



Efecto de la periodontitis en puérperas en relación con el daño al ADN, así como su potencial teratógeno en el recién nacido pretérmino[§]

Miguel Ángel Ramírez Aguilar*,** Ana Lourdes Zamora Perez,* Reyna Arámbula Guzmán,*
Yveth Ortiz García,* Celia Guerrero Velázquez,* Vianeth Martínez Rodríguez,**
Belinda Claudia Gómez Meda,***, Guillermo Zúñiga González ****

RESUMEN

Antecedentes: La prueba de micronúcleos detecta daño al ADN. La periodontitis es una enfermedad que cursa con incremento en la producción de radicales libres, lo que podría incrementar el daño al ADN. Existen evidencias que asocian la periodontitis en mujeres embarazadas con partos pretérmino y se ha observado mayor número de micronúcleos en recién nacidos pretérmino de madres con patologías que involucran incremento en la producción de radicales libres. **Objetivo:** Evaluar si la periodontitis incrementa el daño al ADN en puérperas con la enfermedad, así como determinar el potencial teratógeno en el recién nacido pretérmino de puérperas con periodontitis. **Material y métodos:** Se tomaron muestras de células de carrillo y de lengua de mucosa bucal de puérperas con y sin periodontitis, cuyos productos fueran recién nacidos pretérmino, de los que se recuperó una muestra de sangre periférica. Las muestras fueron extendidas sobre portaobjetos, procesadas y teñidas con naranja de acridina para su observación al microscopio de fluorescencia. En las muestras de mucosa bucal se contaron el número de micronúcleos y anomalías nucleares en células de lengua y carrillo en 2,000 células. En la sangre periférica se contaron el número de eritrocitos micronucleados, eritrocitos policromáticos micronucleados y eritrocitos policromáticos. **Conclusión:** El incremento en el daño al ADN analizado como aumento en el número de micronúcleos y anomalías nucleares en células de mucosa bucal de carrillo y lengua de puérperas con periodontitis, así como en el incremento de eritrocitos policromáticos micronucleados en sangre periférica del recién nacido pretérmino de puérperas con periodontitis, indica que la periodontitis *per se* incrementa el daño al ADN y su potencial efecto teratógeno para el recién nacido pretérmino de madres con periodontitis.

ABSTRACT

Background: Micronucleus assay detects DNA damage. Periodontitis is a chronic degenerative disease of the oral cavity and the generation of free radicals is an important consideration in this disease that could result in an increased frequency of DNA damage. There is evidence in the literature suggesting an association between periodontal diseases in pregnant women and giving birth to premature infants. Also we have investigated whether pathologies that are associated with the formation of free radicals lead to an increase the frequency of micronucleus in preterm newborns during pregnancy. **Objective:** Evaluate DNA damage increased by means of micronuclei assay in buccal mucosa cells from puerperal women with periodontitis and to determinate the teratogenic potential in the preterm newborns to mothers with periodontitis by means of counting micronucleus in peripheral blood. **Material and methods:** Buccal mucosa cells from puerperal woman with periodontitis and without periodontitis and peripheral blood from preterm newborns were collected and spread directly on two separate, pre-cleaned and pre-coded slides. The smears were air-dried, fixed, stained and analyzed by microscopy. DNA damage was determined by counting micronucleus and nuclear abnormalities in exfoliated cells, and in peripheral blood the number of micronucleated erythrocytes, micronucleated polychromatic erythrocytes and the number of PCE. **Conclusion:** The increase in micronucleus and nuclear abnormalities frequency in buccal mucosa cells of puerperal women with periodontitis and the increased in micronucleated polychromatic erythrocytes number in preterm newborns to mothers with periodontitis indicates that the periodontitis *per se* increases DNA damage and its potential teratogenic effect on preterm newborns to mothers with periodontitis.

[§] 1er Lugar en el Concurso de Investigación del Congreso de la Asociación Mexicana de Periodontología, Morelia 2013.

* Instituto de Investigación en Odontología. Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México.

