity of the amylase as indicator of the function of the mucosa. **Material and method:** Male rats were exposed to NaF (1 and 50 ppm) for eight weeks and were sacrificed weekly. Buccal mucosa was isolated and the expression of the proteins p53, bcl-2 and caspase-3 was determined by means of Western-blot technique. On the other hand, amylase activity was determined by spectrophotometry **Results:** the treatment with 50 ppm of NaF produces an increment in the expression of the p53 and caspase-3 as well as an important decrease in the activity of the amylase. These results point out that the intoxication with NaF can be an apoptosis inductor in the buccal mucosa in rats intoxicated for eight weeks.*

Centro Médico Nacional «20 de Noviembre», ISSSTE, México D.F.

Recibido para publicación:
23-Febrero-2006

www.medigraphic.com

Key words: Apoptosis, bcl-2, buccal mucosa, caspase-3, p53, salivary amylase, sodium fluoride.

Introducción

La fluorosis es causada por una ingesta aguda o crónica de fluoruros y se caracteriza clínicamente en el humano por alteraciones tanto dentales como al sistema musculoesquelético y nervioso.^{1,2} Algunas manifestaciones clínicas descritas en sujetos intoxicados con fluoruro son la parálisis de los labios, presencia de vértigo, espasticidad de las extremidades y desorientación general.^{2,3}

A nivel celular, ha sido reconocido que la intoxicación con fluoruro puede producir diversas alteraciones metabólicas tales como inhibición de la glucólisis, alteración de receptores membranales, alteraciones en el balance energético total, ruptura del ADN e inducción de apoptosis.⁴⁻⁷

En este último caso, se ha postulado que la apoptosis inducida por un exceso en la ingesta de fluoruro es producida en parte por un fenómeno asociado a la producción de radicales libres derivados del oxígeno (RLO) quienes, al ser moléculas altamente reactivas, pueden inducir alteraciones a las biomoléculas como son las proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos.⁸ Ha sido descrito que la aplicación de fluoruro de sodio (NaF) como principal fuente de fluoruro a células en cultivo puede inducir un exceso en la expresión de la proteína p53 que es una proteína que se expresa cuando existe daño al ADN.⁹ Por otro lado, ha sido descrita la inducción de apoptosis en células epiteliales de pulmón humano cultivadas con cantidades crecientes de NaF, así como alteraciones generales en macrófagos alveolares en cultivo.^{10,11} Además, ha sido descrito que la incorporación de fluoruro en la dieta en animales de experimentación puede ocasionar daño al hígado, expresado como inducción en la expresión de las caspasas (que son los efectores últimos de la apoptosis); así como de la proteína bcl-2 (proteína activada durante la apoptosis).^{12,13}

Es conocido el hecho de que la boca es una de las principales vías de entrada en los seres vivos, muchos compuestos tóxicos tienen su primer contacto con el organismo por medio de la mucosa que reviste a la cavidad bucal. Dicha mucosa es constantemente agredida por sustancias tales como el NaF que se encuentra en concentraciones variables en los productos dentales, como son pastas y geles, los cuales son usados diariamente por la población en general.

Puesto que ha sido reconocido que el flúor puede ser una sustancia tóxica para el organismo cuando es ingerido o se aplica a las células, el objetivo del presente trabajo es determinar los efectos de este compuesto sobre la expresión de las proteínas p53, bcl-2 y caspasa-3 como indicadores de apoptosis en la mucosa bucal de ratas que han recibido un tratamiento con NaF.

Material y métodos

Ratas macho (250 g peso promedio) de la cepa Wistar fueron obtenidas de los Laboratorio Harlam-México y ubicados en contenedores individuales en ciclos de luz-oscuridad de 12 h con libre acceso al agua y al alimento. Todos los procedimientos fueron hechos de acuerdo con los lineamientos contenidos en el Reglamento Sobre Tratamiento de Animales para Cirugía e Investigación de nuestra institución que está acorde con la Ley de Regulación Federal para Animales de Experimentación (SAGAR, México). Los reactivos químicos fueron obtenidos de Sigma (Sigma Chemical St. Louis, USA), de Merck (Merck de México SA) o de Mallinckrot (Mallinckrot de México S.A.) de grado analítico y de la mejor calidad posible.

Protocolo de tratamiento

Los animales fueron tratados de acuerdo a protocolos ya establecidos en donde se exponen a los animales de experimentación a concentraciones conocidas de fluoruro de sodio (NaF) que es agregado al agua de bebida corriente^{14,15} y monitoreando los cambios cada semana por el tiempo asignado al protocolo.

