



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**EFFECTO *IN VITRO* DEL FLUORURO DE SODIO SOBRE LA
APOPTOSIS DURANTE LA ODONTOGÉNESIS DE MURINOS
PROGRAMA DE TITULACION POR ALTO PROMEDIO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANO DENTISTA

PRESENTA:

LUIS FERNANDO JACINTO ALEMÁN

DIRECTOR:

DR. JUAN CARLOS CUAUHTEMOC HERNÁNDEZ GUERRERO

ASESORES:

C.D. MARIA DOLORES JIMÉNEZ FARFAN

DRA. ANA MARÍA FERNÁNDEZ PRESAS

DR. CONSTANTINO LEDESMA MONTES

MÉXICO D. F. JUNIO DE 2005

m. 347504

AGRADECIMIENTOS

gradezco a Dios, que estuvo conmigo en cada paso de mi vida y por haberme permitido llegar hasta este día.

gradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, la institución que me acepto, educo y me brinda el momento cada uno de mis deseos académicos y personales.

gradezco a mi madre, por tu apoyo incondicional en los momentos difíciles, eres crucial para que pueda continuar, gracias por mostrarme que en la vida se debe preparar para las circunstancias más inesperadas y enseñarme que tanto de triunfos y derrotas se aprende y sobre todo gracias por darme tu amor de madre.

Gracias a mi padre, por formar parte de esta familia, algunos logros fueron debidos a que tú eres mi padre.

Gracias a mis hermanos, Cande y Rene, son un gran ejemplo, ustedes abrieron camino a mi me tocó seguir sus pasos. Muchas gracias por su ayuda en cada problema.

Gracias a mis hermanas, Yaya Lety, Fita, Noe y Monse sus cuidados y atenciones son tan valiosos como el oro mismo, parte de mi crecimiento se los debo a ustedes.

Gracias a Blanca Itzel, hoy puedo decir que uno de mis anhelos se ha cumplido, gracias por acompañarme en cada paso de la carrera, IQM²

Gracias al Doctor Juan Carlos, por aceptarme en el laboratorio sin mas referencias que el deseo de aprender, mas que un maestro es un gran amigo.

Gracias a la futura Doctora Dolores, muchas cosas que hoy puedo decir conozco se las debo a usted, Doctora.

Gracias al Doctor Constantino y la Doctora Ana Maria, por aceptar formar parte de este trabajo, cada detalle enriqueció no solo la tesis, si no también a mi persona, Gracias.

Gracias a Mary, Felix, Ale, Rafa y Lety, por ser compañeros y amigos, por su ayuda y aprecio, si las cosas salen bien estaré un rato más por el laboratorio.

ÍNDICE

Página

1. Resumen	
2. Introducción	
3. Antecedentes	3
3.1 Propiedades físico-químicas del flúor	3
3.2 Metabolismo del flúor en el organismo	3
3.3 Vías de administración	5
3.3.1 Administración sistémica	5
3.3.2 Administración tópica	5
3.4 Efectos benéficos del flúor	5
3.5 Toxicidad del flúor	6
3.6 Apoptosis	7
3.6.1 Generalidades	7
3.6.2 Mecanismos bioquímicos y genéticos de la apoptosis	9
3.6.3 Detección de apoptosis	12
3.6.4 Apoptosis durante la odontogénesis	13
4. Planteamiento del problema	15
5. Justificación	15
6. Hipótesis.	16
6.1 Hipótesis de investigación	16
7. Objetivos	16
7.1 Objetivos generales	16
7.2 Objetivos específicos	16
8. Tipo de estudio	16
9. Universo o población	16
10. Materiales y métodos	17
10.1 Materiales	17
10.2 Método	18
10.2.1 Técnica de TUNEL	19
11. Recursos	20
11.1 Humanos	20
11.2 Físicos	20
12. Criterios de inclusión	20
13. Criterios de eliminación	20
14. Variable independiente	21
15. Variable dependiente	21
16. Análisis estadístico de datos	21
17. Resultados	21
17.1 Peso y talla	21
17.2 Histológica	22
17.3 Técnica de TUNEL	22
18. Discusión	25
19. Conclusiones	27
20. Bibliografía	29

1. RESUMEN

Antecedentes: La apoptosis es una forma de muerte celular que se presenta normalmente durante la formación de diversos órganos, incluyendo al germen dentario. Está reconocido que el fluoruro es capaz de inducir apoptosis en diferentes tipos celulares (hepatocitos, osteoblastos, neuronas y ameloblastos) y que su consumo excesivo puede provocar fluorosis dental. No obstante que se reconoce el papel del fluoruro como un agente inductor de apoptosis, todavía no se ha mostrado si este efecto se presenta en la odontogénesis.

