



## Disminución del daño nuclear y oxidativo al ADN en pacientes con periodontitis después de la ingesta de ácido fólico

Juan Carlos Gómez Mireles,\* Gabriela Morales Velázquez,\*\* Yveth Marlene Ortiz García,\*\* Belinda Claudia Gómez Meda,\*\*\* Celia Guerreo Velázquez,\*\* Ana Laura Mendoza López,\* Vianeth María del Carmen Martínez Rodríguez,\* Ana Lourdes Zamora Pérez\*\*

### RESUMEN

**Introducción:** La periodontitis (PE) es una enfermedad que no sólo afecta la cavidad bucal, sino también la salud general del individuo, ya que es una enfermedad que cursa con incremento en la producción de estrés oxidativo y radicales libres (RL), lo que puede causar daño al ADN. Los antioxidantes como el ácido fólico (AF) pueden actuar como una terapia coadyuvante para reforzar el sistema de defensa antioxidante y prevenir el daño que pueden causar los RL en la PE. **Objetivo:** Determinar la modificación del daño nuclear y oxidativo al ADN en pacientes con PE después de la ingesta de AF. **Material y métodos:** Se formaron dos grupos: grupo 1 ( $n = 30$ ) individuos sin PE y grupo 2 ( $n = 35$ ) individuos con PE. Ambos grupos fueron expuestos a 5 mg vía oral de ácido fólico tres veces al día durante 30 días. A todos los participantes se les tomaron muestras de mucosa bucal y de saliva, una al inicio del estudio y la segunda muestra 30 días después. El daño nuclear se determinó por medio del ensayo de micronúcleos (MN) y anomalías nucleares (AN) en células de mucosa bucal. El daño oxidativo se determinó por medio de la cuantificación de niveles de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG) en saliva por el ensayo de ELISA. **Resultados:** El grupo con PE presentó incremento significativo ( $p < 0.05$ ) en el número de MN y AN, así como en los niveles de 8-OHdG en la muestra basal comparado con el grupo sin PE. Despues de la ingesta de AF, los valores de MN, AN y 8-OHdG disminuyeron de manera estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) al compararlos con los valores basales en ambos grupos. **Conclusión:** El número de MN y AN así como los niveles 8-OHdG disminuyeron significativamente en individuos con PE, al igual que en el grupo sin PE después de la ingesta de AF.

**Palabras clave:** Periodontitis, ácido fólico, micronúcleos, anomalías nucleares, 8-OHdG, células de mucosa bucal, saliva.

### ABSTRACT

**Introduction:** Periodontitis (PE) is a disease that not only affects the oral cavity, but also disturbs the overall health of the individual since the PE course with an increased in the production of oxidative stress and free radicals (FR) which increases DNA damage. Antioxidants, such as folic acid (FA), can act as an adjuvant to strengthen the antioxidant defense system and prevent the damage that causes the FR in PE. **Objective:** Determine the nuclear and oxidative DNA damage in patients with PE after (FA) intake. **Material and methods:** Two groups were formed: group 1 ( $n = 30$ ) subjects without PE and group 2 ( $n = 35$ ): subjects with PE. Both groups were exposed to 5 mg of FA orally 3 times daily for 30 days. From all participants, buccal mucosa and saliva samples were taken, one at the beginning of FA intake and the next 30 days later. Nuclear damage was determined by means of micronuclei (MN) and nuclear abnormalities (NA) assay in buccal mucosa cells. Oxidative damage was determined by quantifying the levels of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) in saliva by ELISA assay. **Results:** The PE group presented significant increase numbers ( $p < 0.05$ ) in MN, NA and in the levels of 8-OHdG in the baseline sample compared with the group without PE. And after the intake of FA the values of MN, NA and 8-OHdG decreased statistically significant ( $p < 0.05$ ) when compared with baseline values, in both groups. **Conclusion:** The number of MN, NA and 8-OHdG levels was significantly decreased in patients with PE and in the group without PE after folic acid intake.

**Key words:** Periodontitis, folic acid, micronuclei, nuclear abnormalities, 8-OHdG, buccal mucosa cells, saliva.

### INTRODUCCIÓN

Se ha propuesto que el estrés oxidativo, así como el aumento en la producción de radicales libres (RL) pudieran ser elementos fundamentales en la fisiopatogenia de diversas enfermedades crónico-degenerativas como diabetes, alteraciones cardiovasculares y cáncer, a través del daño celular y molecular;<sup>1,2</sup> en el área odontológica podemos encontrar la periodontitis (PE)<sup>3</sup> enfermedad presente en la población mexicana; que no

\* Clínica de la Especialidad en Periodoncia, Departamento de Clínicas Odontológicas Integrales.

