

# Citotoxicidad In Vitro del Mercurio sobre Leucocitos Polimorfonucleares

In-Vitro mercury Cytotoxicity on polymorph nuclear leukocytes

## Resumen

**Introducción.** Durante años lo amalgamo ha sido el material de elección en los restauraciones dentales, aleación compuesta de plata, estaño, cobre y zinc, los cuales se mezclan con mercurio. El mercurio es un elemento químico (metal) y se encuentra en forma natural en el medio ambiente, vivimos expuestos al mercurio en la dieta, agua, aire y en las amalgamas dentales. Las personas con obturaciones de amalgamo están crónicamente expuestas a bajos dosis de mercurio, el cual es un material interesante de investigar para identificar los efectos que causa sobre los Leucocitos Polimorfonucleares (LPMN). **Objetivo.** Evaluar la Citotoxicidad In-Vitro del HgCl<sub>2</sub> en los leucocitos Polimorfonucleares. **Material y métodos.** Se extrajeron 10ml de sangre periférica de ocho individuos clínicamente sanos, separando los LPMN se realizó un ajuste de la población celular exponiéndolos a una solución HgCl<sub>2</sub> 10mM durante 1 y 2 horas manejando las siguientes concentraciones: 2 $\mu$ g/ml, 4 $\mu$ g/ml, 6 $\mu$ g/ml, 12 $\mu$ g/ml. **Resultados.** Se utilizó el programa SPSS Statistic versión 18.0. Siguiendo un patrón dosis respuesta, encontramos que a concentraciones de 12 $\mu$ g/ml de mercurio la viabilidad de los LPMN fue afectada. **Conclusiones.** Los resultados revelaron uno respuesta en donde o mayor concentración de HgCl<sub>2</sub> 12 $\mu$ g/ml menor viabilidad.

## Abstract

**Abstract.** Dental amalgam has been usually used as the selective material in dental restorations, alloy consisting mainly of silver, tin, copper and zinc materials which are found mixed with the Mercury. Mercury is a chemical element (metal) naturally in the environment and the people could be exposed to mercury in their diet, water, pollution and dental amalgams. People with amalgam fillings are chronically exposed to low doses of mercury. In this paper an interesting material to research is presented looking potentially effect that mercury could do on the neutrophil polymorphonuclear leukocytes. **Objective.** The aim of this study was to evaluate the In-Vitro Cytotoxicity from HgCl<sub>2</sub> (mercury chloride) on LPMN. **Materials and methods.** 10ml of blood sample was taken from clinical healthy volunteer donors and their neutrophil

polymorphonuclear leukocytes were separated and the population was adjusted and challenged with HgCl<sub>2</sub> solution 10mM for one hour and 2 hours keeping the following concentrations: 2 $\mu$ g/ml, 4 $\mu$ g/ml, 6 $\mu$ g/ml, 12 $\mu$ g/ml. **Results.** The results were obtained using the SPSS version 18.0 Statistic were that at concentrations of 12 $\mu$ g/ml the mercury chloride affected the viability of neutrophil polymorphonuclear leukocytes following a dose-response pattern where concentration (12 $\mu$ g/ml HgCl<sub>2</sub>) affected the viability of neutrophil polymorphonuclear leukocyte. **Conclusions.** The results showed a response to the higher concentration (12 $\mu$ g/ml HgCl<sub>2</sub>) lower viability.

**Descriptor:** Amalgama dental, mercurio, leucocitos polimorfonucleares, HgCl<sub>2</sub>

**Keyword:** Dental amalgam, mercury, polymorphonuclear leukocytes, HgCl<sub>2</sub>

Musetta Elena Soto Gómez\*  
 Violeta Cecilia Tinoco Cabral\*\*  
 Hilda Isassi Hernández\*\*\*  
 Juventino Padilla Corona\*\*  
 Sergio E. Trejo Tejeda\*\*  
 Rogelio Oliver Parra\*\*  
 Enrique E. Huizil Muñoz\*\*\*

\*Residente de posgrado

\*\*Profesor de posgrado

\*\*\*Profesora de posgrado. Autora responsable

\*\*\*\*Profesor FEBUAP

POSGRADO DE ODONTOLOGÍA  
 FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
 UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TAMAULIPAS  
 FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA  
 BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

Soto, G.M.E., Tinoco, C.V.C., Isassi, H.H., Padilla, C.J., Trejo, T.S.E., Oliver, P.R., Huizil, M.E.E. Citotoxicidad in vitro del mercurio sobre leucocitos polimorfonucleares. *Oral Año 15.* Núm. 47. 2014. 1070-1073

Recibido: Marzo, 2013. Aceptado: Diciembre, 2013

Oral. Año 15 No. 47, Abril 2014.