Objetivo: Determinar el efecto del fluoruro como inductor de apoptosis durante la odontogénesis de murinos. **Métodos:** 32 gérmenes de primer molar inferior de ratones Balb/c de 1 día neonatal se cultivaron durante 3 días con diferentes concentraciones de fluoruro de sodio (0mM, 1mM y 5mM), se fijaron en paraformaldehído al 4%, se descalcificaron en EDTA al 10% durante 10 días. Los especímenes se incluyeron en parafina y se realizaron cortes seriados a 4µm. Para evaluar la apoptosis se utilizó la técnica TUNEL. **Resultados:** Se observó desorganización celular en el retículo estrellado y odontoblastos, así como aumento en la presencia de matriz dentinaria de los grupos experimentales, células apoptóticas en la región de los ameloblastos de cúspides y odontoblastos. **Conclusiones:** Nuestro resultados sugieren que el fluoruro de sodio puede inducir cambios morfológicos en el retículo estrellado, así como apoptosis en ameloblastos y odontoblastos de gérmenes de primer molar inferior de ratón.

2. INTRODUCCIÓN

El flúor (F) es un elemento de la naturaleza catalogado dentro de la tabla periódica como un halógeno, es el más electronegativo de todos los elementos, lo que le permite reaccionar o combinarse con la mayoría de ellos, en particular con los metales formando compuestos denominados fluoruros.

El papel del fluoruro en la prevención de la caries dental comenzó desde 1945 con la fluoración del agua. Desde entonces, muchas ciudades del mundo cuentan con agua fluorada y con otras fuentes de fluoruro en la sal, suplementos, pastas dentales, colutorios, geles y barnices. Numerosos reportes avalan los resultados y la efectividad de estas medidas; sin embargo, se han reportado los efectos tóxicos de su administración tales como la fluorosis dental y esquelética. Otro de los efectos tóxicos recientemente investigados en diferentes estudios *in vitro* es su efecto como inductor de apoptosis.

La apoptosis es un tipo de muerte celular que se presenta durante el desarrollo embrionario como parte del proceso de organogénesis. Durante la organogénesis algunos tipos celulares dejan de proliferar y entran en apoptosis después de haber experimentado un número determinado de divisiones. Sin embargo, este tipo de muerte celular no es exclusivo del desarrollo embrionario ya que es común en tejidos con una tasa alta de recambio como los epitelios. Asimismo, se presenta en aquellas células que han sufrido mutaciones, infecciones por virus o también por la inducción de distintos agentes químicos sobre tejidos normales.

La apoptosis durante la odontogénesis es fundamental para el correcto desarrollo del germen dental, se ha demostrado que su ausencia durante el desarrollo puede propiciar la presencia de dientes supernumerarios. Existen escasos reportes en la literatura en los que se estudie el papel que juega el fluoruro en la apoptosis durante la odontogénesis, por lo que el objetivo de nuestro estudio fue determinar los efectos del fluoruro durante la odontogénesis y su papel como inductor de apoptosis.

3. ANTECEDENTES

3.1 Propiedades físico-químicas del flúor

El símbolo químico del flúor es la F, es un gas amarillo, venenoso, pertenece al grupo VIIB de la tabla periódica, su número atómico es 9, su peso atómico es 18.9989 y su densidad es 17 dm^3 ; pertenece al grupo de los halógenos (halógeno: *gr.* productor de sales), al reaccionar con metales forman sales (fluoruros). Químicamente es el elemento más reactivo y electronegativo de todos (electronegatividad 4). Es peligroso al contacto con la piel ya que ocasiona quemaduras. Fue identificado por Scheele en 1771 y aislado por primera vez por Moissan en 1886.¹

3.2 Metabolismo del flúor en el organismo

a) Absorción

La absorción se realiza a nivel del estómago y en la parte proximal del intestino delgado. Esta etapa depende del pH, debido a la presencia de ácido clorhídrico (HCl) en el medio gastrointestinal, que junto con la ionización del fluoruro de sodio (NaF) se formará ácido hidrofúorico (HF), este compuesto es capaz de difundir a través de membranas en respuesta a diferencias del pH en fluidos de compartimentos corporales adyacentes, mostrando un mayor índice de absorción que la forma iónica de flúor.²

En ausencia de altas concentraciones de cationes como calcio y aluminio (los cuales forman compuestos insolubles con el fluoruro en un 80-90%) el fluoruro se absorbe en aproximadamente 30 minutos y su absorción es cuantitativamente diferente en niños y ancianos.³

