

Efecto del fluoruro de sodio sobre enzimas antioxidantes en el eritrocito humano

Palabras clave: Fluoruro, eritrocitos, estrés oxidativo

Key words: Fluoride, erythrocytes, oxidative stress.

Recibido: 13/07/2011
Aceptado: 30/08/2011

Este artículo puede ser consultado en versión completa en: <http://www.medigraphic.com/patologiaclinica>

José Gutiérrez-Salinas,* Sergio Hernández-Rodríguez,* Rosalba Carmona-García,** Teresa de Jesús Cerón-Arteaga,** Jenifer Cruz-Gómez,** Alejandro Olivares-Báez,** Ildefonso F Lozada-Medina,** Claudia Zepeda-García,** Israel Verdejo-Malagón***

* Laboratorio de Bioquímica y Medicina Experimental, División de Investigación Biomédica, Centro Médico Nacional "20 de Noviembre" (CMN-20N), Instituto de Seguridad y Servicios Sociales para los Trabajadores del Estado (ISSSTE). México, D.F.

** Banco de Sangre, CMN-20N, ISSSTE.

*** Laboratorio de Histocompatibilidad, CMN-20N, ISSSTE.

Correspondencia:

Dr. José Gutiérrez Salinas.

Centro Médico Nacional "20 de Noviembre", ISSSTE. Laboratorio de Bioquímica y Medicina Experimental. San Lorenzo # 502, 2o piso, Col. Del Valle, 03100 México, D.F. Tel: 5200-5003, ext. 86881. E-mail: quauhtlicutli@yahoo.com

215

Resumen

Antecedentes: El exceso en la ingesta de fluoruro produce una condición de intoxicación llamada fluorosis, la cual puede manifestarse en el ser humano como problemas en el sistema hematológico. El objetivo del presente trabajo fue describir el efecto *in vitro* del fluoruro de sodio (NaF) sobre la actividad específica de las principales enzimas antioxidantes del eritrocito como indicadores de estrés oxidativo. **Métodos:** Eritrocitos humanos fueron incubados con NaF (10, 25, 50 o 100 ppm) y se determinó la actividad específica de las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa. **Resultados:** Los eritrocitos incubados con cantidades crecientes de NaF presentan disminución en la actividad de las enzimas antioxidantes. **Conclusiones:** Nuestros resultados indican que, *in vitro*, el NaF induce estrés oxidativo en el eritrocito que puede ser un mecanismo de daño a este tipo de célula.

Abstract

Background: The excess in the consumption of fluoride can induced a condition called fluorosis that can show in human beings as problems in hematological systems. The objective of the present is described the *in vitro* effect of sodium fluoride (NaF) on the specific activity of the principals antioxidant enzymes in the erythrocyte as an indicator of oxidative stress. **Methods:** Human erythrocytes were incubated with NaF (10,25,50 or 100 ppm). The activity of enzymes superoxide dismutase, catalase and glutathion peroxidase were determined. **Results:** The results shows that the erythrocytes incubated with growing quantity of NaF, present a decrease in the antioxidant enzymes. **Conclusions:** Our results show that the NaF induced *in vitro* conditions, an oxidative stress to human erythrocytes. This it indicates a damage to these cell type.

Introducción

El flúor (F) es un elemento químico muy abundante en la Tierra que puede ser encontrado en los organismos vertebrados, principalmente en huesos y dientes.¹⁻³ Un exceso de ese elemento en el organismo puede ocasionar fluorosis aguda o crónica.¹⁻³ La fluorosis es un serio problema de salud pública en algunas partes del mundo en donde existen altas concentraciones de fluoruro de sodio (NaF) (principal fuente de fluoruro) en el agua para consumo humano o en los alimentos, los cuales pueden aportar más de una parte por millón (ppm) de F que es la dosis recomendada por la Organización Mundial de la Salud. Se han reportado problemas de fluorosis en regiones en donde se excede esa concentración en los mantos acuíferos destinados para su consumo.¹⁻³

Tanto la fluorosis aguda como la crónica se caracterizan por provocar alteraciones en los sistemas musculoesquelético y nervioso; también se han reportado trastornos en diversos órganos como son riñón e hígado, así como en los sistemas digestivo y hematopoyético.⁴⁻⁸