** Especialidad en Periodoncia. Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México.

*** Instituto de Biología Molecular en Medicina y Terapia Génica. Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México.

**** Laboratorio de Mutagénesis. Centro de Investigación Biomédica de Occidente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Guadalajara, Jalisco, México.

Palabras clave: Periodontitis, puérperas, recién nacido pretérmino, genotoxicidad, micronúcleos, anormalidades nucleares, células de mucosa bucal, sangre periférica.

Key words: Periodontitis, puerperal woman, preterm newborn, genotoxicity, micronuclei, nuclear abnormalities, buccal mucosa cells, peripheral blood.

INTRODUCCIÓN

Se ha descrito que las enfermedades orales tienen efectos importantes sobre la salud en general de los individuos.¹ La periodontitis (PE) engloba un conjunto de afecciones que dañan a los tejidos que sostienen al diente.² Se ha propuesto que el estrés oxidativo es un elemento fundamental en la fisiopatología del proceso inflamatorio crónico, el cual caracteriza a la PE y con ello, el incremento en la producción de radicales libres (RL), lo que produce a su vez, daño al ADN.¹ Existen pruebas con las que se determina el daño genético, como es el caso del ensayo de micronúcleos en las células de mucosa bucal, incluyendo el análisis de anormalidades nucleares (AN),³ que es una prueba informativa, ya que los resultados no dejan lugar a dudas del daño producido al material genético. Se han realizado estudios en los que se plantea el aumento en la incidencia de malformaciones congénitas en neonatos de madres con patologías relacionadas con el aumento en la producción de RL.⁴ De igual forma, se ha observado mayor número de MN en recién nacidos pretérmino (RNP) de madres con patologías que involucran alta producción de RL,⁵ por lo que el objetivo del trabajo fue determinar si la PE *per se* incrementa el daño al ADN por medio del conteo de MN y AN en las células de mucosa bucal de puérperas con la enfermedad, así como determinar el potencial teratógeno mediante la observación de MN en eritrocitos de sangre periférica de RNP de puérperas con PE.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de muestras

Se tomaron muestras de células de carrillo y de lengua de mucosa bucal de puérperas con y sin PE, cuyo producto fue RNP; de los RNP se recuperó una muestra de sangre y se formaron los siguientes grupos: 1) puérperas con PE cuyo producto fue RNP (n = 21) y 2) puérperas sin PE, cuyo producto fue RNP (n = 25). Las muestras fueron obtenidas de los servicios de Obstetricia y Neonatología del Antiguo Hospital Civil «Fray Antonio Alcalde» y del Hospital Civil de Guadalajara «Dr. Juan I. Menchaca».

PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE MUESTRAS

Muestras de mucosa bucal de carrillo y lengua.

A todas las participantes se les tomaron muestras de mucosa bucal de lengua y de carrillo y se realizaron dos frotis por participante. Para esto, se les pidió a las participantes que se enjuagaran la boca con agua y después, con un portaobjetos, se hizo un raspado de la mucosa bucal de carrillo y de los bordes laterales de la lengua; se extendieron las muestras en otra laminilla limpia y desengrasada y se repitió la operación para tener muestras por duplicado. Las muestras se dejaron secar al aire y se fijaron en metanol al 80% por 48 horas; finalmente, se procedió a la tinción.

Muestras de sangre periférica

Se recuperó una gota de sangre periférica de los RNP de puérperas con y sin PE de la muestra que rutinariamente les es tomada para diversos estudios, para realizar un frotis. Las muestras fueron extendidas sobre un portaobjetos por duplicado y se dejaron secar al aire, se fijaron en etanol absoluto por 10 minutos y se procedió a la tinción.

Las muestras de mucosa bucal de carrillo y de lengua, así como las de sangre periférica fueron teñidas con naranja de acridina,⁶ colorante específico para ácidos nucleicos, el cual emite fluorescencia y dado que el núcleo, MN y las AN están formados de ADN, esta propiedad es aprovechada para su visualización. Al igual que el núcleo de la célula, éstas aparecen de color amarillo o verde brillante cuando son observadas con microscopía de fluorescencia, mientras que el citoplasma se tiñe de verde opaco semitransparente.