Una variante que se debe considerar es la forma química en la que se encuentre el fluoruro al administrarse, es decir, cuando se encuentra como NaF ó monofluorofosfato disódico ($\text{Na}_2\text{PO}_3\text{F}$ o MFP). Al MFP es hidrolizado por las fosfatasas quienes rompen la unión covalente de su molécula para la posterior absorción del ion flúor (F^-); en el caso de NaF, su unión iónica se disuelve fácilmente en una solución acuosa y por lo tanto se absorbe más rápidamente en el estómago. El proceso de absorción se realiza por medio de difusión

y depende de la solubilidad del compuesto fluorado, pH estomacal, presencia de otros elementos como el Ca, Mg y la edad del individuo.³

b) Distribución

Después de absorberse, la estancia del fluoruro en el plasma depende de la frecuencia y cantidad de la ingesta. Whitford (1994) reportó que el flúor no se encuentra unido a ninguna proteína plasmática, por esta razón se cree que el flúor puede tener la misma concentración en los líquidos intersticiales. Están reportadas diferentes tasas de concentración de flúor en el organismo. Por ejemplo en el cerebro existen valores muy bajos de flúor, por lo que se puede concluir que la barrera hemato-encefálica es relativamente impermeable a este ión. El tejido graso pélvico es pobremente perfundido por el fluoruro, mientras que las tasas de concentración en los riñones y en el fémur son altas.³

c) Excreción

Las concentraciones de flúor disminuyen, debido a su eliminación por el riñón y su absorción en tejidos duros. El fluoruro se filtra libremente a través de los capilares glomerulares experimentando un grado variable de reabsorción debida al pH renal; esto incluye la difusión de HF y la impermeabilidad de los epitelios a la forma iónica del fluoruro. Entre más alcalina sea la orina, más formas iónicas existirán y entre más ácida, más HF se formará. La composición de la dieta (cuando es rica en carne aumenta la acidez), ciertas drogas y el metabolismo de la persona (adulto o niño) intervienen en el proceso de reabsorción.⁴

Los tejidos duros (hueso y esmalte dental), contribuyen a la disminución de la concentración del flúor en la sangre y se sabe que la absorción de flúor por los huesos es inversamente proporcional a la edad, es decir, a menor edad mayor absorción, debido a que durante el periodo de desarrollo óseo, los cristales de un hueso joven son más pequeños, más abundantes, pobremente organizados y con un alto grado de hidratación, lo que permite tener una mayor superficie de absorción de flúor que en un hueso maduro.³

3.3 Vías de administración

3.3.1 Administración sistémica

La ingesta de fluoruro se considera importante para minimizar o prevenir la caries. La OMS respalda la fluoración del agua como medida de Salud Pública.⁴ La concentración óptima del fluoruro en el agua se considera de 0.7-1.2 ppm (ppm = parte por millón = mg/Litro).⁵

Existen otras medidas preventivas como la fluoración de la sal (200-250 mg/kg) y la leche.^{5,6}

3.3.2 Administración tópica

Se usan diversos agentes para la aplicación tópica y profesional del fluoruro. Éstos son el fluoruro de sodio (NaF) al 2% en solución acuosa y fluoro-fosfato acidulado (APF) al 1.23%, así como el uso cada vez más generalizado de barnices fluorurados. El potencial preventivo de los agentes tópicos, en particular los de aplicación profesional, dependen de su capacidad para depositar fluoruro en el esmalte.⁷

Las pastas dentales tienen un contenido aproximado de 1000-1500 ppm de fluoruro (1mg F/g pasta). También existen pastas dentales para niños que contienen 250 ó 500 ppm. Los fluoruros que se agregan frecuentemente son el MFP, fluoruro de sodio y fluoruro estanooso.^{8,9}

3.4 Efectos benéficos del flúor

Está reconocido que el flúor puede actuar tanto por vía sistémica, como tópica, por lo que tiene un excelente efecto anticariogénico.⁸ El mecanismo de acción del flúor por el cual puede actuar contra la caries es el siguiente:

- El flúor en etapa post-eruptiva impide la pérdida de mineral de la sub-superficie cristalina del esmalte y conduce a la remineralización. Cuando la remineralización toma lugar en presencia de flúor, el esmalte reconstruido es más resistente que el

mineral original; este efecto es evidente usando concentraciones de flúor muy bajas (menores a 0.1 ppm).⁹

- El flúor interfiere en la vía glicolítica de los microorganismos propiciando la reducción en la producción de ácido e interfiere con la regulación enzimática del metabolismo de carbohidratos y de esta forma reduce la acumulación de polisacáridos intra y extracelulares.^{10,11}
- La presencia continua de bajos niveles de flúor en la interfase esmalte-placa provee un modo efectivo de remineralización del esmalte desmineralizado.^{12,13}

3.5 Toxicidad del flúor

Investigaciones realizadas en modelos experimentales animales (ratones, ratas y conejos) han demostrado que la ingesta de bifluoruro de amonio, fluoruro de sodio o ácido fluorhídrico ocasionan manifestaciones tóxicas sistémicas como: alteraciones en los electrolitos (hipocalcemia)¹⁴ y metabolitos plasmáticos (glucosa y creatinina)¹⁵, cambios electrocardiográficos con disritmias ventriculares¹⁶, daño al tejido renal¹⁷, cambios estructurales de las partes caudal y coronal del epidídimo¹⁸, disminución en el número de macrófagos alveolares¹⁹ y en el contenido total de fosfolípidos de células hepáticas, demostrando que el efecto del fluoruro varía según el tipo celular estudiado.²⁰