Las ratas fueron divididas aleatoriamente en los siguientes grupos de estudio (25 animales por grupo):

- a) **Grupo control.** Ratas sin tratamiento alguno que ingieren alimento (Rat Pellet Chow, Purina Inc. MO, USA), en forma libre y agua proveniente de contenedores de agua para consumo humano (Agua embotellada Electropura, The Pepsi Bottling Group México S de RL de CV). De acuerdo a los análisis químicos, dicha agua presenta una concentración de fluoruros < 0.5 ppm considerándose dentro de límites normales y que ha sido reportado que no interfiere en el experimento.
- b) **Grupo experimental 1.** Ratas a las cuales se les agregó en su agua de bebida una concentración NaF equivalente a 1 ppm de fluoruro y con libre acceso al alimento.
- c) **Grupo experimental 50.** Ratas a las cuales se les agregó en su agua de bebida una concentración de NaF equivalente a 50 ppm de fluoruro y con libre acceso al alimento.

Una vez iniciado el tratamiento, las ratas de todos los grupos en estudio fueron sacrificadas semanalmente (5 por grupo) hasta por ocho semanas. Durante todo el tiempo que duró el tratamiento, el agua era sustituida cada 24 horas por agua fresca y los datos bromatológicos fueron registrados semanalmente.

Obtención y procesamiento de la mucosa bucal

Previa anestesia (vapores de éter etílico), las ratas fueron sacrificadas por decapitación como ya ha sido descrito previamente.¹⁶ La cabeza fue colocada en un soporte de madera y se procedió a abrir la cavidad bucal para aislar el total de la mucosa bucal (mucosa del paladar duro y blando, mucosa yugal, piso de la boca y las encías del maxilar y la mandíbula) de acuerdo a métodos previamente descritos.¹⁷ Una vez aislada, la mucosa bucal fue colocada en una solución amortiguadora fría de fosfatos (PBS; NaCl al 0.9% en 0.01M de buffer de fosfatos, pH 7.0) para ser dividida en pedazos pequeños con una tijera y ser lavada con la misma solución para eliminar la sangre. Posteriormente, los pedazos de mucosa fueron colocados con 2 volúmenes de una solución de PBS-EDTA (PBS agregado de 1mM de EDTA y 0.05% de aprotinina y Na_3VO_4) y fueron homogeneizados en un aparato tipo Ultra-turrax (Fisher Scientific, USA). Las muestras así homogeneizadas fueron congeladas a -80 °C hasta su uso posterior.

Determinación de la actividad de amilasa

La mucosa bucal de la rata posee glándulas salivales, las cuales producen la enzima amilasa que ha sido usada como indicador de funcionalidad de la mucosa bucal. La actividad de la amilasa fue determinada de acuerdo al procedimiento de Nicolau y cols.¹⁸ usando el reactivo de Somogyi-Nelson. Brevemente, muestras de mucosa fueron mezcladas en un tubo de ensaye agregado de 1.5 mL de solución de almidón (0.2%) y 1.5 mL de buffer de Tris (Tris-base 0.1 M, pH 7) y 0.4 mL de agua destilada. La mezcla fue incubada 60 min a 37 °C, al término de los cuales, una alícuota fue mezclada con una cantidad equivalente de reactivo de Somogyi-Nelson haciendo una lectura a 520 nm en un espectrofotómetro (Jenway 6300, Cielovista, Cal. USA) usando un estándar de maltosa. La actividad de la amilasa fue expresada como $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg proteína total}$.

Extracto total de mucosa bucal

Muestras de homogenado total de mucosa bucal de todos los grupos de estudio fueron diluidos con partes equivalentes (v/v) de un buffer (Tris, 0.01 M; sacarosa 0.255 M; EGTA 0.3 mM; pH 7.4) frío y homogeneizados 3 minutos con Ultra-turrax. El resultado fue centrifugado a 5,000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante fue recuperado y considerado como extracto total de mucosa. La concentración de la proteína total de las muestras fue determinado por el método de Lowry¹⁹ usando albúmina bovina como estándar.