## Introducción

Durante años la amalgama ha sido el material de elección en restauraciones dentales;<sup>1</sup> diversas investigaciones la describen como una aleación constituida principalmente por plata, estaño, cobre y pequeñas partículas de zinc, mezclados con el Mercurio.<sup>2-9</sup> El mercurio (Hg) es un metal natural que surge debido a la erosión de la corteza de la tierra y los volcanes, pero en los últimos tiempos fuentes antropogénicas han aumentado su producción y exposición.<sup>10-12</sup> El Mercurio es un elemento metálico clasificado como un material delicado debido a los graves daños que ocasiona a la salud y al ambiente.<sup>13-15</sup> Las personas pueden estar expuestas al mercurio en su dieta, en el agua, en el aire y en las amalgamas dentales.<sup>16-20</sup>

Wright B. y cols, reportaron que las personas que tienen obturaciones de amalgamas se encuentran expuestas crónicamente a bajas dosis de mercurio.<sup>21</sup> Gardner RM, estimó que una sola obturación de amalgama con un área de aproximadamente 0.4 cm libera 15 $\mu$ g Hg/día.<sup>22</sup> Para el área de odontopediatría es de sumo interés los efectos que este material pudiera causar debido a que los pacientes infantiles estarían más tiempo expuestos a él si es utilizado en edades tempranas. Bernhoff RA<sup>17</sup> mencionó que el mercurio afectaba la función celular mediante la alteración de las estructuras terciarias y cuaternarias de las proteínas debido a la unión que tiene con los grupos sulfhidrilo, pudiendo en ocasiones dar como resultado algún daño en la función de cualquier órgano.<sup>17</sup> Por todo lo anteriormente mencionado presentamos un material interesante de estudiar e investigar para conocer los efectos que causa el mercurio sobre los Leucocitos Polimorfonucleares (LPMN), células fagocíticas profesionales de vida corta, altamente especializados, cuya función primordial es defender al huésped de las bacterias, debido a que estas producen moléculas quimiotácticas y promueven a los LPMN al sitio de la infección fagocitando las noxas.<sup>20,21,23,24,25,26</sup> Loftenius A, Gardner RM, Havarinasab S. y cols, Issa Y. y cols, han demostraron que bajas concentraciones de Hg en sangre afectó la función celular,<sup>19,27,28,29</sup> señalando que el HgCl<sub>2</sub> consistentemente suprime las funciones de adherencia, polarización, quimiotaxis y eritrofagocitosis en Leucocitos Polimorfonucleares de sangre periférica.<sup>30,31,32,33</sup>

El objetivo del presente estudio fue evaluar la Cytotoxicidad In-Vitro que tiene el HgCl<sub>2</sub> sobre los leucocitos Polimorfonucleares.

## Material y método

Selección de ocho individuos, ambos sexos estudiantes de Odontología de la Facultad Autónoma de Tamaulipas que aceptaron participar en el estudio, clínicamente sanos de 19 a 25 años, a los cuales se les extrajeron 10ml de sangre venosa periférica siguiendo los parámetros establecidos por la OMS en el manejo y control de fluidos orgánicos. Mediante una pipeta Pasteur estéril, en ambiente estéril, se vació la sangre heparinizada

por las paredes del tubo que contenía Dextrán al 3%; se llevó a incubar a 37°C por 2-3 horas para después recolectar el plasma rico en Leucocitos.

Se centrifugaron a 180g (1200 rpm) durante siete minutos y se descartó el sobrenadante quedando el botón celular en el fondo del tubo que correspondía a los LPMN, se eliminó el exceso de Dextrán mediante lavado y centrifugación y se ajustó la población celular a 4x10<sup>6</sup>/ml exponiéndose los Leucocitos Polimorfonucleares (LPMN) a una solución 10mM de HgCl<sub>2</sub> durante una y dos horas. Observando las siguientes concentraciones: 2 $\mu$ g/ml, 4 $\mu$ g/ml, 6 $\mu$ g/ml, 12 $\mu$ g/ml y teniendo siempre un control de viabilidad se procedió a contar 100 células, entre células vivas y muertas en cada una de las muestras estudiadas.