Estudios *in vitro* realizados en células ováricas, de médula ósea, cuerpo vertebral, fibroblastos de prepucio, mucosa bucal, células de pulpa humana y odontoblastos de ratón demostraron que el fluoruro es un agente genotóxico^{21, 22, 23} capaz de producir detención del ciclo celular, además provoca inhibición la síntesis y reparación del ADN, inducir deleciones, traslocación y fragmentaciones cromosómicas, además de ser citotóxico e inhibidor de la síntesis de proteínas, función mitocondrial, proliferación y tamaño celular.^{24, 25, 26, 27}

La fluorosis dental y esquelética son los efectos tóxicos más estudiados en modelos *in vitro* e *in vivo*^{28,29} Ambas son ocasionadas por la ingesta de fluoruro en grandes cantidades, siendo éstos dos de los principales problemas que se presentan actualmente.³⁰

El fluoruro reduce el patrón de formación del esmalte, aumenta la cantidad de contenido orgánico (proteínas) en la matriz adamantina.³¹ Estos cambios pueden deberse a efectos sobre los ameloblastos o sobre el proceso de mineralización, alteraciones en la homeostasis del calcio, alteraciones en la secreción de proteínas y efecto sobre las proteinasas.^{31, 32} El signo característico de la fluorosis dental es la superficie del esmalte con opacidades, que implican porosidad en el tejido. Está demostrado que la porosidad deriva del crecimiento incompleto del cristal así como alteraciones en la correcta yuxtaposición de los cristales.³³

Estudios realizados en modelos animales e *in vitro*, demostraron que algunas enzimas como la dipeptidil peptidasa II, caseín-cinasa y fosfatasa alcalina que participan en el proceso de mineralización del diente, están alteradas e incluso inhibidas por la presencia del flúor.^{34,35}

Otros investigadores demostraron que durante las diferentes etapas de maduración de los ameloblastos (pre-secretoria, secretoria, transicional y maduración), los mecanismos involucrados en la remoción de proteínas están inhibidos por el fluoruro a concentraciones inferiores a 1.5µmol/L.^{29, 36}

Datos recientes sobre toxicidad demostraron la participación del fluoruro como agente inductor de apoptosis. Estudios *in vitro* demostraron que el fluoruro induce apoptosis mediante peroxidación lipídica e inducción de estrés oxidativo propiciando la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial, provocando la liberación del citocromo c³⁷. Otros demostraron inducción de apoptosis por fluoruro mediante modificaciones en la señalización intracelular vía proteínas G.³⁸

3.6 Apoptosis

3.6.1 Generalidades

El concepto de “muerte celular programada” fue acuñado por Lockshin y col. quienes describieron la muerte de las células que ocurría en lugares y momentos determinados como eventos programados dentro del plan de desarrollo de un organismo.³⁹ Kerr acuñó el

término apoptosis (del griego: caída de hojas de los árboles) para referirse a la morfología particular de la muerte celular que resulta de la activación regulada por un programa de muerte pre-existente y codificado por el genoma.⁴⁰

Existen dos tipos de muerte celular: necrosis y apoptosis. La necrosis es el proceso de muerte que ocurre cuando una célula presenta daño severo y pierde, entre otras cosas, la integridad de su membrana, lo que la lleva a la muerte por lisis; esto provoca la liberación del contenido celular, lo que favorece la aparición de procesos inflamatorios. Mientras que la muerte celular por apoptosis es una muerte que se presenta ya sea porque el organismo necesita para su desarrollo de la muerte en particular de esa célula, o bien porque la célula sufrió un daño irreparable (infección por virus o células neoplásicas) y la célula muere en beneficio del organismo.⁴¹

Uno de los primeros cambios morfológicos que presentan las células que inician el proceso de apoptosis consiste en la condensación del citoplasma y la reducción del volumen celular. El estudio de diferentes tipos celulares y métodos para inducir apoptosis, han mostrado que el volumen celular disminuye durante la apoptosis antes que se presenten características ultraestructurales o eventos bioquímicos (fragmentación del ADN, liberación del citocromo c y activación de caspasa 3).⁴² Cambios en la homeostasis iónica intracelular median la apoptosis, por ejemplo los cambios en calcio libre y potasio inducen la apoptosis en células como linfocitos, células de próstata y hepatocitos.⁴³

La siguiente característica que se presenta durante la apoptosis es condensación y marginación de la cromatina nuclear formando acúmulos densos adosados a la membrana, seguido de invaginaciones de la membrana nuclear terminando con la fragmentación del núcleo en estructuras membranosas con cantidades variables de cromatina, lo que se conoce como la formación de micronúcleos.⁴⁴