Expresión de las proteínas p-53, bcl-2 y caspasa-3

Para analizar el curso temporal de la presencia de las proteínas indicadoras de daño celular, se llevó a cabo por medio de electroforesis discontinua en geles de archilamida por la técnica de Laemmli²⁰ seguido de un blot en papel de nitrocelulosa de acuerdo a métodos ya establecidos.²¹ Brevemente, muestras de extracto total de mucosa fueron mezcladas con un volumen equivalente de buffer de tratamiento (2-mercaptopetanol 2 mM; SDS 10%; glicerol 1%; PBS pH 8) y calentadas en baño María por 3 minutos. Terminada la incubación, muestras de la reacción (100 μg de proteína total) fueron colocadas en pozos de un gel de acrilamida/bis-acrilamida (12%/0.1% p/p, respectivamente) y sometidos a una corriente de 150 mV por 80 min en un aparato vertical para electroforesis (Bio-Rad Ltd, Hercules Ca. USA) con un buffer de corrida (Tris-base/SDS/glicina). Al término de la corrida, los geles fueron colocados en un aparato para electrotransferencia usando una membrana de nitrocelulosa como receptora y buffer de transferencia (Tris-base/glicina/metanol/SDS) frío. La transferencia se llevó por 80 min y 100 mA, al término de la cual, la membrana de nitrocelulosa fue teñida con una solución de rojo de Ponceau para determinar la ubicación de las proteínas. Posteriormente, la membrana se lavó tres veces con PBS y se incubó 60 minutos a temperatura ambiente en agitación continua en una solución de bloqueo (5% de leche descremada en polvo y 0.5% de tween-20). Al término de la incubación, se lavó tres veces con PBS y fue expuesta al anticuerpo primario (Santa Cruz Cal, USA) dirigido en contra de la proteína específica (p-53, bcl-2 o caspasa-3) incubando en agitación continua por 70 min y con solución de bloqueo. Al término de esta incubación, se lavó tres veces con PBS y se expuso por 60 minutos al anticuerpo secundario unido a peroxidasa. La membrana fue lavada tres veces con PBS y se reveló la presencia de las proteínas exponiéndolas con una solución de peróxido de hidrógeno (0.5%) y tetrametilbenzidina de acuerdo a las instrucciones incluidas en el kit comercial (Promega, USA) usado para tal fin. Una vez localizada la proteína requerida, la membrana fue escaneada en un equipo Alpha Imagen™ (V-3.3; 1200, USA) con sistema de documentación y análisis para determinar por medio de absorbancia (lectura a 600 nm) la cantidad aparente de cada proteína por muestra.²²

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados usando el programa estadístico GraphPad Prism versión 4.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego California, USA). Los resultados son expresados como promedios \pm error estándar

para todos los grupos en estudio. La diferencia entre grupos fue analizada por ANOVA de dos colas con un post-test de Tukey según corresponda, tomándose un valor mínimo de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

Resultados

Uno de los parámetros tomados en cuenta para evaluar el efecto general de un tóxico sobre la integridad de un sujeto en estudio, es llevar a cabo la determinación del peso corporal durante el tiempo que dure el tratamiento.¹⁴ En el cuadro I se muestra la ganancia de peso corporal tanto en el grupo control como en los que recibieron 1 ó 50 ppm de NaF a las ocho semanas de tratamiento. Como puede observarse, ninguna de las dosis administradas de NaF mostró tener un efecto significativo sobre la ganancia de peso corporal después de ocho semanas de tratamiento. Por otro lado, tampoco se observaron diferencias significativas en la cantidad de agua consumida diariamente por los animales y únicamente se observa un incremento en la cantidad semanal de NaF ingerida por el grupo que recibió 50 ppm, lo cual es completamente lógico, ya que dicho grupo consumió una concentración mayor de dicho compuesto en su agua de bebida corriente. Durante el sacrificio de los animales, éstos fueron examinados por un patólogo para denotar si existía algún cambio en la morfología de los órganos (en especial el hígado y los riñones) de los animales y el resultado fue negativo.

La figura 1 muestra el curso temporal de los cambios en la actividad específica de la enzima amilasa en la mucosa de las ratas tratadas con 1 ó 50 ppm de NaF. Como puede observarse, la dosis de 1 ppm de NaF no produce cambios en la actividad de la enzima a lo largo del tiempo en comparación al grupo control. Por el contrario, la dosis de 50 ppm produce una disminución importante ($p < 0.05$) en la actividad de la amilasa desde las dos semanas de tratamiento hasta disminuir cerca de un 20% ($p < 0.05$) a las ocho semanas.

Por su parte, las figuras 2 a 4 muestran el curso temporal de la expresión de las proteínas p53, bcl-2 y caspase-3 en la mucosa bucal de ratas tratadas con las dos dosis de NaF y determinado por escaneo de los Western Blot tal como fue descrito en la sección de material y métodos.

Como puede observarse, el grupo de ratas que recibió el tratamiento con 50 ppm de NaF presentó un incremento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) con respecto al grupo control en la expresión de las proteínas p53 (Figura 2) y caspase-3 (Figura 4) desde las dos semanas de tratamiento. Dicho incremento se mantuvo