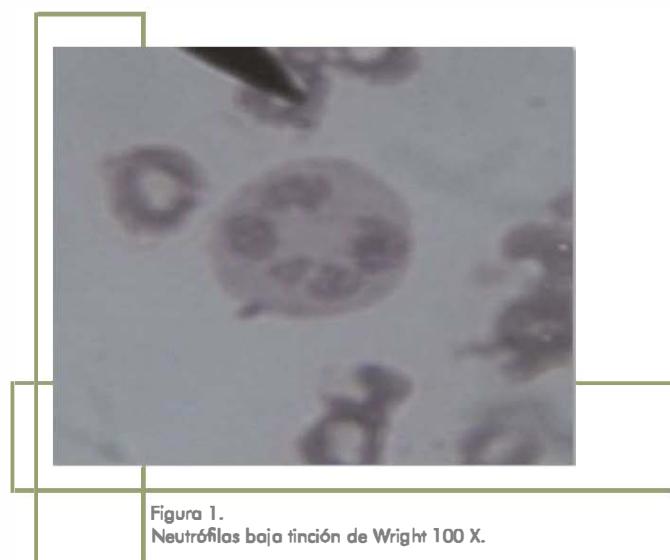


Figura 1.  
Neutrófilas bajo fínction de Wright 100 X.



Figura 2.  
Cuenta viabilidad celular 40 X.



Figura 3.  
Leucocitos Polimorfonucleares muertos 40 X.

## Resultados

Encontramos un valor muy similar entre un 90 y 93% de viabilidad en los controles de los Leucocitos Polimorfonucleares contrastando con los valores bajos obtenidos al utilizar concentración más alta de 12 $\mu$ g/ml de Hg Cl2 en donde a la hora de incubación observamos una media de 23.625 y a las dos horas tenemos una media de 16.500 demostrando que la viabilidad celular siguió un patrón de dosis respuesta en base al aumento en la concentración de tiempo y HgCl2 10mM y un descenso en cuanto a la viabilidad celular tomando en cuenta el aumento del factor tiempo.

Promedio de viabilidad celular observada en los diferentes grupos en los dos períodos

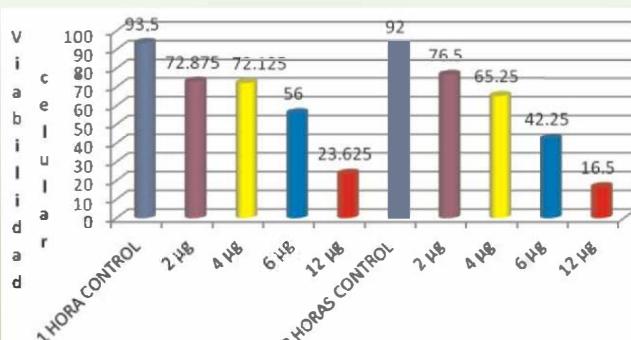


Figura 4.

En relación a la diferencia de medias encontramos diferencias estadísticamente significativas  $p < .05$  a una y dos horas. Tabla 1 y 2.

Comparación de viabilidad celular entre las diferentes concentraciones de HgCl2 10mM a 1 hora

1 hrs.	Diferencia de medidas	Valor P
Control-2 $\mu$ g	20.625	.255
Control-4 $\mu$ g	21.375	.0209
Control-6 $\mu$ g	37.500	.0002
Control-12 $\mu$ g	69.875	<.0001
2 $\mu$ g-12 $\mu$ g	49.250	<.0001
4 $\mu$ g-12 $\mu$ g	48.500	<.0001
6 $\mu$ g-12 $\mu$ g	32.375	.0008

Tabla 1.

Comparación de viabilidad celular entre las diferentes concentraciones de HgCl2 10mM a las 2 horas

2 hrs.	Diferencia de medidas	Valor P
Control-2 $\mu$ g	15.500	.272
Control-4 $\mu$ g	26.750	.0003
Control-6 $\mu$ g	49.750	<.0001
Control-12 $\mu$ g	75.500	<.0001
2 $\mu$ g-6 $\mu$ g	34.250	<.0001
2 $\mu$ g-12 $\mu$ g	60.000	<.0001
4 $\mu$ g-6 $\mu$ g	23.000	.0016
4 $\mu$ g-12 $\mu$ g	48.750	<.0001
6 $\mu$ g-12 $\mu$ g	25.750	.005

Tabla 2.