Entre las alteraciones hematológicas encontradas con mayor frecuencia en sujetos con fluorosis aguda o crónica están: a) anemia hipocrómica; b) variaciones en el tamaño y forma de los eritrocitos (anisocitosis); c) presencia de cuerpos de Heinz en los eritrocitos; d) alteraciones en la cuenta leucocitaria (leucocitosis, eosinofilia y linfopenia) e) aumento en la cantidad de metahemoglobina y f) alteraciones en el hematócrito.⁹⁻¹⁴ Además, experimentos hechos *in vitro* con cultivos de médula ósea de diversas especies, incluyendo al humano, han demostrado que las células hematopoyéticas presentan un fenómeno de apoptosis cuando son expuestas a cantidades de NaF superiores a 1.5 ppm.⁹⁻¹⁴

Dentro de los mecanismos fisiopatológicos involucrados en el daño producido en una intoxicación aguda o crónica con NaF se ha descrito la producción excesiva de radicales libres derivados

del oxígeno (RLO; también llamadas especies reactivas derivadas del oxígeno).¹⁵⁻¹⁹ Por su alta reactividad química, los RLO producen alteraciones en las principales macromoléculas (proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos, etcétera) de la célula, lo que puede provocar trastornos generales en el metabolismo intermedio, tal como ha sido descrito en otros procesos patológicos en los que se ha comprobado que existe alta producción de RLO como sucede en diabetes mellitus, aterosclerosis, artritis reumatoide o en intoxicación con diversos compuestos químicos, metales pesados y/o fármacos.²⁰⁻²²

Para evitar el daño provocado por los RLO, la célula cuenta con varias enzimas conocidas como antioxidantes que se encargan de neutralizarlos. Las principales enzimas antioxidantes en todas las células son la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y la glutatión peroxidasa, las cuales actúan sinérgicamente para neutralizar y eliminar a los RLO.²⁰⁻²²

Cuando existe un exceso en la producción de RLO o las defensas antioxidantes se agotan en el organismo, se produce una condición conocida como estrés oxidativo en donde los RLO reaccionan con todos los componentes de la célula y pueden dañarla al grado de provocarle la activación de los mecanismos de apoptosis (muerte celular programada). Dentro de las manifestaciones de la existencia de un estrés oxidativo se encuentra la alteración en la actividad de las enzimas antioxidantes (SOD, catalasa y glutatión peroxidasa), por lo que la determinación de su actividad específica es considerada un buen sensor del estatus antioxidante de la célula y en el eritrocito estas enzimas se encuentran acopladas entre sí para la eliminación de los RLO.²⁰⁻²²

Como ya se ha mencionado, los sujetos afectados de fluorosis aguda o crónica presentan diversas alteraciones hematológicas que pueden afectar a su organismo.⁸⁻¹⁴ Experimentos hechos *in vivo* e *in vitro* demuestran que los eritrocitos humanos y de otras especies expuestos a concentraciones de

NaF que van de 1.5 hasta 1,500 ppm presentan diversas alteraciones, tales como disminución en la incorporación de glucosa del medio, modificaciones en los niveles de nucleótidos y 2-3-difosfoglicerato, así como cambios membranales caracterizados por desregulación en el manejo de los electrolitos.²³⁻²⁶

El mecanismo fisiopatológico por medio del cual el NaF produce dichas alteraciones en el eritrocito no se conoce con precisión; sin embargo, se ha sugerido la participación de los RLO en este tipo de daños, ya que la ingesta de vitaminas antioxidantes (como la vitamina E) disminuyen dichos daños.²³⁻²⁶

Con base en lo señalado, el objetivo del presente trabajo fue describir los efectos sobre la actividad específica de las principales enzimas antioxidantes del eritrocito humano incubados *in vitro* con diversas cantidades de NaF.

Material y métodos

Obtención de muestras. Las muestras de sangre fueron obtenidas previo consentimiento de sujetos aparentemente sanos que acuden regularmente al Banco de Sangre de nuestra institución como donadores voluntarios. Las muestras de sangre (10 mL) fueron obtenidas por venopunción en tubos con anticoagulante (citrato o heparina). Las muestras fueron centrifugadas para separar el plasma y los leucocitos. Los eritrocitos así obtenidos fueron lavados tres veces con tres volúmenes de una solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS; NaCl al 0.9% en 0.01 M de buffer de fosfatos pH 7.0) fría y fue resuspendido en PBS para obtener un hematócrito de 50% de acuerdo con la técnica descrita.^{27,28} Todos los procedimientos fueron realizados con base en las Normas y Procedimientos Generales aprobados por nuestra institución para el uso de muestras humanas.