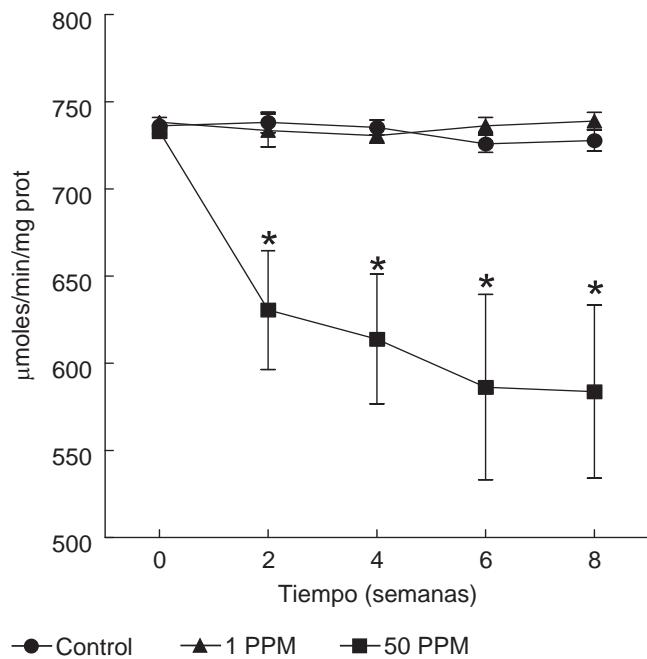


Figura 1. Curso temporal de la actividad específica ($\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ proteína) de la enzima amilasa en mucosa bucal de ratas tratadas por ocho semanas con 1 ó 50 ppm de NaF. Cada punto representa el promedio \pm E.E. de cinco ratas por tiempo. Los asteriscos denotan una diferencia estadística $p < 0.05$ en relación con el grupo control.

Cuadro I. Peso corporal, consumo de agua y dosis de NaF en ratas tratadas hasta por ocho semanas con 1 ó 50 ppm de NaF. Los resultados están expresados como promedios \pm E.E.

Tratamiento (n)	PPI (g)	PPF (g)	CAR (mL/día)	D-NaF (mg/kg/semana)
Control (25)	252.13 \pm 3.14	314.13 \pm 5.39	29.05 \pm 0.30	0
NaF 1 ppm (25)	252.70 \pm 3.32	312.23 \pm 3.32	31.05 \pm 0.32	0.868 \pm 0.01
NaF 50 ppm (25)	251.65 \pm 4.81	312.12 \pm 5.21	30.48 \pm 0.27	42.67 \pm 0.38

n: número de ratas por grupo

PPI: promedio de peso inicial

PPF: promedio de peso final

CAR: consumo de agua por rata

D-NaF: Dosis de NaF

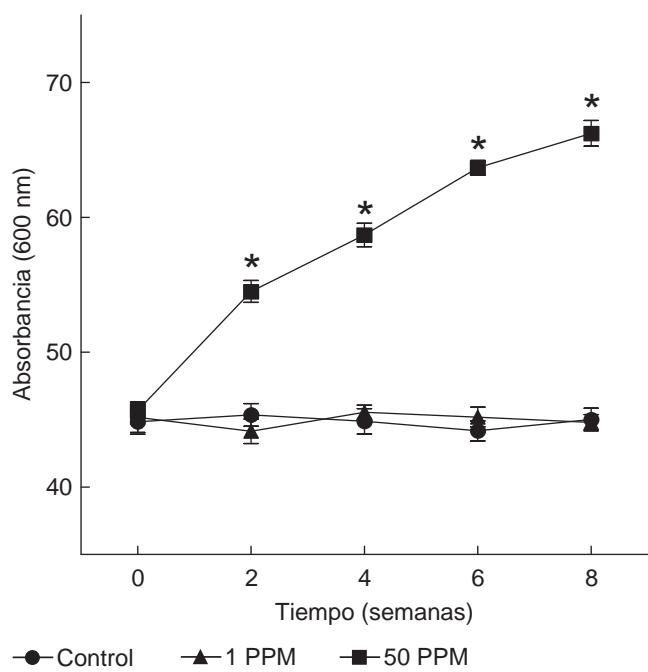


Figura 2. Curso temporal de la expresión de la proteína p53 en mucosa bucal de ratas tratadas con 1 ó 50 ppm de NaF por ocho semanas. Los Western-blot fueron escaneados a 660 nm y la cantidad relativa de proteína se expresa en unidades de absorbancia a lo largo del tiempo. Cada punto representa los escáner por duplicado de cinco ratas \pm E.E. Los asteriscos denotan una $p < 0.05$ con respecto al grupo control.