## Discusión

En la presente investigación decidimos exponer a los LPMN a diferentes concentraciones de HgCl2 10mM a 2 $\mu$ g/ml, 4 $\mu$ g/ml, 6 $\mu$ g/ml, 12 $\mu$ g/ml para tratar de identificar el grado de citotoxicidad que esta substancia pudiera ejercer *In-Vitro* sobre una población leucocitaria, encontrando diferencias estadísticamente significativas ( $p < .05$ ) entre los grupos control y las diferentes concentraciones utilizadas mientras que en la comparación entre los períodos de tiempos de uno y dos horas se encontraron diferencias estadísticas entre los grupos estudiados ( $p > .05$ ), al respecto Gardner RM y cols,<sup>27</sup> 2009 demostraron que bajas concentraciones de Hg en sangre afectan la función celular inmune provocando un incremento en la regulación de la liberación de citoquinas proinflamatorias como son: TNF- $\alpha$  (Factor de necrosis tumoral) y la IL-1 $\beta$  (Interleucina 1) y una disminución de

citocinas antiinflamatorias como son la: IL-10 (Interleucina 10) y IL1-Ra (Receptor antagonista de Interleucina 1). En este caso el modelo utilizado fue bajo el estímulo del LPS (lipopolisócorido) sobre células mononucleares concluyendo que es un sistema que interactúa con el receptor Toll (TLR4= Receptores tipo toll 4) cuya señal modula el riesgo de enfermedad autoinmune. Silva Pereira y cols,<sup>32</sup> en el 2005, Havorinosab y cols,<sup>28</sup> 2005 y Loftenius A y cols,<sup>19</sup> en 1997, trabajaron con el HgCl<sub>2</sub> y también concluyeron que la función celular es afectado, mientras que Isso Y. y cols,<sup>29</sup> 2003, encontraron que bajas concentraciones de HgCl<sub>2</sub> es tóxico para las células de lo oligodendroglio, debido a que gran parte de el HgCl<sub>2</sub> es depositado en el SNC. Tomando en cuenta lo anterior es importante recordar que en nuestro profesión estamos expuestos a este tipo de materiales y si agregamos predisposición genética con alguna enfermedad autoinmune y le sumamos el Hg que absorbemos del medio ambiente en general, incluyendo alimentos podemos caer en el concepto de Weidenhammer W y cols,<sup>33</sup> 2010, de basar la parte ancestral de la toxicidad del Hg en la vulnerabilidad o susceptibilidad del individuo. En cuanto a los Leucocitos Polimorfonucleares, Contrino y cols.<sup>30</sup> 1988, demostraron que el HgCl<sub>2</sub> en forma constante suprimió las funciones de adherencia, polarización, quimiotaxis y eritrofagocitosis en Leucocitos Polimorfonucleares de sangre periférica. Osares F. y cols, Reinhardt y cols,<sup>31</sup> 1992, demostraron que estamos expuestos al mercurio mediante los vapores ambientales, las amalgamas dentales y los alimentos de la dieta y siendo los mariscos uno importante fuente de HgCl<sub>2</sub>, y un alimento regional presente cotidianamente en nuestra dieta, consideramos que en los niños es importante evitar el uso de las amalgamas dentales, teniendo en cuenta que el periodo de vida de un diente temporal es menor podríamos utilizar en su lugar composites. Al respecto Al-Saleh y cols,<sup>5</sup> 2011, concluyeron que las amalgamas dentales no son muy recomendables en los niños, con la finalidad de evitar riesgos innecesarios a la exposición del Hg y basándose en los resultados obtenidos en nuestra investigación, coincidimos con ellos debido a que observamos que la toxicidad celular aumentaba a medida que el tiempo pasaba (una y dos horas) por lo cual es importante tomar en cuenta la exposición crónica del mercurio, tanto en niños como adultos porque como mencionamos se acumula en tejidos como SNC, riñones y otras glándulas.