De manera análoga, la membrana celular experimenta invaginaciones que terminan por fragmentar a la célula formando racimos de vesículas de tamaño variado quienes contienen organelos intactos sin fusión con los lisosomas. A estas vesículas se les llama cuerpos apoptóticos, que son fagocitados rápidamente.⁴⁵ En general, existen dos estrategias para la

fagocitosis: a) en tejidos con bajos índices de apoptosis, donde la fagocitosis la realizan las células vecinas y b) en tejidos con altas tasas de apoptosis donde existen células especializadas generalmente macrófagos quienes realizan la función.⁴⁶ Los cambios que se presentan en la membrana celular favorecen su reconocimiento por los fagocitos. Existe evidencia de que la fosfatidilserina, la cual normalmente está confinada a la cara interna de la membrana plasmática, presenta cambios en su distribución durante la apoptosis, lo que permite a macrófagos y otras células el reconocer esto como una señal de fagocitosis.⁴⁷

3.6.2 Mecanismos bioquímicos y genéticos de la apoptosis

Una de las principales vías que median la apoptosis en las células de los mamíferos son los receptores de superficie celular que transmiten señales de apoptosis y se activan por ligandos específicos de muerte. Los receptores de muerte pertenecen a la superfamilia de los receptores del factor de necrosis tumoral (TNF-R) y el factor de necrosis neural (NNF-R), que contienen un dominio extracelular rico en cisteínas y una secuencia homóloga citoplasmática llamada dominio de muerte (DD). Los receptores de muerte mejor caracterizados son el Fas, TNFR1 y TRAIL quienes son ligandos inductores de apoptosis relacionados al TNF.⁴⁸

Al igual que otros miembros de la familia TNF, el Fas es una molécula homotrimérica, por lo que se sugiere que cada trímero de Fas ligando (FasL) se une a tres moléculas de Fas (Figura. 1). Esta unión promueve la oligomerización del receptor e inmediatamente después la proteína adaptadora llamada FADD (dominio de muerte asociado a Fas o Mort 1) se asocia al dominio de muerte del receptor.³⁷ La proteína FADD se une a través de su propio dominio de muerte a la procaspasa 8 lo que conduce a su activación en caspasa 8. La caspasa 8 (conocida como FLICE o MACH) es la responsable de activar a otra caspasa como la 3.³⁷ El interés en este receptor aumentó cuando ratones con mutaciones del gen que codifica para este receptor, presentaron trastornos linfoproliferativos por su incapacidad para inducir apoptosis.⁴⁹

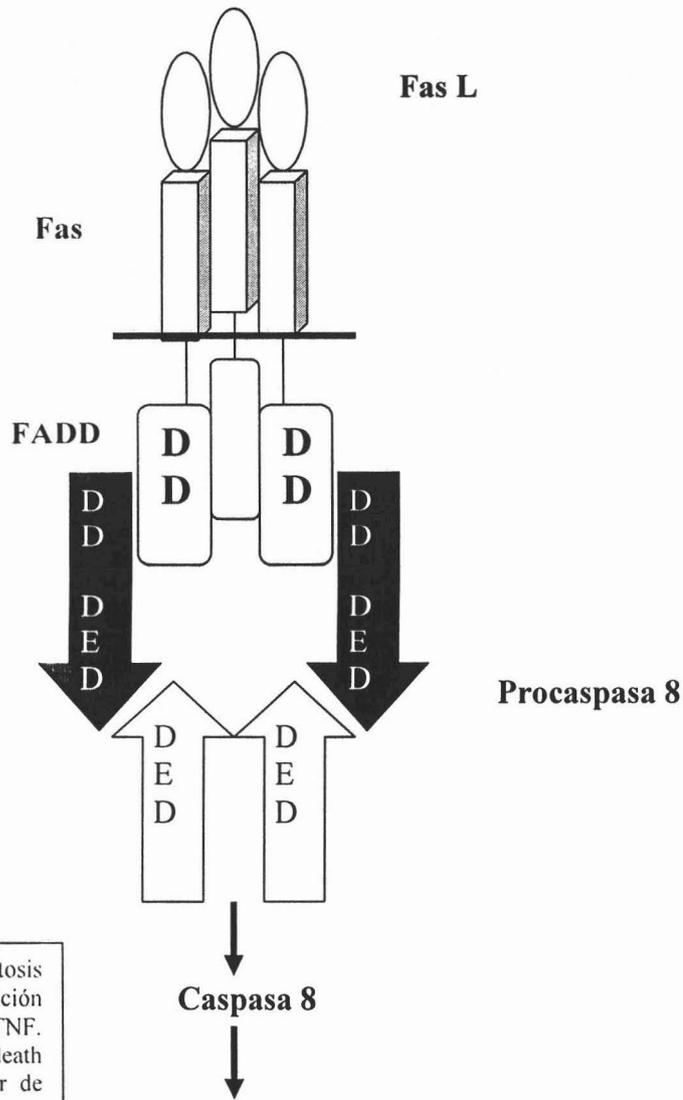


Figura 1. Proceso de apoptosis activada por medio de la interacción ligando-receptor de la familia TNF. DD= dominio de muerte (death domain), DED= dominio efector de muerte (death effector domain).