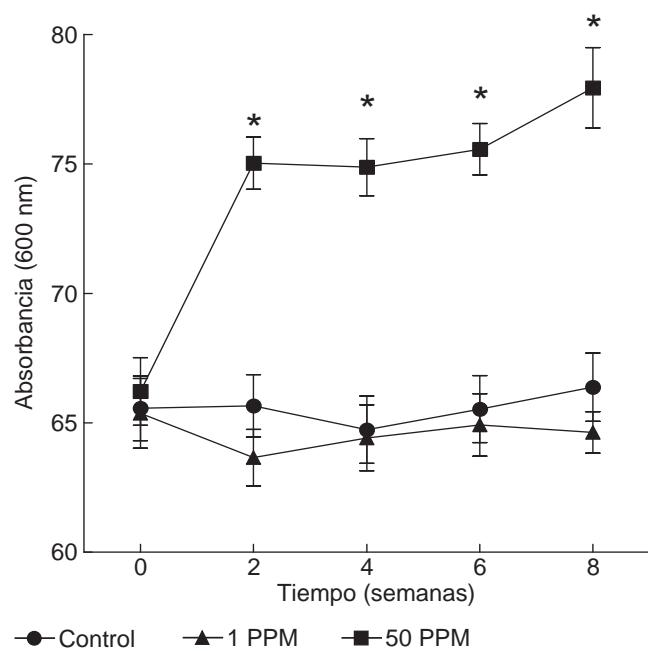


Figura 4. Curso temporal de la expresión de la proteína caspase-3 en mucosa bucal de ratas tratadas con 1 ó 50 ppm de NaF por ocho semanas. Las leyendas son igual a la figura 2.

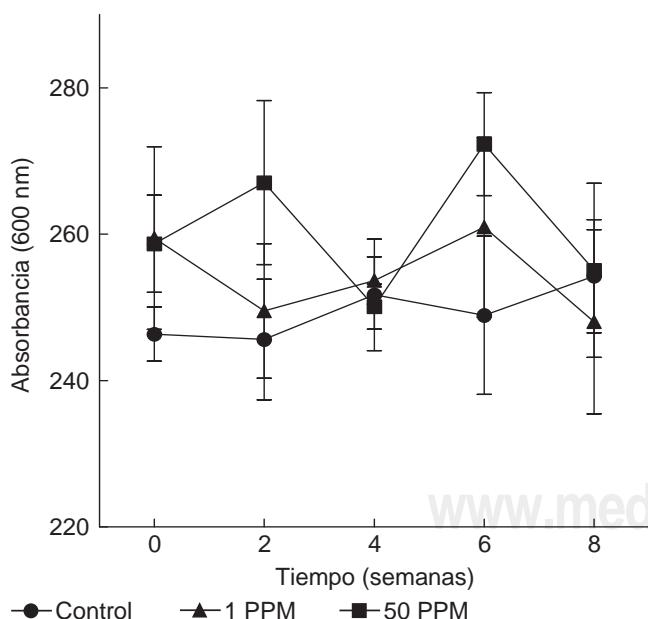


Figura 3. Curso temporal de la expresión de la proteína bcl-2 en mucosa bucal de ratas tratadas con 1 ó 50 ppm de NaF por ocho semanas. Las leyendas son igual a la figura 2.

a lo largo de las ocho semanas que duró el tratamiento con NaF y es de notar que la dosis de 1 ppm de NaF no presenta cambios con respecto al control, en la expresión de dichas proteínas.

Por su parte, la proteína bcl-2 muestra un patrón sostenido de expresión a lo largo del tiempo en el grupo control, no siendo así para los grupos tratados con NaF, ya sea con 1 ó 50 ppm (*Figura 3*). En ambos grupos se observa un patrón de expresión para bcl-2 irregular para cada tiempo en donde se llevó a cabo la determinación de dicha proteína, sin embargo, las diferencias en la expresión de bcl-2 para ambos grupos tratados con NaF no presentaron ninguna diferencia estadísticamente significativa entre ellos o comparados contra el grupo control.

Discusión

La ingesta de NaF incorporada al agua de bebida corriente en ratas machos tratadas con 50 ppm de NaF hasta por ocho semanas muestra una disminución importante en la actividad de la enzima amilasa, así como un incremento en la expresión de las proteínas p53 y caspase-3, tal como lo muestran los resultados descritos anteriormente. Dichos cambios, principalmente en la expresión de las proteínas p53 y caspase-3 pueden ser indicativos de un incremento de la apoptosis en las células de la mucosa bucal inducido por el NaF.

Los datos mostrados en el *cuadro I* al igual que los datos clínicos observados en los grupos de estudio señalan que el tratamiento con ambas dosis de NaF (1 y 50 ppm) no producen alteraciones generales visibles, las cuales han sido reportadas como potencialmente tóxicas por otros investigadores.^{2,4,14,15} Por otro lado, a la inspección general de la mucosa y los dientes de todos los grupos de estudio, tampoco se observaron signos visibles de fluorosis o algún tipo de signo que denote intoxicación, de acuerdo a parámetros ya establecidos.^{23,24} Lo anterior contrasta con lo encontrado por otros investigadores, quienes reportan el inicio de un moteado amarillo en los dientes con tratamientos con NaF que van de 5 a 300 ppm, y con un tiempo de tratamiento de 6 y hasta 21 semanas.^{2,4,14,15,25} Es probable que el tiempo de tratamiento que hemos usado (ocho semanas) no sea suficiente para producir tanto en la mucosa bucal como a nivel general, las alteraciones visibles propias de una fluorosis, sin embargo, los cambios encontrados tanto en la actividad de la enzima amilasa así como en la expresión de las proteínas p53 y caspasa-3 nos demuestran que existen cambios metabólicos a nivel de la mucosa bucal producidos por nuestro tratamiento que, si bien no se traducen en alteraciones clínicas visibles, sí denotan un efecto sobre la mucosa bucal producidas por el NaF, sobre todo a una dosis de 50 ppm.