\*\* Instituto de Investigación en Odontología, Departamento de Clínicas Odontológicas Integrales.

\*\*\* Instituto de Biología Molecular en Medicina y Terapia Génica, Departamento de Biología Molecular y Genómica.

Centro Universitario de Ciencias de la Salud. Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México.

Recibido: 30 de septiembre de 2015. Aceptado: 30 de octubre de 2015.

sólo afecta la cavidad bucal, sino la salud general del individuo. En la PE el estrés celular pudiera contribuir al desarrollo de procesos inflamatorios y disfunción endotelial, característicos de este padecimiento inflamatorio crónico en el que además de afectar los tejidos de sostén del diente puede producir daño al ADN.<sup>3,4</sup> Actualmente se conocen pruebas con las que puede determinarse el daño al ADN,<sup>4</sup> como es el caso del ensayo de micronúcleos (MN) y anomalías nucleares (AN) en células de mucosa bucal<sup>5</sup> así como la cuantificación 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG).<sup>4</sup> Los antioxidantes, en este caso el ácido fólico (AF), pueden actuar como una terapia coadyuvante en conjunto con los tratamientos mecánicos y locales para reforzar el sistema de defensa antioxidante y prevenir el daño que puedan causar los RL en la PE.<sup>6,7</sup> De tal manera, el objetivo del trabajo fue determinar la disminución del número de MN y AN en células de mucosa bucal y los niveles de 8-OHdG en saliva de pacientes con periodontitis después de la ingesta de AF.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se tomaron muestras de células de mucosa bucal y saliva de individuos con y sin PE y se formaron los siguientes grupos: 1: individuos con PE ( $n = 30$ ) y 2: individuos sin PE ( $n = 35$ ). Las muestras fueron obtenidas de la Clínica de Especialidades de Periodoncia del Departamento de Clínicas Odontológicas del Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara.

Aquellos individuos que aceptaron participar en el estudio firmaron una carta de consentimiento informado y contestaron un cuestionario sobre información personal relativa a hábitos como fumar, consumo de alcohol, género, edad, hábitos alimentarios y el consumo de drogas o antioxidantes. Todos los participantes en general tenían buena salud bucal y en el caso del grupo con PE no recibieron terapia periodontal. Se excluyeron mujeres embarazadas, consumidores de alcohol, fumadores, individuos con enfermedades sistémicas, así como individuos con enfermedades crónico degenerativas como la artritis reumatoide, diabetes, problemas hepáticos e individuos que hubieran pasado por procedimientos radiológicos ( $< 1$  mes).

### Grupos de estudio

El diagnóstico de PE fue llevado a cabo por un mismo especialista en periodoncia (**JCGM**) de acuerdo con

los parámetros de inclusión y los criterios diagnósticos de la Academia Americana de Periodoncia.<sup>8</sup>

Grupo 1 o sin PE: los individuos presentaron estado periodontal sano y buena higiene oral, sin antecedentes de cualquier enfermedad periodontal, no presentaron signos clínicos de inflamación gingival, no había evidencia de pérdida de inserción, sangrado o pérdida de hueso radiográficamente.

Grupo 2 o con PE: los individuos presentan inflamación gingival, presencia de placa bacteriana y profundidad al sondeo  $> 6$  mm, pérdida de inserción clínica  $> 5$  mm, sangrado y pérdida de hueso radiográficamente.

### Determinación del daño nuclear ADN por medio del ensayo de MN

- Preparación y análisis de muestras de mucosa bucal

A todos los participantes se les pidió que se enjuagaran la boca con agua purificada; después con un portaobjetos se hizo un raspado de la mucosa de carrillo, para obtener la muestra basal de ambos grupos y después de la ingesta de AF (30 días) se procedió a tomar una segunda muestra; el material obtenido se extendía por duplicado sobre una lamilla limpia. Ambos grupos recibieron 5 mg de AF vía oral<sup>I</sup> tres veces al día durante 30 días. Las muestras se dejaron secar al aire, se fijaron con metanol 80% por 48 horas y se procedió a la tinción con naranja de acridina, de acuerdo con la técnica ya descrita,<sup>9</sup> colorante específico para ácidos nucleicos, el cual emite fluorescencia. Las muestras se observaron bajo microscopio<sup>II</sup> con el objetivo 60x, con sistema iluminador de fluorescencia<sup>III</sup> y se contaron los MN y AN que incluían células binucleadas (BN), células con prolongación nuclear (PN), cariolisis (CL), cariorrexis (CR), cromatina condensada (CC) y células picnóticas (PIC). Los criterios utilizados fueron los descritos por Thomas et al, el número de células con MN y AN se evaluaron a 2,000 células por muestra.<sup>10</sup> Los resultados son presentados como MN y AN en 1,000 células.