Las muestras de mucosa bucal de células de carrillo y de lengua fueron observadas con el objetivo 60x y las de sangre periférica con el objetivo 100x, en un microscopio marca Olympus modelo CX31 con sistema iluminador de fluorescencia Olympus modelo CX-RFLT50 (lámpara de mercurio 50W y filtro de fluorescencia azul DMB-2 Olympus) y sistema fotográfico digital Olympus modelo SC3512Y.

En el caso de las muestras de mucosa bucal de puérperas sin y con PE se contaron las células con MN y AN, incluyendo las células binucleadas (BN), con prolongaciones nucleares (PN) y células con cariólisis (CL), cariorrexis (CR), cromatina condensada (CC) y picnosis (PIC) de lengua y carrillo en 2,000 células por muestra. Los resultados se presentan en 1,000 células.⁷

En sangre periférica se contaron el número de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN) en 1,000 eritrocitos policromáticos (EPC), el número de EMN en 10,000 eritrocitos totales (ET) y el número de EPC en 1,000 ET.

Consideraciones éticas. A todos los participantes se les informó sobre el objetivo del estudio y el consentimiento de las personas que desearon participar en este trabajo se obtuvo por escrito. Asimismo, se les realizó una entrevista para obtener información personal que se anexó en su expediente.

Análisis estadístico. Los resultados se presentan como promedio \pm desviación estándar. Para establecer las diferencias entre los grupos con respecto al número de MN y AN se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney para muestras independientes. Se consideró estadísticamente significativo cuando el valor de p fuera < 0.05 . Las pruebas estadísticas se realizaron por medio del programa SPSS (v.11.0) para Windows®.

RESULTADOS

MN y AN en células de mucosa bucal de puérperas con y sin periodontitis

Se analizó un total de 92 muestras de mucosa bucal de carrillo y de lengua de puérperas con y sin PE y cuyo producto fue RNP. El promedio de edad de las puérperas sin PE fue 32.36 ± 9.81 y