Finalmente queremos concluir haciendo la observación que muchos de los moléculas que interactúan en lo respuesta inmune lo realizan en una dualidad Sinérgica-Antagónica en base a las concentración de la sustancia utilizada. Bernhoff RA,<sup>17</sup> en el 2011 reportó que el mercurio afecta la función celular a nivel de estructuras terciarias y cuaternarias de los proteínas debido a su afinidad con grupos sulfhidrilo, afectando como consecuencia la génesis o afluencia celular.

## Conclusiones

Basados en los resultados de nuestro diseño experimental establecemos las siguientes conclusiones:

1. Nuestro modelo de cultivo In-Vitro de LPMN fue eficaz para medir el efecto citotóxico del mercurio sobre los LPMN.
2. El HgCl<sub>2</sub> utilizado si afectó la viabilidad del LPMN.
3. Los resultados siguieron un patrón dosis respuesta donde a mayor concentración de HgCl<sub>2</sub> 12 $\mu$ g/ml hubo menor viabilidad.

## Bibliografía

- 1.-Anderson, W.I.E., Von Dijken, J.W.W., Steinberg, R., Kennedy, D.B., Marks, L.A.M., Amerogen, W. et al. *Preparaciones cavitarias, restauración de caras oclusales, proximales y bordes incisales, restauración de lesiones complejas*. Odontopediatría. 1<sup>a</sup> edición. Barcelona: Masson; 2004. p.143-171.
- 2.-Juárez, L.A., Rivera, C.C., Ayala, Z.G. *Evaluación clínica de la restauración con el compómero compoglass en molares primarios*. Rev. ADM. 2004; 61(1):30-34.
- 3.-Gollardo, L.N.E., De Novo, G.M.J., Mourelle, M.R. *Valoración de la microfiltración de Campaglass en molares temporales*. Rev. Actual Odontostomatol Esp. 2004; 9(1):39-45.
- 4.-McParland, H., Wamakasuriya, S. *Oral Lichenoid Contact Lesions to Mercury and Dental Amalgam-A Review*. J Biomed Biotechnol. 2012; 2012: 1-8.
- 5.-Al-Saleh, A., Al-Sedawy, A. *Mercury (Hg) burden in children: The impact of dental amalgam*. Sci Total Environ. 2011; 409:3003-3015.
- 6.-Colson, D.G. *A Safe Protocol for Amalgam Removal*. J Environ Public Health. 2011; 2012: 1-4.
- 7.-Sjurén, T., Lygre, G.B., Dalen, K., Hellan, V., Lægreid, T., Svahn, J. et al. *Changes in health complaints after removal of amalgam fillings*. J Oral Rehabil. 2011; 38(11): 835-848.
- 8.-Aguzz, A., Virgo, C., Ricco, V. *Riesgos en la práctica odontológica: Uso del mercurio*. Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica. 2010; 29(3): 51-55.
- 9.-Anasovice, K.J., Babakow, F., Goberghuel, T., Lutz, F., Schupbach, P., Bauer, J.G. et al. *Amalgamas Dentales*. En: Anasovice K.J. Phillips Ciencia de los materiales dentales. 11<sup>a</sup> edición. España: ELSEVIER; 2003. p.495-543.
- 10.-Joracheider, F.L., Viriy, M.J., Summers, A.O. *Mercury exposure from "silver" tooth fillings: emerging evidence questions a traditional dental paradigm*. FASEB. 1995; 9:504-508.
- 11.-Osares, P.F., Grández, U.J.A., Fernández, L.J.L. *Mercurio y salud en Madre de Dios, Perú*. Acta Med Per. 2010; 27(4): 310-4.
- 12.-Tassan, C.E., Arbelaez, A.L. *Intoxicación crónica por mercurio: Reacción de las mucosas orales*. RevEstom. 1995; 5(1): 64-7.
- 13.-Morales, F.I., Reyes, G.R. *Mercurio y salud en la odontología*. Rev Salud Pública. 2003; 37(2): 266-272.
- 14.-Saldorio, A.F. *Toxicidad de la amalgama dental. Revisión bibliográfica*. Rev ADM. 1996; 53(6):277-281.
- 15.-George, G.N., Singh, S.P., Hoover, J., Pickering, J.L. *The Chemical Forms of Mercury in Aged and Fresh Dental Amalgam Surfaces*. Chem Res Toxicol. 2009; 22(11): 17614.