<sup>I</sup> Lab. Valdecasas, S.A., Reg. No. 82231, S.S.A.IV

<sup>II</sup> Olympus modelo CX31

<sup>III</sup> Olympus modelo CX-RFLT50: Lámpara de mercurio 50w y filtro de fluorescencia azul DMB-2

## Determinación del daño oxidativo al ADN por medio de la determinación de 8-OHdG

- Obtención, preparación y análisis de muestras de saliva

A los participantes se les indicó que depositaran 2 mL de saliva no estimulada en un tubo Eppendorf, almacenándose a -80 °C hasta su análisis. Se recolectaron dos muestras de saliva por participante, una muestra inicial o basal antes de la ingesta de AF y una final a los 30 días después de haber iniciado la ingesta de AF. La determinación de 8-OHdG se realizó por medio de la prueba ELISA.<sup>IV</sup> La placa fue leída a una longitud de onda de 450 nm mediante un lector de ELISA.<sup>V</sup> Las absorbancias de la lectura se registraron en una base de datos para posteriormente calcular la concentración de 8-OHdG con respecto a las absorbancias de la curva estándar. Las concentraciones se expresaron como ng/mL de la 8-OHdG.

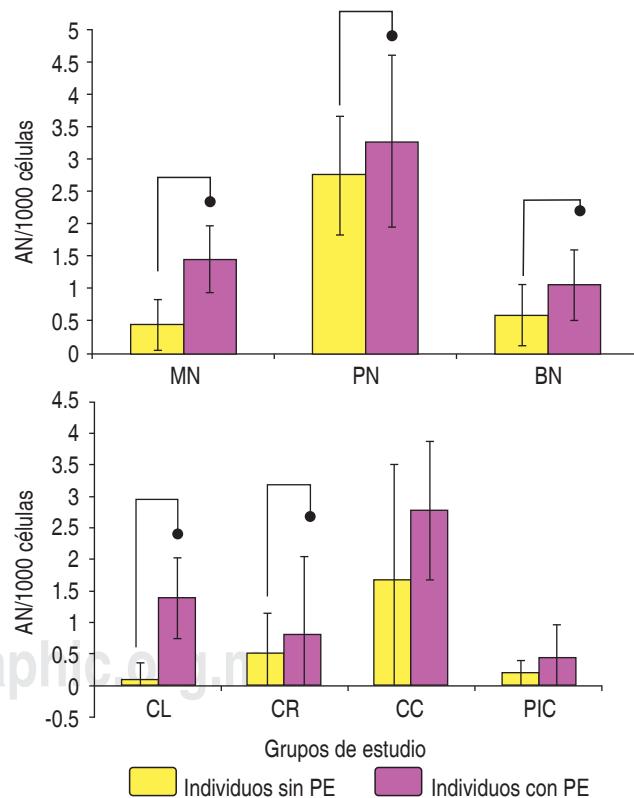
**Consideraciones éticas.** A todos los participantes se les informó el objetivo del estudio. El consentimiento de las personas que desearon participar se obtuvo por escrito de acuerdo con el reglamento de la Ley General de Salud de México, 2002. Este consentimiento se basa en el acuerdo con la Secretaría de Salud y Bienestar Social Nacional y su Reglamento de la Ley General de Salud de México, en materia de Investigación para la Salud 1987, Título Segundo, de los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos, en su Artículo 17, categoría II, esta investigación está considerada como riesgo mínimo.

**Análisis estadístico.** Los resultados se evaluaron mediante la prueba de U de Mann-Whitney para muestras dependientes y la prueba de Wilcoxon para muestras independientes. Cuando el valor de  $p$  fue  $< 0.05$  se consideró estadísticamente significativo. Las pruebas estadísticas se realizaron por medio del programa SPSS (v.11.0) para Windows®. Los resultados se presentan como promedio  $\pm$  desviación estándar del número de MN o AN, así como los niveles de 8-OHdG de los grupos estudiados.