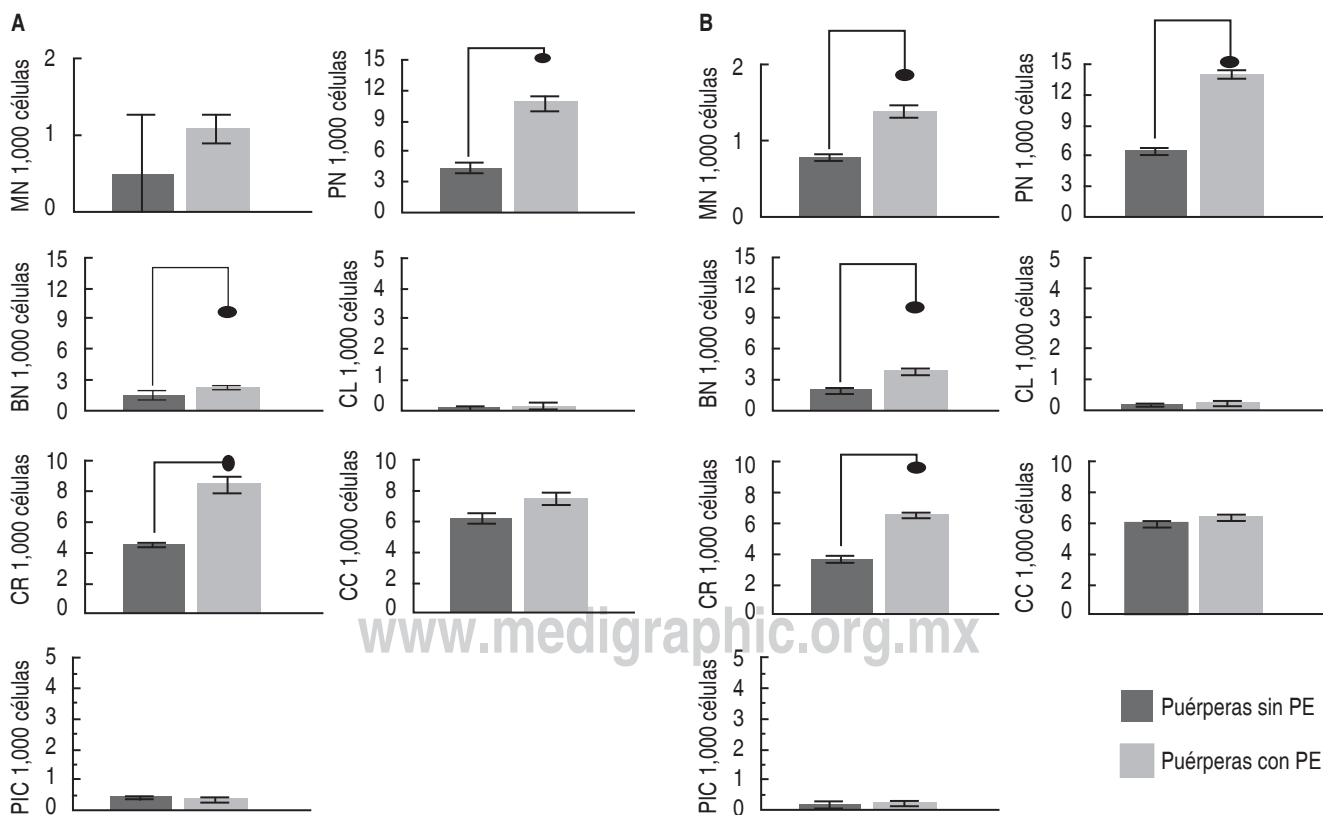


Figura 1. Distribución del número de MN y AN en las células de mucosa bucal de carrillo (A) y lengua (B) de puérperas con y sin PE. AN: anomalías nucleares, PE: periodontitis, MN: micronúcleo, PN: prolongación nuclear, BN: binucleada, CL: cariólisis, CR: cariorrexis, CC: cromatina condensada, PIC: picnosis, ●: diferencia significativa.

con PE fue de 27.08 ± 7.23 . El promedio de edad de las participantes en los grupos de estudio fue similar, por lo que la variable de edad no se utilizó como criterio de estratificación debido a que no se observaron diferencias significativas entre los grupos.

Al hacer las comparaciones del número de células con MN, PN y BN (marcadores de daño al ADN), CL, CR y CC (marcadores de citotoxicidad o muerte celular) en las células de mucosa bucal de lengua y carrillo de puérperas con y sin PE, se encontraron como resultados, los siguientes: en células de carrillo, el número de PN, BN, y CR incrementó significativamente ($p < 0.05$) en las muestras de células de carrillo del grupo de puérperas con PE comparado con las puérperas sin PE (*Figura 1a*). En células de mucosa bucal de lengua se observó incremento significativo ($p < 0.05$) en el número de MN, PN, BN, y CR en el grupo de puérperas con PE (*Figura 1b*).

En la *figura 2a-2d* se pueden observar las células de mucosa bucal con MN, PN y BN; en la *figura 3a-3d* se muestran las células de mucosa bucal con CL, CR, CC y PIC tomadas de las participantes antes de este estudio.

MN en eritrocitos de sangre periférica del recién nacido pretérmino de puérperas con y sin periodontitis

Se recuperaron en total de 46 muestras de sangre periférica de RNP de madres con ($n = 21$) y sin PE ($n = 25$). El promedio de edad gestacional de los RNP de puérperas sin PE fue de 34.92 ± 2.05 y con PE fue de 31.08 ± 2.55 semanas de gestación. Al hacer las comparaciones del número de EPCMN, EMN y EPC entre los RNP de puérperas con y sin PE se observó que los RNP de puérperas con PE mostraron incremento significativo ($p = 0.03$) en el número de EPCMN, comparado con el grupo de RNP de puérperas sin PE (*Figura 4*).