Activación caspasas → APOPTOSIS

Otra forma de mediar la apoptosis es inducir cambios en el potencial de membrana mitocondrial por la producción de radicales libres, ceramidas, hidrólisis de la esfingomiélin y la activación de una proteasa semejante a la caspasa 3 (Figura 2).⁵⁰ El factor activador de proteasas apoptóticas (Apaf-1) interactúa con el citocromo c liberado por la mitocondria e inician la cascada de activación de las caspasas, o bien, al unirse a alguna proteína miembro de la familia Bcl-2 impide la apoptosis al evitar la activación de las caspasas.⁵¹

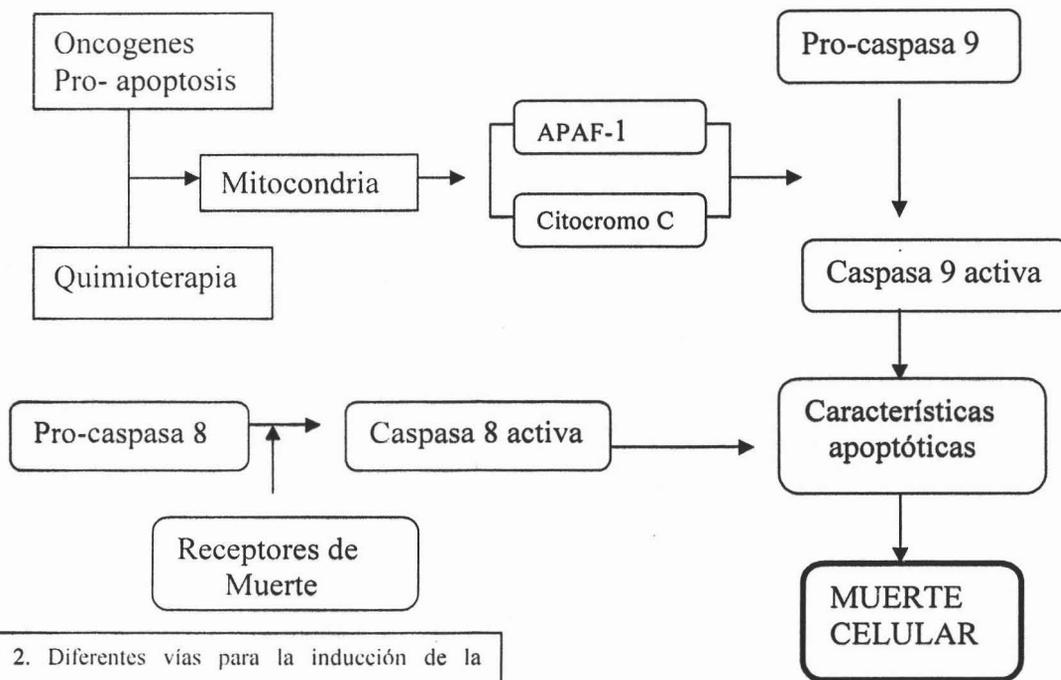


Figura 2. Diferentes vías para la inducción de la apoptosis. Por la activación de receptores de muerte o alteración de la mitocondria.

Las vías bioquímicas relacionadas con la apoptosis se encuentran actualmente en investigación pues, son varios los factores que intervienen en este proceso. Uno ellos son las caspasas, que pertenecen a una familia de proteasas de cisteína que son efectores universales de apoptosis. En respuesta al estímulo apoptótico, la pro-enzima de caspasa se divide en residuos específicos de ácido aspártico hasta generar la subunidad activa. Una vez activada la caspasa, induce apoptosis en la célula por división o alteración de diversas proteínas y funciones intracelulares.⁵² Están identificadas trece caspasas en mamíferos teniendo distintos papeles en la apoptosis (2, 3, 6, 7, 8, 9, 10) e inflamación (1, 4, 5, 11, 12, 13).⁵³

Las caspasas están presentes en el citoplasma de la mayoría de las células de mamíferos en forma inactiva como proenzimas, por lo que existen por lo menos tres vías por las cuales se pueden activar. La primera necesita de otra caspasa; la segunda, a través de receptores de muerte de la familia TNFR/NGFR y la tercera incluye la traslocación del citocromo c desde la mitocondria hasta el citoplasma.⁴⁰

El bcl-2 (B cell leukemia/lymphoma 2 genes) fue el primer proto-oncogén identificado que se encuentra asociado a procesos malignos de las células B. Durante la maduración de dichas células B puede haber traslocación cromosómica en el gen bcl-2; ésto provoca aumento en la expresión de la proteína citoplasmática Bcl-2, que tiene actividad anti-apoptótica.⁵⁴