Incubación de eritrocitos. Los eritrocitos fueron incubados de acuerdo a protocolos ya establecidos.^{27,28} A grandes rasgos, se prosiguió como sigue: En un tubo de ensayo se colocaron 0.5 mL de paquete eritrocitario, se agregaron tres volúmenes

de PBS y se incubaron por diez minutos a 37 °C en agitación constante, considerándose este tiempo como condiciones basales. Al término de la incubación, se les agregaron cantidades variables (10 a 100 ppm) de NaF. Los eritrocitos fueron incubados a 37 °C por 30 minutos; después fueron lavados tres veces con PBS frío, como se describió en líneas anteriores. El paquete eritrocitario resultante fue usado para la obtención de la fracción citosólica que es en donde están las enzimas antioxidantes. Como control se incubaron eritrocitos en las mismas condiciones experimentales descritas anteriormente, pero sin la presencia del NaF.

Obtención de fracción citosólica. Al término de la incubación, los eritrocitos fueron lisados de acuerdo con la técnica reportada,²⁷⁻²⁹ usando un amortiguador hipotónico de fosfatos (5P8; 5 mM de buffer de fosfatos pH 8). Brevemente: a un volumen de paquete de eritrocitos se le agregan cinco volúmenes de solución 5P8 y se agitó gentilmente, dejándose reposar por 15 minutos a 4 °C. El producto de la incubación fue centrifugado a 10,000 revoluciones por minuto (rpm) por 15 minutos. El sobrenadante fue recuperado y considerado como la fracción citosólica. La concentración de proteína total fue determinada de acuerdo con la técnica de Lowry,³⁰ usando albúmina sérica bovina como estándar.

Determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes. Para llevar a cabo la determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes en la fracción citosólica de los eritrocitos se procedió a eliminar el exceso de hemoglobina de acuerdo con el método reportado por Bannister y Bannister.³¹ *Grosso modo* se procedió como sigue: una muestra de fracción citosólica de eritrocitos fue mezclada con un volumen de una solución de etanol/cloroformo (5/3 v/v) con agitación continua por 10 minutos. Posteriormente se agregó 1/5 de volumen de NaCl isotónico en agitación continua. El resultado fue centrifugado a 3,000 rpm durante 60 minutos, descartando el precipitado y empleando el sobrenadante; el cual se considera

como fracción libre de hemoglobina (FLH) y fue ocupado para determinar la actividad de las enzimas antioxidantes. La concentración de proteína total en la FLH fue determinada de acuerdo con la técnica de Lowry.³⁰

La actividad de la enzima catalasa fue determinada en FLH con base en el procedimiento reportado por Aebi³² de la siguiente manera: una muestra de FLH fue incubada cinco minutos con un volumen de PBS a 37 °C. La reacción fue activada, agregando 10 mM de H₂O₂, siguiéndola por 45 segundos a 240 nm en un espectrofotómetro (Jenway 6300 Cielovista Cal. USA). La actividad resultante se expresa como nmol/minuto/mg de proteína.

La actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) fue determinada usando el kit comercial (Superoxide Dismutase Assay Kit II; Calbiochem, USA) y siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante; la actividad se expresó como U/g proteína total.

La actividad de la enzima glutatión peroxidasa fue determinada usando un kit comercial de reactivos (Glutathione peroxidase cellular activity assay kit Sigma-Aldrich St. Louis MO USA) siguiendo las instrucciones incluidas por el fabricante; la actividad fue notificada en μ moles/minuto/mg proteína total.

Análisis estadístico. Los resultados fueron analizados con el programa estadístico GraphPad Prism V 4.00 (GraphPad Software, San Diego, California, USA) y expresados como valores promedio \pm error estándar de 8-10 experimentos independientes por grupo, haciendo las determinaciones por duplicado. La diferencia de medias entre grupos fue establecida mediante χ^2 ; el valor considerado como estadísticamente significativo fue $p < 0.05$.

Resultados

Las figuras 1 a 3 muestran la actividad específica de las enzimas antioxidantes: SOD (figura 1), catalasa (figura 2) y glutatión peroxidasa (figura 3) determinadas en los eritrocitos incubados con cantidades crecientes de NaF. Como puede observarse, en

comparación con el control, la presencia del NaF produce disminución estadísticamente significativa en la actividad de las tres enzimas mencionadas.