En la *figura 5a-5b* se pueden observar EMN de sangre periférica de los RNP.

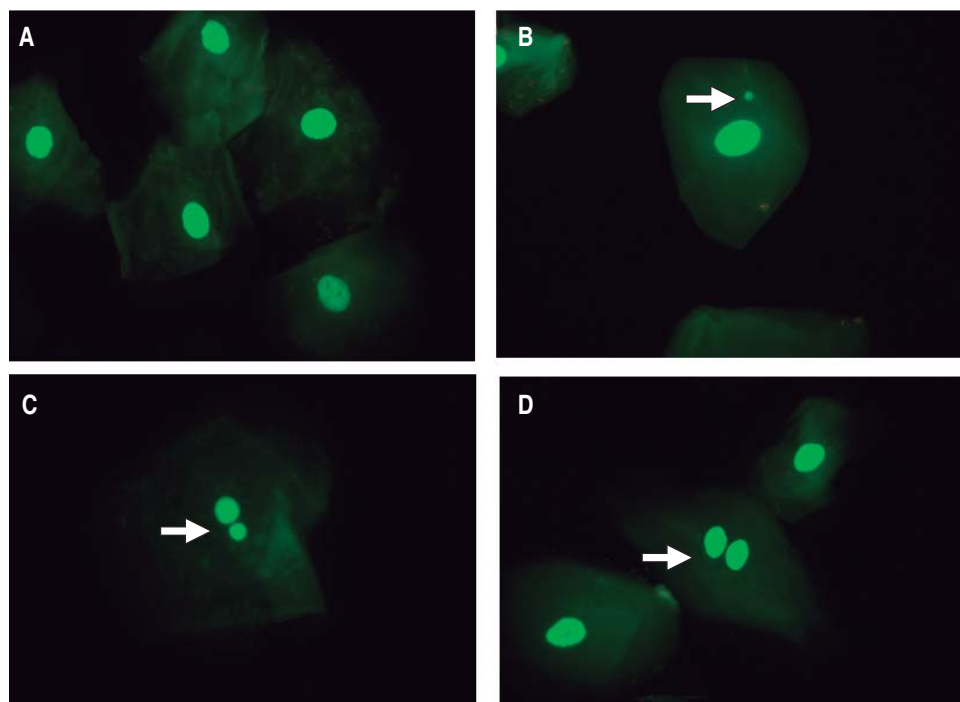
DISCUSIÓN

Se ha descrito que algunas enfermedades afectan al material genético determinado como incremento en el número de MN, ya que se ha observado que el número de MN espontáneo está incrementado;