El gen bcl-2 forma parte de una familia de genes que intervienen en la regulación de la supervivencia celular. Los miembros de la familia Bcl-2 son: Bcl-2, Bax, Bad, Bcl-Xl, Bcl-Xs y Mcl-1. La supervivencia o apoptosis de la célula dependerá de las diferentes interacciones entre estas proteínas, ya que unas actúan como pro-apoptóticas y otras como antiapoptóticas. Por ejemplo, el Bcl-Xl actúa inhibiendo la apoptosis, mientras que Bad la promueve al unirse e inhibir al Bcl-Xl.^{55,56,57}

El gen supresor tumoral p-53 es un mediador de muerte celular por apoptosis en células malignas y normales de diferente linaje.⁵⁸ Están propuestos dos modelos para explicar el mecanismo de acción en la muerte celular por apoptosis. El primero indica que p-53 induce genes relacionados con la oxido-reducción generando especies reactivas de oxígeno para promover la degradación de componentes mitocondriales mediante degradación oxidativa. El otro modelo es que p-53 media la inducción del receptor de muerte (DR5), un receptor de la familia del factor de necrosis tumoral, que induce la muerte mediante las caspasas por medio de proteólisis.⁵⁹

3.6.3 Detección de apoptosis

Debido a que la apoptosis es un proceso dinámico y presenta diferentes características dependiendo del momento en el que se encuentre la célula, ésto permite disponer de una gran variedad de técnicas para su detección.⁶⁰

Ya que la definición de apoptosis originalmente se creó en base a parámetros morfológicos, los cambios en las estructuras especializadas como las microvellosidades, la organización y simetría de la membrana plasmática y condensación de cromatina visualizadas en microscopia electrónica son útiles para su detección. La detección de la degradación de

ADN se realiza por medio de electroforesis o por marcaje en células individuales y la detección de la activación de caspasas por medio de inmunohistoquímica, estas diversas técnicas permiten tener una localización más exacta y precisa de los sitios de apoptosis.³⁵

Actualmente uno de los métodos mas usados para detectar apoptosis es el método de TUNEL [Deoxinucleotidil Transferasa Terminal (TdT) que média el marcaje de hebras terminales de Trifosfatos de Deoxiuridina (uUTP)]. Éste método detecta apoptosis por la fragmentación de ADN y las terminales libres 3'-OH. Esas terminaciones libres 3'-OH se marcan enzimáticamente con un nucleótido modificado. El ensayo de TUNEL detecta la ruptura de hebras simples y dobles y se puede utilizar en una gran variedad de tejidos.⁶¹

3.6.5 Apoptosis durante la odontogénesis

Durante la odontogénesis se llevan a cabo diversos eventos celulares como son; la migración, proliferación, diferenciación y muerte celular, estableciendo una interacción espaciotemporal de la relación epitelio-mesénquima⁶², lo que está ampliamente descrito durante el desarrollo de los órganos dentarios.⁶³

El tamaño apropiado y correcta posición de los órganos dentales necesita durante su formación un balance entre proliferación y muerte celular. La apoptosis juega un papel activo en la morfogénesis de los órganos dentales, en la reducción de la lámina dental y la eliminación de células durante el desarrollo del órgano del esmalte.⁶⁵

Estudios de la odontogénesis en modelos murinos demostraron que en el epitelio odontogénico a los 11 días prenatales o embrionarios (E11) no se detecta la presencia de células apoptóticas; al inicio de la etapa de botón o brote (E12-E13) las células apoptóticas se localizan en el epitelio del botón y bajo el ectodermo bucal. En la etapa de capuchón (E14-E15) se observan células apoptóticas en el primer nudo de esmalte (enamel knot) quien desaparece rápidamente y también se observan algunas células apoptóticas en el mesénquima. Posteriormente, durante la etapa de temprana de campana (E16-E18) las células apoptóticas se localizan en el epitelio de la lámina dental, el epitelio externo del esmalte, el estrato intermedio, en el segundo nudo de esmalte y raras veces en el

mesénquima. Finalmente, en la etapa tardía de campana (Postnatal 0-Postnatal 7), las células apoptóticas persisten en el epitelio de la lámina dental, en el epitelio externo del esmalte, estrato intermedio, retículo estrellado y en el tejido óseo entre el epitelio bucal y el germen dental.^{64, 65, 66, 67}

Joseph y col. (1999) demostraron que alrededor del 50% de los ameloblastos mueren durante el proceso de odontogénesis. Aproximadamente la mitad de estas muertes ocurren durante la etapa de transición, es decir, entre la etapa secretoria y la etapa de maduración en su proceso de diferenciación.⁶⁸