## RESULTADOS

Se analizó un total de 65 muestras de mucosa bucal de individuos con y sin PE. El promedio de edad de los individuos sin PE fue  $39.45 \pm 5.73$  y con PE fue  $42.08 \pm 9.66$ . El promedio de edad de los 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 intergrupo e intragrupo de los marcadores de daño al ADN (número de células con MN, PN y BN) y de los marcadores de citotoxicidad o muerte celular (número de células con CL, CR y CC) en células de mucosa bucal de individuos con y sin PE, los resultados fueron los siguientes:



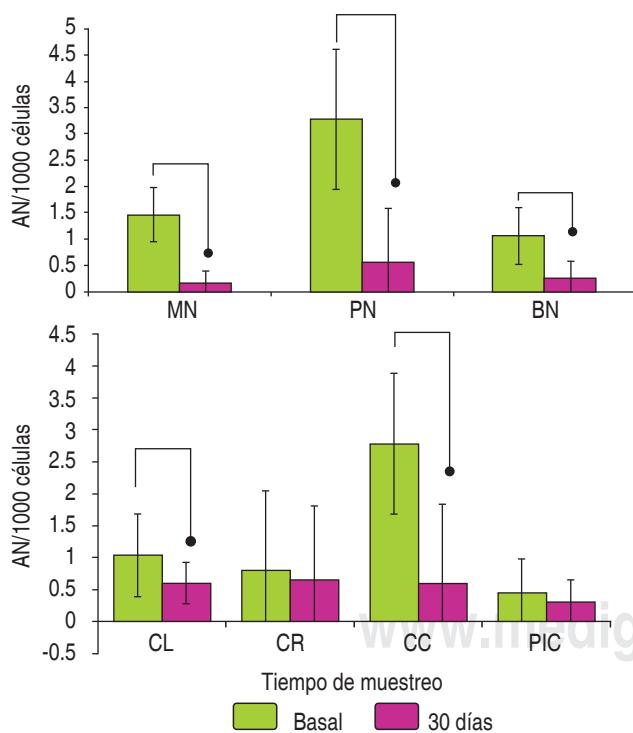
**Figura 1.** Valores basales de MN y AN en células de mucosa bucal en los grupos de estudio.

AN: anomalías nucleares; PE: periodontitis; MN: micronúcleo; PN: prolongación nuclear; BN: binucleada; CL: carioplasia; CR: cítrorresis; CC: cromatina condensada; PIC: picnosis; • ( $p < 0.05$ ).

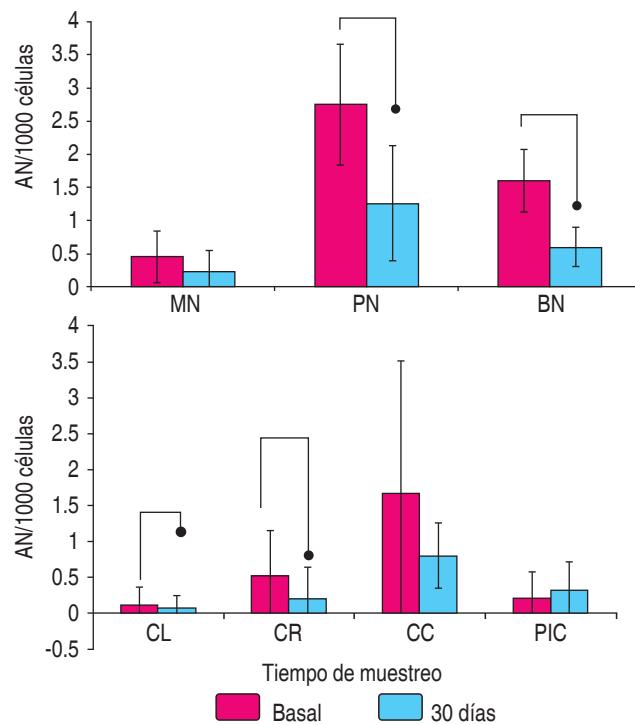
<sup>IV</sup> Kit Cayman Chemical (No. de catálogo 589320)