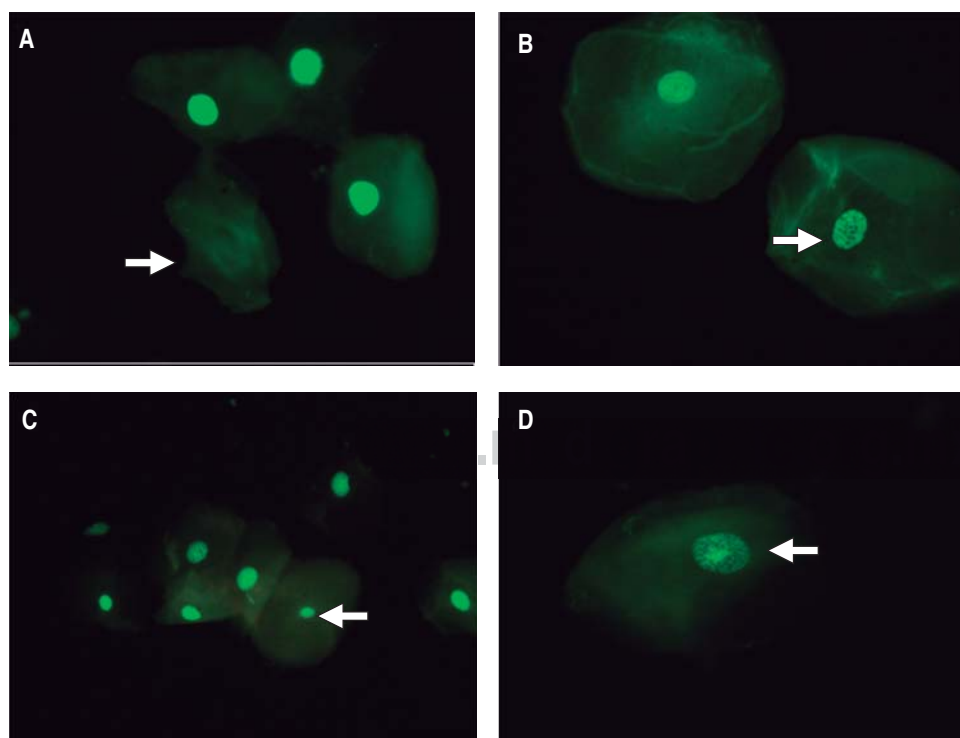
por ejemplo, en pacientes con lupus eritematoso sistémico,⁸ y artritis reumatoide,⁹ asimismo en pacientes con diferentes tipos de cáncer¹⁰ y en diabéticos.¹¹ En el presente trabajo observamos que la PE *per se* incrementa el número de MN y AN, lo que se traduce en el ámbito celular como daño al ADN. Hasta hace algunos años, la etiopatogenia de la PE estaba explicada principalmente, mediante el enfoque de los procesos infecciosos-higiénicos. La placa dentobacteriana ha sido considerada como un factor de riesgo importante para el desarrollo de la PE; sin embargo, otros factores que influyen de manera considerable en su aparición son el tabaquismo, la caries, y la edad (> 60 años), entre otros.¹² No obstante, en los últimos años se le ha relacionado con el EOx, ya que su fisiopatogenia está basada en la infección y la inflamación crónica que la caracterizan. Esta reacción inflamatoria es la respuesta del huésped ante los agentes patógenos y sus productos; su finalidad es proteger los tejidos del ataque bacteriano; sin embargo, puede no ser tan benéfica porque en exceso puede llegar a dañar las propias células y las estructuras periodontales, ya que durante ésta ocurre una liberación de RL.¹³ La presencia de MN en la sangre del RNP permite tener una herramienta para estudiar el potencial teratógeno de padecimientos de la madre o de medicamentos que haya ingerido durante el embarazo, como fue demostrado previamente en un modelo experimental.¹⁴ En el presente trabajo se observaron diferencias significativas al comparar el número de EPCMN de los RNP de puérperas con PE comparadas con los de puérperas sin PE.

CONCLUSIÓN

El incremento en el daño al ADN analizado como aumento en el número de MN y AN en células de mucosa bucal de carrillo y lengua de puérperas con PE, así como en el incremento de EPCMN en sangre periférica en el RNP de puérperas con PE, indica que la PE *per se* incrementa el daño al ADN y su potencial efecto teratógeno para el RNP de madres con PE. Esto demuestra la importancia de fomentar en la población en general, y en especial en las gestantes, la promoción de la salud bucal durante el embarazo, ya que es una de las medidas que puede contribuir a mejorar la calidad de vida de la embarazada y su hijo.

**Figura 2.**

Marcadores de daño al ADN en las células de la mucosa bucal evaluados en el presente estudio: **A.** Célula normal. **B.** Micronúcleo. **C.** Prolongación nuclear. **D.** Binucleada (Instituto de Investigación en Odontología, CUCS/U de G, objetivo de inmersión 60x, tinción naranja acridina).

**Figura 3.**

Marcadores de citotoxicidad o muerte celular en las células de la mucosa bucal evaluados en el presente estudio: **A.** Cariolisis. **B.** Cariorrexis. **C.** Picnosis. **D.** Cromatina condensada (Instituto de Investigación en Odontología, CUCS/U de G, objetivo de inmersión 60x, tinción naranja de acridina).