Dicha inhibición se presenta desde la mínima cantidad de NaF usada (10 ppm); y la actividad decrece paulatinamente conforme se incrementan las cantidades de NaF presentes en el medio de incubación. Esta inhibición llega a ser máxima para las tres enzimas cuando se usan 100 ppm de NaF en el medio. Así, comparativamente con el grupo control, la SOD presenta 75% de inhibición en su

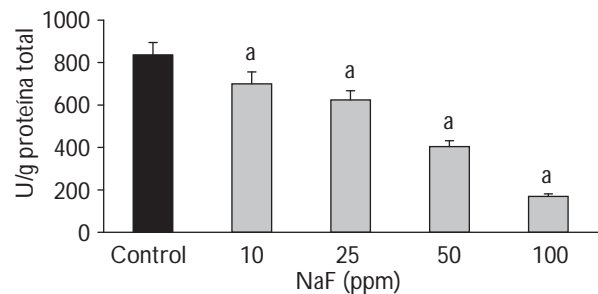


Figura 1. Efecto del NaF sobre la actividad de la enzima SOD en la fracción citosólica de los eritrocitos incubados con cantidades crecientes de NaF. La actividad de la enzima se expresa como U/g de proteína total y cada barra representa el valor promedio \pm el error estándar de los datos de 8-10 experimentos independientes.

a = $p < 0.05$ respecto del grupo control

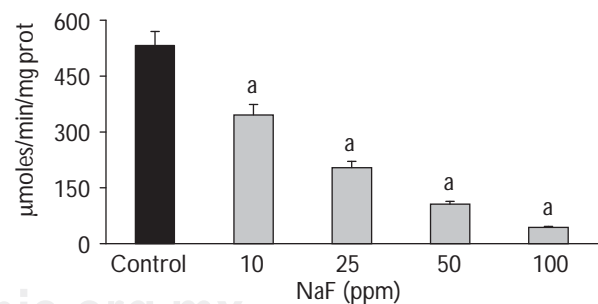


Figura 2. Efecto del NaF sobre la actividad de la enzima catalasa en la fracción citosólica de los eritrocitos incubados con cantidades crecientes de NaF. La actividad de la enzima se expresa como nmoles/minuto/mg de proteína total y cada barra representa el valor promedio \pm el error estándar de los datos de 8-10 experimentos independientes.

a = $p < 0.05$ respecto del grupo control

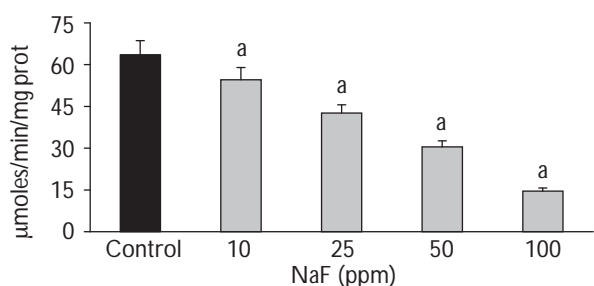


Figura 3. Efecto del NaF sobre la actividad de la enzima glutatión peroxidasa en la fracción citosólica de los eritrocitos incubados con cantidades crecientes de NaF. La actividad específica de la enzima se expresa como $\mu\text{moles}/\text{minuto}/\text{mg}$ proteína total y cada barra representa el valor promedio \pm el error estándar de los datos de 8-10 experimentos independientes. $a = p < 0.05$ respecto del grupo control

actividad (figura 1); la catalasa muestra 85.5% de inhibición (figura 2) y la glutatión peroxidasa solamente 33% (figura 3).

Discusión

Se ha descrito que el NaF produce alteraciones en enzimas relacionadas con el metabolismo intermedio del eritrocito por lo que su función se ve afectada de manera importante.^{8-14,23-26} El mecanismo por medio del cual el NaF produce estas alteraciones en las enzimas no se conoce con precisión; sin embargo, se ha planteado que existe inhibición por sitio alostérico, ya que el NaF presenta semejanza estructural con algunos de los activadores alostéricos conocidos para algunas enzimas, sobre todo oxidoreductasas y cotransportadores de iones de la membrana.²³⁻²⁶

Nuestros datos señalan que el NaF produce inhibición "dosis dependiente" en la actividad de las enzimas SOD, catalasa y glutatión peroxidasa de los eritrocitos expuestos a ese tóxico; esto es, que la inhibición es mayor conforme se incrementa la cantidad de NaF agregado al medio de incubación.