<sup>V</sup> Poweán, modelo WHY101

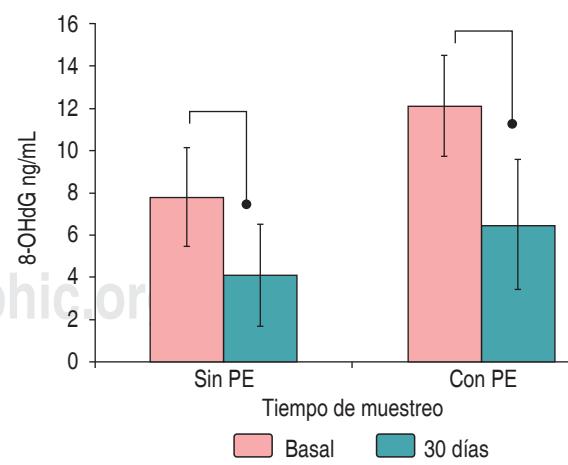
- Muestra basal. Al hacer las comparaciones intergrupo, en el grupo con PE se observó aumento estadísticamente significativo en el número de células con MN ( $p = 0.007$ ), PN ( $p = 0.007$ ), BN ( $p = 0.001$ ), CL ( $p = 0.001$ ) y CR ( $p = 0.007$ ), al compararlo con el grupo sin PE (*Figura 1*).
- Comparación intragrupo. Antes y después de la ingesta del AF, en el grupo con PE se observó disminución significativa en los valores de MN ( $p = 0.001$ ), PN ( $p = 0.001$ ), BN ( $p = 0.001$ ), CL ( $p = 0.001$ ), y CC ( $p = 0.001$ ) (*Figura 2*).
- Grupo control. Se observó disminución significativa en el número de PN ( $p = 0.03$ ), BN ( $p = 0.03$ ), CL ( $p = 0.01$ ) y CC ( $p = 0.001$ ) (*Figura 3*), lo que evidencia en ambos grupos el efecto benéfico antioxidant del AF.
- Niveles de 8-OHdG. En la determinación basal, el grupo con PE comparado con el control, presentó



**Figura 2.** Diferencias en los valores de MN y AN antes y después de la ingesta de ácido fólico en el grupo con PE.  
AN: anormalidades nucleares; PE: periodontitis; MN: micronúcleo; PN: prolongación nuclear; BN: binucleada; CL: cariolisis; CR: cariorrexis; CC: cromatina condensada; PIC: picnosis; • diferencia significativa ( $p < 0.05$ )



**Figura 3.** Diferencias en los valores de MN y AN antes y después de la ingesta de ácido fólico en el grupo sin PE de estudio. AN: anormalidades nucleares; PE: periodontitis; MN: micronúcleo; PN: prolongación nuclear; BN: binucleada; CL: cariolisis; CR: cariorrexis; CC: cromatina condensada; PIC: picnosis; diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).



**Figura 4.** Diferencias en los valores de 8-OHdG antes y después de la ingesta de ácido fólico en el grupo con y sin PE. 8-OHdG: 8-hidroxi-2-desoxiguanosina; PE: periodontitis; diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

- tasas mayores con diferencia significativa ( $p = 0.001$ ) de este marcador de daño oxidativo.
- Niveles de 8-OHdG en la segunda determinación. Disminuyeron en ambos grupos, siendo estadísticamente más manifiesto en el grupo control (*Figura 4*).
  - Número de PIC. No se observaron variaciones en los diferentes tiempos de muestreo.

En la *figura 5* pueden observarse células de mucosa bucal con MN, PN y BN y en la *figura 6* se muestran células de mucosa bucal con CL, CR, CC y PIC tomadas de los participantes del presente estudio.