- 16.-Uçar, Y., Brantley, W.A. *Biocompatibility of Dental Amalgams*. Int J Dent. 2011; 2011:1-7.
- 17.-Bernhoff, R.A. *Mercury Toxicity and Treatment: A Review of the Literature*. J Environ Public Health. 2011; 2012: 1-10.
- 18.-Fernandez, A.B., Barros Furieri, L., Maciel Peçanha, F., Alessandra Wiggers, G., Frizera Vassallo, P., Ronache Simões, M. et al. *Toxic Effects of Mercury on the Cardiovascular and Central Nervous Systems*. J Biomed Biotechnol. 2012: 1-11
- 19.-Loftenius, A., Elestrand, J., Moller, W. *In vitro effects of mercuric chloride (HgCl<sub>2</sub>) on human mononucleares*. Clin Exp Immunol. 1997; 110:418-422.
- 20.-Yam-Puc, J.C., García Morín, L., Sánchez-Torres, L.E. *Trampas extracelulares de Neutrófilos (NET), consecuencia de un suicidio celular*. Gac Med Mex. 2012; 148: 68-75.
- 21.-Barbier, P.G., Flores Guillén, J., Vignolelli, F. *El Neutrófilo y su importancia en la enfermedad periodontal*. Av Periodontol. 2005; 17(1):11-16.
- 22.-Wright, B., Pearce, H., Allgar, V., Miles, J., Whitten, C., Lean, I. et al. *A comparison of Urinary Mercury between Children with Autism Spectrum Disorders and Control Children*. PLOS ONE. 2012; 7(2):1-6.
- 23.-Abrams, H.A., Abrams, J.S., Mills, E.L., Sawyer, M.K., Regelman, W.R., Nelson, J.D. et al. *El Neutrófilo gingival*. En: Barrios G. Odontología. Colombia. Editar Lito; 2004. p.374-588.
- 24.-Rojas-Espinoza, O., Arece-Paredes, P. *Fagocitosis: mecanismos y consecuencias* Primera parte. BIOQUÍMIA. 2003;28(4): 19-28.
- 25.-Rojas-Espinoza, O., Arece-Paredes, P. *Fagocitosis: mecanismos y consecuencias* Segundo parte. BIOQUÍMIA. 2004; 29(1): 18-31.
- 26.-Blaser, M.J., Bodner, B.S., Brown, F., Haheim, L.R., Schild, G.C., Burnett, A.K. et al. *Resistencia del organismo a la infección: I. Leucocitos, granulocitos, sistema monocito-macrófago e inflamación*. En: Guyton AC. Tratado de Fisiología Médica. 10<sup>a</sup> edición. México: McGraw-Hill Interamericana; 2001. p.477-487.
- 27.-Gardner, R.M., Nyland, J.F., Evans, S.L., Wang, S.B., Doyle, K.M., Crainicau, C.M. et al. *Mercury Induces an Unopposed Inflammatory Response in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells in Vitro*. Environ Health Perspect. 2009; 117(12):1932-1938.
- 28.-Havorinosab, S., Hultman, P. *Organic mercury compounds and autoimmunity*. Autoimmun Rev. 2005; 27:05.
- 29.-Isso, Y., Walls Dixbury, A.J., Brunton, P.A. *Mercuric chloride: toxicity and apoptosis in a human oligodendroglial cell line MO3.13*. Biomaterials. 2003;981-7.
- 30.-Contrino, J., Marucho, P., Ribaudo, R., Ference, R., Bigazzi, P.E., Kreutae, D.L. *Effects of Mercury on Human Polymorphonuclear Leukocyte Function In Vitro*. Am J Pathol. 1988; 1:110-8.
- 31.-Reinhardt, J.W. *Side-Effects: Mercury Contribution to Body Burden From Dental Amalgam*. Adv Dent Res. 1992; 6: 110-13.
- 32.-Silva, P.L.C., Cardoso, P.C.S., Leite, D.S., Bahia, M.O. *Cytotoxicity and genotoxicity of low doses of mercury chloride and methylmercury chloride on human lymphocytes In Vitro*. Braz Med Biol Res. 2005; 38(6):901-7.
- 33.-Weidenhammer, W., Bärnschein, S., Zilker, T., Eyer, F. *Predictors of treatment outcomes after removal of amalgam fillings: associations between subjective symptoms, psychometric variables and mercury levels*. Community Dent Oral Epidemiol. 2010; 38: 180-9.