Ha sido reportado que la exposición a NaF en cantidades superiores a 1.5 ppm produce, tanto *in vivo* como *in vitro*, diversas alteraciones metabólicas en las células hematopoyéticas; mientras que en los

vertebrados se desarrollan diversas alteraciones hematológicas.^{1-3,8-14,23-26} También se ha encontrado que, en zonas con prevalencia de fluorosis, la concentración sanguínea de NaF en organismos superiores, incluyendo al humano, son superiores a 10 ppm, lo que representa un gran riesgo para la salud que puede verse reflejado como alteraciones hematológicas a corto y largo plazo.^{1-3,8-14}

El mecanismo por medio del cual el NaF produce alteraciones hematológicas en los seres expuestos a este tóxico no se conoce con precisión; sin embargo, la inducción de estrés oxidativo en las células y tejidos hematopoyéticos puede ser parte del mecanismo fisiopatológico del daño ocasionado por este tóxico. Nuestros datos sugieren que un mecanismo de toxicidad del NaF puede ser la inhibición de enzimas antioxidantes en el eritrocito. Esta inhibición de enzimas antioxidantes puede producir un exceso en la generación de especies reactivas derivadas del oxígeno, lo que generaría un proceso de estrés oxidativo que daña al eritrocito expuesto a este tóxico.³³⁻³⁶ Se debe de investigar este posible mecanismo de lesión, ya que podría indicarnos cómo puede ser evitado el daño que este tóxico produce sobre los sistemas enzimáticos del eritrocito y la célula en general.

Agradecimientos

A las QFB Sonia Jiménez Zaragoza y María Elena Luna Munguía del Banco de Sangre del CMN "20 de Noviembre", ISSSTE, por su ayuda en la obtención de las muestras de sangre. Así como a las señoritas Claudia Laureano Luna y Cinthia Santiago Nicolas (Div. Investigación Biomédica, CMN "20 de Noviembre", ISSSTE) por su apoyo secretarial para la escritura de este documento

Referencias

1. Li L. The biochemistry and physiology of metallic fluoride: Actions mechanism and implications. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003; 14: 100-114.