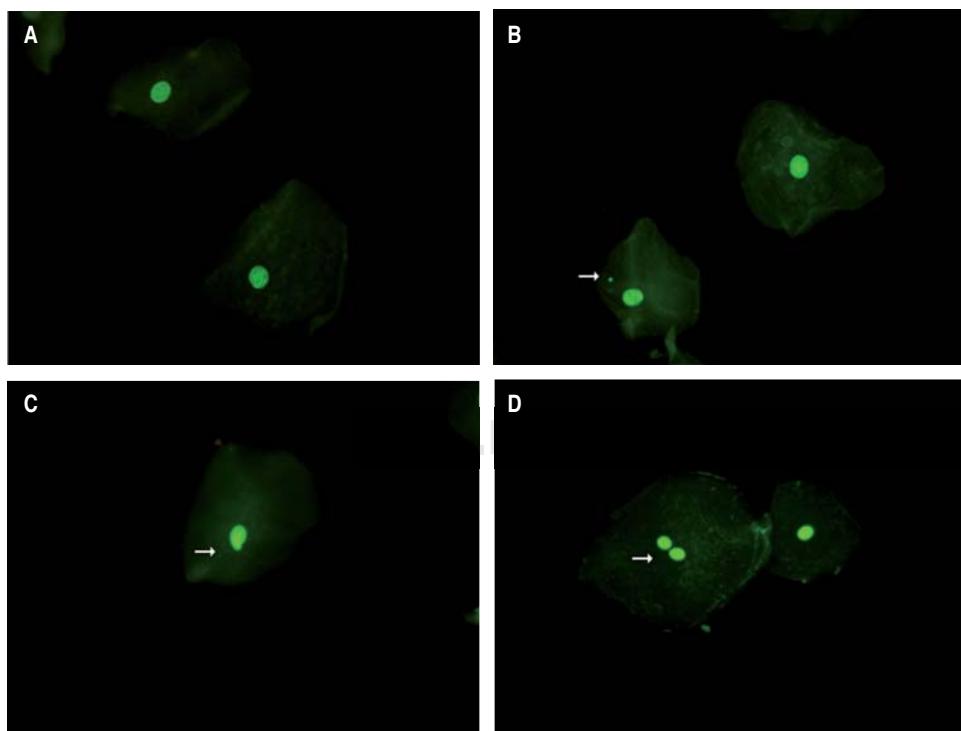
## DISCUSIÓN

En el presente estudio se evaluó la modificación de los fenómenos de daño nuclear y oxidativo al ADN subsecuentes a la ingesta de AF mediante el conteo de MN y AN en células de mucosa bucal y la cuantificación de los niveles de 8-OHdG en saliva; ya que por su rasgos patogénicos la PE (enfermedad crónica degenerativa presente en 90% de la población mexicana,<sup>11,12</sup> que puede tener efectos adversos en

la salud general de los individuos) está asociada al incremento de estrés oxidativo y al aumento en la producción de radicales libres (RL).<sup>3</sup>

El aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno es una característica de la mayoría de las enfermedades humanas crónico-degenerativas, incluyendo las enfermedades cardiovasculares y el cáncer; en las que la ingesta de antioxidantes en la dieta puede ser especialmente importante en la protección contra los efectos nocivos asociados a la aparición de RL.<sup>13</sup> Los MN reflejan el daño al ADN y el efecto genotóxico ocurrido en las células de la capa basal del tejido de las mucosas, las cuales migran hacia la capa epitelial y son detectados en las células exfoliadas en el transcurso de las siguientes tres semanas.<sup>10</sup> La prueba de MN en células de mucosa bucal es uno de los ensayos genéticos más utilizado como un indicador de genotoxicidad *in vivo*.<sup>14</sup>

La producción excesiva de sustancias prooxidantes, así como el déficit o la pérdida de sustancias antioxidantes, son las responsables de generar estrés oxidativo y producir daño molecular irreversible; y con esto aumentar los RL y la inducción del daño a proteínas, lípidos y ADN,<sup>15,16</sup> conducentes a estados disfuncionales y patológicos.



**Figura 5.**

Marcadores de daño al ADN en células de mucosa bucal evaluados en el presente estudio: (A) célula normal; (B) micronúcleo; (C) prolongación nuclear y (D) binucleada (objetivo de inmersión 60x, tinción naranja de acridina).

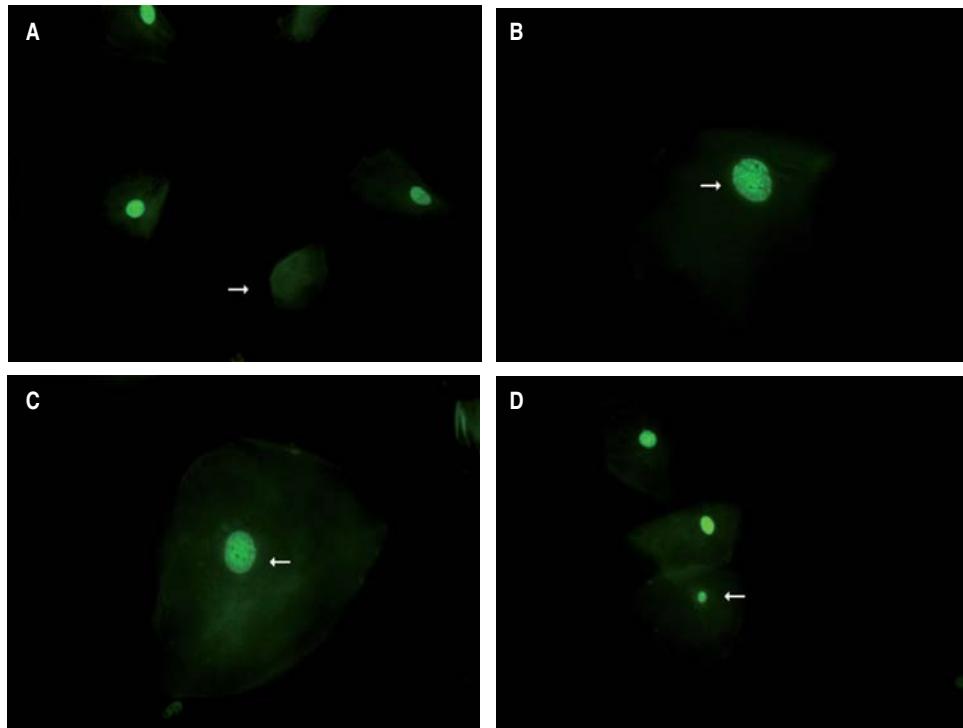


Figura 6.