La determinación de la actividad específica de la enzima amilasa ha sido considerado como un indicador del estado normal de funcionamiento de la mucosa bucal.²⁶⁻²⁸ El efecto de la ingesta de NaF sobre la actividad de la enzima amilasa ha sido reportada previamente,²⁶⁻²⁸ sin embargo, en dichos reportes se ha destacado que debe existir al menos un tiempo de 10 semanas de tratamiento continuo con hasta 300 ppm de NaF para observar algún cambio en la actividad de dicha enzima. Dicho tiempo mínimo de observación se ha basado en el hecho de reconocer que los animales expuestos a NaF deben alcanzar un grado de intoxicación clínica para poder observarse cambios metabólicos que puedan ser registrados; sin embargo, en nuestro modelo de tratamiento, se presenta una disminución importante en la actividad de la amilasa a las dos semanas de tratamiento con 50 ppm de NaF (*Figura 1*). Este resultado puede explicarse en razón de que, como fue mencionado en líneas anteriores, los investigadores procuran que los animales sometidos a tratamiento con NaF presenten signos clínicos o patológicos de intoxicación con dicho compuesto para considerar que dicho elemento tiene efectos sobre el organismo. Al respecto podemos afirmar que, si bien los animales no presentaron signos clínicos o patológicos de intoxicación con NaF, sí presentan una alteración en la enzima amilasa de la mucosa bucal, lo que puede indicar una sensibilidad metabólica a dicho compuesto sin expresión clínica de intoxicación.

Por otro lado, el incremento en la expresión de las proteínas p53 y caspasa-3 en el grupo de ratas que recibió una dosis de 50 ppm de NaF indican un incremento de apoptosis en las células de la mucosa bucal, ya que dichas proteínas son consideradas como indicativas de un proceso apoptótico (caspasa-3) por daño a la célula (proteína p53).^{13,29-31}

La proteína p53 ha sido descrita como un indicador de daño al ADN que se expresa posterior a una exposición a radiación o un tóxico.^{13,29-31} Si bien es cierto que un tejido que lleva a cabo un recambio continuo de células por un fenómeno normal de mitosis (como es el caso de los epitelios y mucosas) presenta una expresión mínima de proteína p53, es cierto también que dicha proteína se expresa en exceso cuando existe un tóxico en el organismo que altere la expresión génica o dañe al ADN.³¹ Por otro lado, la caspasa-3 es una proteasa que degrada al citoesqueleto de la célula durante un fenómeno exclusivamente apoptótico.³³ La mucosa bucal presenta un recambio continuo de células, las cuales mueren por un fenómeno de apoptosis.^{30,33} Como efectores de apoptosis se encuentran las caspasas cuyo representante más importante es la caspasa-3, ya que es una de las principales proteasas que intervienen durante la muerte celular programada.³¹⁻³³ Ha sido descrito que la exposición de un tejido a un tóxico puede incrementar la expresión de caspasas, en especial a la caspasa-3, como reflejo de un incremento en la apoptosis de dicho tejido.^{13,31-33} Por lo anteriormente mencionado, podemos suponer que el incremento en la expresión de p53 y caspasa-3 en ratas que fueron expuestas a NaF por ocho semanas a una dosis de 50 ppm incrementa considerablemente la apoptosis de la mucosa bucal. Dicha aseveración es reforzada por el hecho de que la presencia de NaF produce un patrón asincrónico de expresión de la proteína bcl-2 tal como lo muestra la *figura 3*. La proteína bcl-2 ha sido considerada un indicador temprano de entrada de la célula a la fase G1 del ciclo celular y su expresión se presenta de manera sincrónica a lo largo del mismo.³²⁻³⁵ Ha sido descrito que dicha proteína puede regular el fenómeno de apoptosis cuando es desregulada por un tóxico o la exposición de las células a radiación.^{34,35} Tal como se muestra en la *figura 3*, la presencia de NaF en cualquiera de las dosis probadas produce una asincronía en la expresión de bcl-2, lo cual, junto con los datos obtenidos para p53 y caspasa-3 podemos sugerir que el NaF induce un incremento en la apoptosis de las células de la mucosa bucal en la rata.

Dicho incremento en la apoptosis por efecto de la exposición de los tejidos o células al NaF ha sido reportado con anterioridad;¹⁰⁻¹² sin embargo, no existen reportes previos que describan el incremento de la apoptosis en la mucosa bucal.