2. Foulkes RG. Thirty-five years of fluoride. *Fluoride* 2002; 35: 213-227.
3. Waldbott GL, Burgstahler AW, McKinney HL. Fluoridation: The great dilemma. Lawrence, Kansas: Coronado Press; 1978. p. 148-174.
4. Monsour PA, Kruger BJ. Effect of fluoride on soft tissues in vertebrates. *Fluoride* 1985; 18: 53-61.
5. Long YG, Cheng YH, Jiang SF, Wang YN. Changed cellular membrane lipid composition and lipid peroxidation of kidney in rats with chronic fluorosis. *Arch Toxicol* 2000; 74: 602-608.
6. Matsuo S, Nakatawa H, Kiyomira K, Kurebe M. Fluoride-induced ultrastructural changes in exocrine pancreas cells of rats: Fluoride disrupts the export of zymogens from the rough endoplasmic reticulum (rER). *Arch Toxicol* 2000; 73: 611-617.
7. Shashi A. *In vivo* studies concerning toxic effects of sodium fluoride on hepatic function in rabbits. *Fluoride* 2003; 36: 30-37.
8. Machalinska A, Machoy-Mokrzynska A, Marlicz W, Steciewicz I, Machalinski B. NaF-induced apoptosis in human bone marrow and cord blood CD34 positive cells. *Fluoride* 2001; 34: 258-263.
9. Zhi-Zhong G, Pei-Si Y, Nai-Den Y, Zong-Jie Z. An experimental study of blood biochemical diagnostic indices for chronic fluorosis. *Fluoride* 1989; 22: 112-118.
10. Yur F, Belge F, Mert N, Yörük I. Changes in erythrocyte parameters of fluorotic sheep. *Fluoride* 2003; 36: 152-156.
11. Kumari DS, Rao PR. Red cell membrane alterations in human chronic fluoride toxicity. *Biochem Int* 1991; 23: 639-648.
12. Seddek ALS, Abdel-Hamid A, Ibrahim TA, El-Nasser MA. Hematological and biochemical studies of fluoride poisoning in chicken a trial for treatment. *Toxicol Lett* 1996; 88: 106-110.
13. Jacyszyn K, Marut A. Fluoride in blood and urine in humans administered fluoride and exposed to fluoride-polluted air. *Fluoride* 1986; 19: 26-32.
14. Machalinska A, Wiszniewska B, Tarasiuk J, Machalinski B. Morphological effects of sodium fluoride on hematopoietic organs in mice. *Fluoride* 2002; 35: 231-238.
15. Chlubek D. Fluoride and oxidative stress. *Fluoride* 2003; 36: 217-228.
16. Chinoy NJ. Fluoride stress on antioxidant defence systems. *Fluoride* 2003; 36: 138-141.
17. Rzeuski R, Chlubek D, Machoy Z. Interaction between fluoride and biological free radical reaction. *Fluoride* 1998; 31: 43-45.
18. Gutiérrez-Salinas J, Morales-González JA, Madrigal-Santillán E, Esquivel-Soto J, Esquivel-Chirino C, García-Luna y González-Rubio M, Suastegui-Domínguez S, Valadéz-Vega C. Exposure to sodium fluoride produces signs of apoptosis in rat leukocytes. *Int J Mol Sci*. 2010; 11 (9): 3610-3622.
19. Morales-González JA, Gutiérrez-Salinas J, García-Ortiz L, Chima-Galán MC, Madrigal-Santillán E, Esquivel-Soto J, Esquivel-Chirino C, García-Luna y González-Rubio M. Effect of sodium fluoride ingestion on malondialdehyde concentration and the activity of antioxidant enzymes in rat erythrocytes. *Int J Mol Sci* 2010; 11: 2443-2452.
20. Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals. Antioxidants and human disease. Where and we now. *J Lab Clin Med* 1992; 119: 598-620.
21. Tappel AL. Lipid peroxidation damage to cell components. *Fed Proceedings* 1973; 32: 1870-1874.
22. Gutiérrez-Salinas J, Morales-González JA. Producción de radicales libres derivados del oxígeno y el daño al hepatocito. *Med Inter Mex* 2004; 20: 287-295.
23. Saralakumari D, Ramakrishna RP. Red cell membrane alterations in human chronic fluoride toxicity. *Biochem Inter* 1991; 23: 639-648.
24. Saralakumari D, Ramakrishna RP. Red blood cell glucose metabolism in human chronic fluoride toxicity. *Bull Environ Contam Toxicol* 1991; 47: 834-839.
25. Suska M, Nowak R, Machalinski B. Serum fluoride and the content of adenine nucleotides and 2-3-bisphosphoglycerate in erythrocytes of rats exposed to sodium fluoride. *Fluoride* 2003; 36: 113-121.
26. Korkmaz O. *In vitro* effects of sodium fluoride and sodium dichromate on dynamic properties of human erythrocyte membrane. *Biophys Chem* 2000; 83: 111-120.
27. Gutiérrez-Salinas J, Zentella de Piña M, Piña E. Acute ethanol intake produces lipid peroxidation in rat red blood cells membranes. *Biochem Mol Biol Inter* 1993; 29: 263-270.
28. Van der Zee J, Van Steveninck J, Koster JF, Dubbelman TMAR. Inhibition of enzymes and oxidative damage of red blood cells induced by t-butylhydroperoxide-derived radicals. *Biochim Biophys Acta* 1989; 980: 175-180.
29. Dodge JT, Mitchell C. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* 1963; 100: 119-130.
30. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AI, Randal RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 1: 265-275.
31. Bannister JV, Bannister WH. Isolation and characterization of superoxide dismutase. In: Packer L (ed). *Methods in Enzymology*. New York: Academic Press; 1984 vol 105. p. 88-93.
32. Aebi ABH. Catalasa activity. In: Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Grabl M. (eds). *Methods in Enzymatic Analysis*. Florida: Verlag Chemie; 1983 vol 3. p. 273-282.
33. VanDer-Zee J, Dubbelman TMAR, Steveninck JV. Peroxide-induced membrane damage in human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1985; 818: 38-44.
34. Dwight JFSTJ, Hendry BM. The effects of ter-butyl hydroperoxide on human erythrocyte membrane ion transport and the protective action of antioxidants. *Clin Chim Acta* 1996; 249: 167-181.
35. Lii CK, Hung CN. Protein thiol modifications of human red blood cells treated with t-butyl hydroperoxide. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1336: 147-156.
36. Andersen HR, Nielsen JB, Nielsen F, Grandjean P. Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes. *Clin Chem* 1997; 43: 562-568.