Marcadores de citotoxicidad o muerte celular en células de mucosa bucal evaluados en el presente estudio: (A) cariogenesis; (B) caries; (C) cromatina condensada; (D) pycnosis (objetivo de inmersión 60x, tinción naranja de acridina).

Las determinaciones basales de este estudio se asemejan a los resultados de otros trabajos como los de Zamora-Pérez et al.<sup>4</sup> en los que individuos con periodontitis presentan mayor número de MN al igual que incremento en la mayoría de los marcadores de daño al ADN (PN y BN) y de citotoxicidad (CL y CR), así como en los niveles de 8-OHdG en relación con individuos sanos, planteándose la incógnita del efecto que pudiera tener sobre estos resultados la ingesta de un antioxidante del tipo de AF; observándose en este estudio decrementos de los indicadores y marcadores estudiados, subsecuentes a la ingesta de AF como lo muestra el cuadro I:

En estudios similares en diabéticos se ha observado disminución en el número de MN en células de mucosa oral de pacientes con diabetes y participantes no diabéticos después de la ingesta de AF durante 30 días.<sup>6</sup> La reducción significativa en el número de MN, AN y los niveles de 8-OHdG observada en los individuos con PE de la población de estudio puede deberse al protocolo de AF utilizado. El AF como antioxidante parece prevenir la aparición de RL que son altamente reactivos y pueden iniciar una reacción en cadena que daña las células, tejidos celulares y biomoléculas, como

Cuadro I. Cifras basales versus determinaciones a los 30 días.

Indicador o marcador	% de disminución
MN	90
PN	83
BN	76
CL	42
CC	78
CR	20
PIG	31

ácidos nucleicos, proteínas, polisacáridos y lípidos.<sup>17</sup> El daño oxidativo al ADN inducido por los RL puede darse por varias vías incluyendo la modificación oxidativa de las bases nucleotídicas, azúcar o formando entrecruzamientos entre las cadenas de ADN. Tales modificaciones pueden dar lugar a mutaciones, pérdida de la expresión de algunos genes, rompimiento de las cadenas de ADN y con ello la formación de MN.<sup>4</sup> En el proceso inflamatorio crónico que presentan los individuos con PE se produce un estado oxidativo y la

posibilidad de un exceso en la producción RL, lo que podría provocar un desequilibrio celular exponiendo algunas complicaciones colaterales en los individuos con PE.

El empleo de AF en el manejo preventivo, terapéutico y control de la EP podría resultar de gran beneficio en individuos susceptibles a EP. Los folatos actúan como cofactores para las activaciones enzimáticas que conducen a la síntesis de ADN y ARN, son necesarios también para la conversión de homocisteína a metionina, que es un aminoácido requerido en la biosíntesis de diversos fosfolípidos. La decisión de empleo de ácido fólico (vitamina B9) se derivó del reconocimiento de su influencia en la prevención de enfermedades neoplásicas, cardiovasculares y defectos del nacimiento, siendo su influencia antioxidante uno de sus atributos: el AF es un nutriente básico para la actividad celular que interviene en el metabolismo de numerosos órganos y sistemas corporales; consecuentemente su carencia hace susceptible a los individuos a enfermedades.<sup>18</sup> Aunque en este estudio no se determinó la preexistencia de una carencia de AF en los sujetos participantes, su ingesta como suplemento sugiere tener una influencia benéfica en el funcionamiento celular.

En el adulto los requerimientos diarios son de aproximadamente 50 µg/día y cualquier exceso de ácido fólico se excreta principalmente por la orina. En su administración por vía oral no se considera tóxico y se toleran dosis altas.<sup>19,20</sup> El ácido fólico está indicado para diferentes padecimientos a dosis orales que pueden variar de 0.1 a 1 mg por día o dosis mayores que van desde 3 hasta 15 mg diarios. En este estudio se empleó una dosis mayor hacia su rango bajo, 5 mg por día en una presentación oral sintética que es un monoglutamato que se absorbe por completo, aun en los síndromes de absorción deficiente.