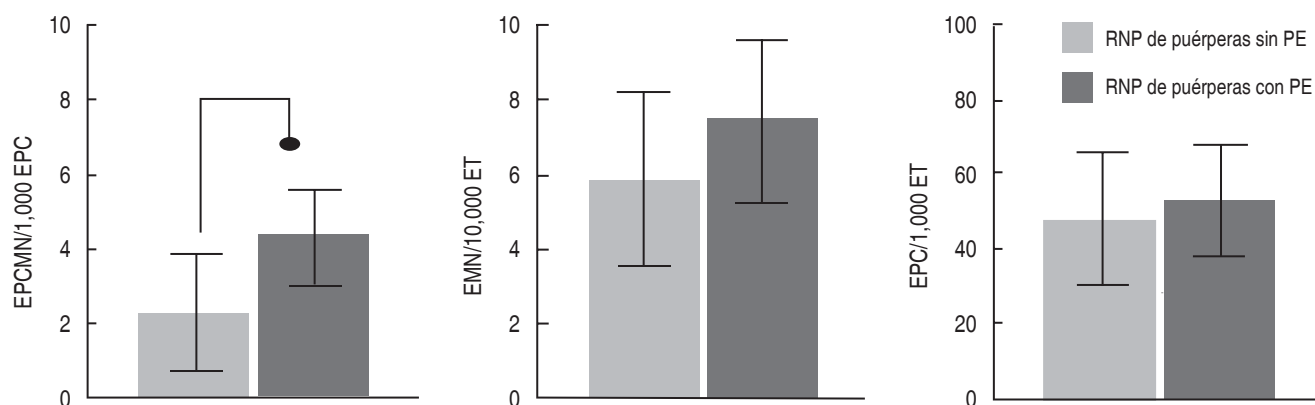


Figura 4. Distribución de la frecuencia de EPCMN, EMN y EPC en los prematuros de puérperas con y sin PE. RNP: recién nacido pretérmino; PE: periodontitis; EPC: eritrocitos policromáticos; EMN: eritrocitos micronucleados; EPCMN: eritrocitos policromáticos micronucleados; ET: eritrocitos totales. ●: Diferencia significativa.

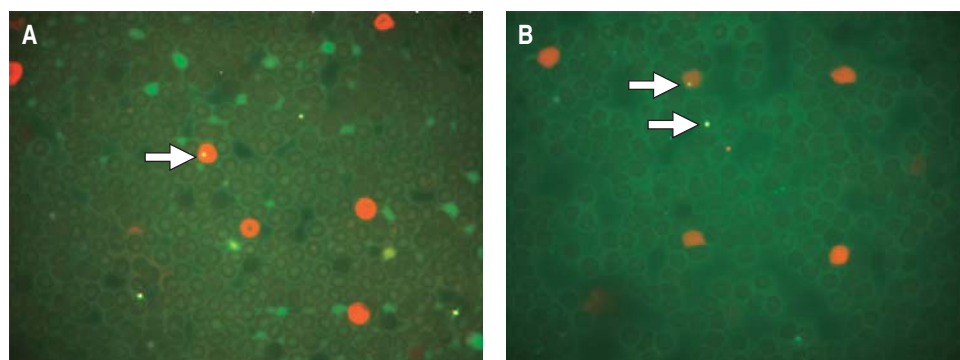


Figura 5.

Eritrocitos de sangre periférica de recién nacido pretérmino: **A.** Eritrocito policromático micronucleado. **B.** Eritrocito micronucleado (Instituto de Investigación en Odontología, CUCS/U de G, objetivo de inmersión 100x, tinción naranja de acridina).