El efecto del NaF sobre la mucosa bucal que hemos observado en este estudio nos da la pauta para suponer que dicho compuesto químico puede actuar como un agente tóxico para la mucosa bucal cuando éste tiene contacto con dicho tejido. El NaF es un compuesto químico capaz de atravesar las membranas celulares y puede llegar a la mucosa bucal, ya sea por vía sistémica en donde el NaF llega a la mucosa bucal por medio de la irrigación sanguínea tal como ocurre con otros órganos como el riñón, cerebro, hígado y genitales,^{2,14,15,36,37} o por contacto directo del químico con la mucosa cuando la rata bebe el agua agregada con NaF. Este último caso es muy importante, ya que el NaF es un compuesto ampliamente utilizado como agente anticaries agregado a las pastas y geles de uso popular para la limpieza dental, en concentraciones que pueden llegar a ser tan grandes como 1,500 ppm. Si bien es cierto el hecho de que el contacto directo del NaF con la mucosa bucal durante el cepillado de dientes para la higiene dental es breve, ha sido comprobado que el NaF altera la actividad de la enzima amilasa salival en sujetos que se enjuagaron la boca por breves segundos con una solución de NaF al 0.05%, sin embargo, existen discrepancias en ese punto entre varios grupos, ya que también se ha reportado que no existen dichos cambios.²⁶⁻²⁸

Tomando en cuenta lo anterior, podemos pensar que nuestros resultados señalan que la mucosa bucal es sensible a la presencia del NaF, ya sea que este tóxico lleve a dicho tejido por vía sistémica o local, y una vez en dicho tejido, éste responde modificando su patrón normal de apoptosis, sobre todo a dosis de 50 ppm. Es claro que se requieren más investigaciones para evaluar con mayor precisión los efectos que el NaF pueda tener sobre la mucosa bucal, sin embargo, podemos señalar que nuestros datos apuntan a que dicho compuesto puede producir un incremento en la apoptosis de las células de la mucosa bucal, que puede ser parcialmente responsable de los daños que han sido descritos en personas que usan pastas dentales agregadas con NaF a altas dosis, además de que existen reportes que señalan que la intoxicación ya sea aguda o crónica con fluoruro produce incrementos en la apoptosis de los tejidos expuestos a este tóxico.^{6,7,10-12,36,37}

Bibliografía

1. Rzeuski R, Chlubek D, Machoy Z. Interaction between fluoride and biological free radical reaction. *Fluoride* 1998; 31: 43-45.
2. Mullenix PJ, Denbesten PK, Schunior A, Kernan WJ. Neurotoxicity of sodium fluoride in rats. *Neurotoxicolo Theratol* 1995; 17: 169-177.
3. Jacyszyn K, Marut A. Fluoride in blood and urine in humans administered fluoride and exposed to fluoride-polluted air. *Fluoride* 1986; 19: 26-32.
4. Monsour PA, Kruger BJ. Effect of fluoride on soft tissues in vertebrates. *Fluoride* 1985; 18: 53-61.
5. Goh EH, Neff AW. Effects of fluoride on *Xenopus* embryo development. *Food and Chem Toxicol* 2003; 41: 1501-1508.
6. Machalinska A, Machoy-Mokrzynska A, Marlicz W, Stecewicz I, Machalinski B. NaF-induced apoptosis in human bone marrow and cord blood CD34 positive cells. *Fluoride* 2001; 34: 258-263.
7. Holland RI. Fluoride inhibition of protein and DNA synthesis in cells *in vitro*. *Acta Pharmacol Toxicol* 1979; 45: 96-101.
8. Gutiérrez-Salinas J, Morales-González JA. Production of free radicals derived from oxygen and hepatocyte damage. *Med Int Mex* 2004; 20: 287-295.
9. Wang AG, Chu QL, He WH, Xia T, Liu JL, Zhang M, Nussier AK, Chen XM, Yang KD. Effects on protein and mRNA expression levels of p53 induced by fluoride in humans embryonic hepatocytes. *Toxicol Lett* 2005; 158: 158-163.
10. Refsnes F, Lag T, Skuland T, Samuelsen J, Schwarze P. Fluoride-induced apoptosis and necrosis in a human lung epithelial cell line: involvement of PKA and PKC-mediated mechanism. *Toxicol Lett* 1998; 95(Supp 1): 107.
11. Hidaro S, Ando M. Apoptotic cell death following exposure to fluoride in rat alveolar macrophages. *Arch Toxicol* 1996; 70: 249-251.
12. Zhan XA, Wang M, Xu ZR, Li WF, Li JX. Evaluation of caspase-dependent apoptosis during fluoride-induced liver lesion in pigs. *Arch Toxicol* 2005; 78: 145-156.
13. Morales-González JA, Bueno-Cardoso A, Marichi-Rodríguez F, Gutiérrez-Salinas J. Programmed cell death (apoptosis): the regulating mechanisms of cellular proliferation. *Arch Neurocienc (Mex)* 2004; 9: 85-93.
14. Darmani H, Al-Hiyasat AS, Elvetieha AM. Effects of sodium fluoride in drinking water on fertility in female mice. *Fluoride* 2001; 34: 242-249.
15. Shivarajashankara YM, Shivashankara AR, Gopalakrishna Bhat P, Rao S. Brain lipid peroxidation and antioxidant systems of young rats in chronic fluoride intoxication. *Fluoride* 2002; 35: 197-203.
16. Gutiérrez-Salinas J, Garduño-Miranda L, Trejo-Izquierdo E, Díaz-Muñoz M, Vidrio S, Morales-González JA, Hernández-Muñoz R. Redox state and energy metabolism during liver regeneration. *Biochem Pharmacol* 1999; 58: 1831-1839.
17. Vaidya MM, Wawant SS, Borges AM, Narres NK, Purandare MC, Bhisey AN. Cytokeratin expression in human fetal tongue and buccal mucosa. *J Biosc* 2000; 25: 235-242.
18. Nicolau J, Ferreira ML. *In vitro* and *in vivo* effects of fluoride solution on human salivary amylase. *Fluoride* 2001; 34: 55-60.
19. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AI, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 1: 265-275.
20. Laemmli VK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
21. Towbin H, Gordon J. Immunoblotting and dot immunobinding. Current status and out-look. *J Immunol Methods* 1984; 72: 313-340.
22. Gutiérrez-Salinas J, Morales-González JA, Vargas-Castro LD, Marichi-Rodríguez F, Esquivel-Soto J. Changes in laminin ex-