El suplemento de este antioxidante que tiene además la ventaja de ser inocuo, incluso a altas dosis, sería un factor determinante en la disminución del daño al material genético, por lo cual puede sugerirse que si este daño fuera neutralizado o revertido, la calidad de vida y el pronóstico de complicaciones secundarias a una enfermedad mejoraría; lo que podría considerarse al incidir en la fisiopatogenia de la EP a través del uso de folatos.

## CONCLUSIÓN

El suplemento de 15 mg diarios en dosis de 5 mg de AF podría tener un efecto protector en individuos

con PE y ser un adyuvante significativo en terapias estándares (operatorias, quirúrgicas y quimioterapéuticas) en el control y manejo de la periodontitis inflamatoria crónica, al contravenir procesos de genotoxicidad, como lo muestra la reducción de los niveles de MN, AN así como los de 8-OHdG después de 30 días de la ingesta.

## REFERENCIAS

1. Venereo-Gutiérrez JR. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Rev Cub Med Milit. 2002; 31: 126-133.
2. Rodríguez-Perón JM, Menéndez-López JR, Trujillo-López Y. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. Rev Cubana Med Milit. 2001; 30: 36-44.
3. 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.
4. Zamora-Pérez AL, Ortiz-García YM, Lazalde-Ramos BP, Guerrero-Velázquez C, Gómez-Meda BC, Ramírez-Aguilar MA et al. Increased micronuclei and nuclear abnormalities in buccal mucosa and oxidative damage in saliva from patients with chronic and aggressive periodontal diseases. J Periodontal Res. 2015; 50: 28-36.
5. Zamora-Pérez AL, Mariaud-Schmidt RP, Fuentes-Lerma MG. Increased number of micronuclei and nuclear anomalies in buccal mucosa cells from people exposed to alcohol-containing mouthwash. Drug Chem Toxicol. 2013; 36: 255-260.
6. Zúñiga-González GM, Batista-González CM, Gómez-Meda BC, Ramos-Ibarra ML, Zamora-Pérez AL, Muñoz-Magallanes T et al. Micronuclei in diabetes: folate supplementation diminishes micronuclei in diabetic patients but not in an animal models. Mutat Res. 2007; 634: 126-134.
7. Dorado MC, Rugerio VC, Rivas AS. Estrés oxidativo y neurodegeneración. Rev Fac Med UNAM. 2003; 46: 229-235.
8. Armitage GC. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. Periodontol 2000. 2004; 34: 9-21.
9. Zúñiga-González G, Gómez-Meda BC, Zamora-Pérez A, Ramos-Ibarra ML, Batista-González CM, Espinoza-Jiménez S et al. Induction of micronuclei in proestrus vaginal cells from colchicine- and cyclophosphamide treated rats. Environ Mol Mutagen. 2003; 42: 306-310.
10. Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E et al. Buccal micronucleus cytome assay. Nature Protocols. 2009; 4: 825-837.
11. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. Ann Periodontol. 1999; 4: 1-6.
12. Xiong X, Buekens P, Fraser WD, Beck J, Offenbacher S. Periodontal disease and adverse pregnancy outcomes: a systematic review. BJOG. 2006; 113: 135-143.
13. Jacob RA, Burri BJ. Oxidative damage and defense. Am J Clin Nutr. 1996; 63: 895s-990s.
14. Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMAN project perspective on current status and knowledge gaps. Mutant Res. 2008; 659: 93-108.
15. King GL, Brownlee M. The cellular and molecular mechanisms of diabetic complications. Endocrinol Metab Clin North Am. 1996; 25: 255-270.

16. Tavares DC, Mazzaron-Barcelos GR, Silva LF, Chacon-Tonin CC, Bastos JK. Propolis-induced genotoxicity and antigenotoxicity in Chinese hamster ovary cells. *Toxicology in Vitro*. 2006; 20: 1154-1158.
17. Gracy RW, Talent JM, Kong Y, Conrad CC. Reactive oxygen species: the unavoidable environmental insult? *Mutat Res*. 1999; 16: 17-22.
18. Cortes MF, Hirsch BS, De La Mara CMP. Importancia del ácido fólico en la medicina actual. *Rev Med Chile*. 2000; 128: 213-220.
19. Katzung BG. Farmacología básica y clínica. México, D.F.: Manual Moderno; 1991: p. 922.
20. McVan BF. Physician's drug handbook. Pennsylvania, USA: Springhouse Corporation; 1993: p. 1683.

Correspondencia:

**Dra. en C. Ana Lourdes Zamora-Pérez**  
E-mail: anazamora@gmail.com