BIBLIOGRAFÍA

- Canakci CF, Cicek Y, Yildirim A, Sezer U, Canakci V. Increased levels of 8-hydroxydeoxyguanosine and malondialdehyde and its relationship with antioxidant enzymes in saliva of periodontitis patients. *Eur J Dent.* 2009; 3: 100-106.
- Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol.* 1999; 4: 1-6.
- Zamora-Pérez AL, Lazalde-Ramos BP, Sosa-Macías MG, Gómez-Meda BC, Torres-Bugarín O, Zúñiga-González GM. Methylphenidate lacks genotoxic effects in mouse peripheral blood erythrocytes. *Drug Chem Toxicol.* 2011; 34: 294-299.
- Chang TI, Loeken MR. Genotoxicity and diabetic embryopathy: impaired expression of developmental control genes as a cause of defective morphogenesis. *Semin Reprod Endocrinol.* 1999; 17: 153-165.
- Batista-González CM, Corona-Rivera JR, Gómez-Meda BC, Zamora-Pérez AL, Ramos-Ibarra ML, Zúñiga-González GM. Micronucleated erythrocytes in preterm newborns in relation to maternal pathology. *Rev Biomed.* 2006; 17: 11-16.
- Zúñiga-González G, Gómez-Meda BC, Zamora-Pérez A, Ramos-Ibarra ML, Batista-González CM, Espinoza-Jiménez S, Gallegos-Arreola MP, Álvarez-Moya C, Torres-Bugarín O. Induction of micronuclei in proestrus vaginal cells from colchicine and cyclophosphamide-treated rats. *Environ Mol Mutagen.* 2003; 42: 306-310.
- Ceppi M, Biasotti B, Fenech M, Bonassi S. Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: Statistical and epidemiological issues. *Mutat Res.* 2010; 705: 11-19.
- Migliore L, Botto N, Scarpato R, Petrozzi L, Cipriani G, Bonuccelli U. Preferential occurrence of chromosome 21 malsegregation in peripheral blood lymphocytes of Alzheimer disease patients. *Cytogenet Cell Genet.* 1999; 87: 41-46.
- Ramos-Remus C, Dorazco-Barragan G, Aceves-Avila FJ, Alcaraz-Lopez F, Fuentes-Ramirez F, Michel-Diaz J, Torres Bugarin O, Ventura-Aguilar A, Zúñiga-Gonzalez G. Genotoxicity assesment using micronuclei assay in rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Rheumatol.* 2002; 20: 208-212.
- Torres-Bugarín O, Ventura-Aguilar A, Zamora-Perez A, Gómez-Meda BC, Ramos-Ibarra ML, Morgan-Villela G, Gutiérrez-Franco, Zúñiga-González G. Evaluation of cisplatin + 5-FU, carboplatin + 5-FU, and ifosfamide + epirubicine regimens using the micronuclei test and nuclear abnormalities in the buccal mucosa. *Mutat Res.* 2004; 565: 91-101.

11. Zúñiga-González GM, Batista-González CM, Gómez-Meda BC, Ramos-Ibarra ML, Zamora-Perez AL, Muñoz-Magallanes T, Ramos-Valdés C, Gallegos-Arreola MP. Micronuclei in diabetes: folate supplementation diminishes micronuclei in diabetic patients but not in an animal model. *Mutat Res*. 2007; 634: 126-134.
12. Nelly AL, Holford TR, Löe H, Ånerud Å, Boysen H. The natural history of periodontal disease in man. Risk factors for progression of attachment loss in individual receiving no oral health care. *J Periodontol*. 2001; 72: 1006-1015.
13. Lindhe J. *Periodontología clínica e implantología odontológica*. 5ª ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2005: 430.
14. Gómez-Meda BC, Zúñiga-González GM, Zamora-Pérez A, Ramos-Ibarra ML, Batista-González CM, Torres-Mendoza BM. Folate supplementation of cyclophosphamide-treated mothers diminishes micronucleated erythrocytes in peripheral blood of newborn rats. *Environ Mol Mutagen*. 2004; 44: 174-178.

Correspondencia:

Dra. en C. Ana Lourdes Zamora-Pérez

E-mail: anazamora@gmail.com