- pression in periodontal ligament from theet sujet to orthodontic pressure in humans. *Rev ADM* 2005; 62: 171-176.
- 23. Denbesten PK. Effects of fluoride on protein secretion and removal during enamel development in the rat. *J Dent Res* 1986; 65: 1272-1277.
 - 24. Denvesten PK. Mechanism and timing of fluoride effects on developing enamel. *J Pub Health Dent* 1999; 59: 274-251.
 - 25. Heindel JJ, Bates HK, Price CJ, Marr MC, Myers CB, Schwetz BA. Developmental toxicity evaluation of sodium fluoride administered to rats and rabbits in drinking water. *Fund App Toxicol* 1996; 30: 162-177.
 - 26. Nicolau J, Ferreira ML. *In vitro* and *in vivo* effects of fluoride solution on human salivary amylase. *Fluoride* 2001; 34: 55-60.
 - 27. Hara K, Yu MH. Effect of fluoride on human salivary amylase activity. *Fluoride* 1995; 28: 71-74.
 - 28. Shahed AR, Biondi J, Allmann DE. Effect of NaF on rat parotid gland amylase activity and cAMP concentration *in vitro* and *in vivo*. *J Dent Res* 1985;64:1126-1129.
 - 29. Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE. p53 dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 1993; 74: 957-967.
 - 30. Lane DP. p53, guardian of the genome. *Nature* 1984; 77: 1087-1090.
 - 31. Hall PA, Coates PJ, Ansari B, Hopwood D. Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *J Cell Sci* 1994; 107: 3569-3577.
 - 32. Reed JC. Double identity for proteins off the Bcl-2 family. *Nature* 1997; 387: 773-776.
 - 33. Bronner MP, Culin C, Reed JC, Furth EE. The bcl-2 proto-oncogene and the gastrointestinal epithelial tumor progression model. *Am J Path* 1995; 146: 20-26.
 - 34. Romero F, Martínez CA, Camonis J, Rebollo A. Aiolas transcription factor controls cell death in T cells by regulating Bcl-2 expression and its cellular localization. *EMBO J* 1999; 18: 3419-3430.
 - 35. Parck JR, Hockenberry DM. Bcl-2: a novel regulator of apoptosis. *J Cell Biochem* 1996; 60: 12-17.
 - 36. Shashi A. *In vivo* studies concerning toxic effects of sodium fluoride on hepatic function in rabbits. *Fluoride* 2003; 36: 30-37.
 - 37. Guan Z, Xiao K, Zeng X, Long Y, Chen Y, Jiang S. Changed cellular membrane lipid composition and lipid peroxidation of kidney in rats with chronic fluorosis. *Arch Toxicol* 2000; 74: 602-608.

Reimpresos:

Dr. José Gutiérrez Salinas.
Laboratorio de Bioquímica y Medicina Experimental,
División de Investigación Biomédica,
Centro Médico Nacional «20 de Noviembre», ISSSTE.
San Lorenzo Núm. 502, 2º piso, Colonia Del Valle,
Delegación Benito Juárez, 03100, México, D.F.
Tel. 5200-5003, ext. 14603 Fax: 5575-4879
E-mail: quauhtlicutli@yahoo.com
Este documento puede ser visto en:
www.medigraphic.com/adm