Estudios inmunohistoquímicos de la apoptosis durante la odontogénesis han revelado que Bax y Bcl-2 se co-localizan en las etapas de secreción, transición y maduración de los ameloblastos. La inmunoactivación de Bax es elevada principalmente durante las etapas finales de secreción y transición, mientras que el Bcl-2 tenía una activación muy ligera. Durante la etapa temprana de maduración la activación de Bax disminuyó a comparación del Bcl-2, lo que sugiere que la apoptosis en la maduración temprana fue menor.⁶⁹

Por otra parte, está demostrado que a las células apoptóticas las eliminan los macrófagos, células vecinas y células que presentan molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II durante la odontogénesis y también durante el recambio celular de la pulpa dental.^{70,71} El análisis de la pulpa dental por medio del ensayo de TUNEL demostró que la densidad de marcaje aumenta de la zona apical hasta la zona incisal, demostrando la importancia de la apoptosis en el recambio celular normal de la pulpa dental.⁷²

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La exposición a fluoruros sistémicos se produce primariamente de manera natural, debido a su presencia en aguas de zonas geográficas aisladas. Actualmente la población recibe aguas y sales fluoradas artificialmente junto con la adición de una variedad de agentes tópicos y sistémicos, estos agentes aumentan la prevalencia y severidad de la fluorosis dental y posibilitan la presencia de otros efectos tóxicos.²⁹⁻³¹

La alta exposición a fluoruro en la población nos conduce a cuestionar sobre su seguridad, por lo que ya se ha comenzado a estudiar sus efectos tóxicos, genotóxicos, cancerígenos en modelos *in vitro* e *in vivo*. Estudios recientes *in vitro* señalan al fluoruro como un inductor de apoptosis.

Existen muy pocos estudios sobre la acción del fluoruro durante la odontogénesis, por lo que consideramos importante abordar este problema estudiando el efecto del fluoruro en la inducción de apoptosis.

5. JUSTIFICACIÓN

La amplia distribución y el elevado consumo de fluoruro traen como consecuencia un aumento en la prevalencia y severidad de fluorosis dental. A pesar de que este compuesto químico ha sido utilizado durante largos períodos para el consumo humano y que el germen dental es uno de los órganos blanco mas importantes, el efecto de fluoruro en la odontogénesis es un área poco investigada, por lo que continua siendo un campo muy amplio de investigación. Por otra parte se conoce que durante la odontogénesis se presentan un equilibrio entre ciertos mecanismos celulares para su correcto desarrollo por ejemplo la división celular y muerte celular (apoptosis).

Investigaciones previas en diversos órganos y tipos celulares han mostrado que el fluoruro de sodio es un inductor de apoptosis, por lo que consideramos importante determinar si este efecto ocurre durante la odontogénesis.

6. HIPÓTESIS

6.1 Hipótesis de investigación.

H₁. La administración *in vitro* de fluoruro de sodio a gérmenes dentales de murinos (ratones) neonatales, aumentará el proceso de apoptosis en células mesenquimatosas y del órgano del esmalte del primer molar inferior.

7. OBJETIVO

7.1 Objetivo general.

- Determinar la actividad inductora de apoptosis del fluoruro de sodio en células del órgano del esmalte y mesenquima durante la odontogénesis en modelo murino.

7.2 Objetivos específicos

- Determinar la concentración de fluoruro de sodio que tiene mayor efecto apoptótico en los órganos dentales de murinos de 1 día neonatal.
- Determinar qué tipo celular es más susceptible al efecto apoptótico del fluoruro de sodio en los órganos dentales de murinos de 1 día neonatal.

8. TIPO DE ESTUDIO

Experimental, prospectivo y longitudinal.

9. UNIVERSO O POBLACIÓN

Para el presente estudio se seleccionaron 32 gérmenes dentales del primer molar inferior de murinos obtenidos de 16 crías de 1 día neonatal. Se dividieron equitativamente en tres grupos; un grupo control y dos experimentales (1mM=19 ppm y 5mM=95 ppm).

10. MATERIALES Y METODOS

10.1 Materiales y equipo.

Microscopio estereoscópico (Nikon, PFX, Japón)

Tijeras para disección.

Pinzas para microdisección.

Campana de flujo laminar (Holten lamin Air, HH48)

Tubo Coster 10 ml (Corning, USA)

Cajas de petri estéril (Falcon, Cat. 3037, Lincon Park, New Jersey)

Caja para cultivo de 24 pozos (Falcon, Cat. 3047, Lincon Park, New Jersey)

Medio de cultivo BGJb (GIBCO, 12519-038)

Suero fetal bovino (GIBCO BRL, Cat. 16000-036)

Antibiótico-antimicótico (Penicilina Sodica G10,000 unidades/mL, Sulfato de estreptomicina 10,000 µg/mL y 25 µg/mL amfotericina B, GIBCO, Cat. 15240-096).

Solución salina balanceada de Hanks (GIBCO, 24020-125)

Micropipetas (500µl, Pipetman y 0.1-2.5, Eppendorf)

Fluoruro de sodio (T. J. Baker Cat. 3688)

Incubadora (Fisher Scientific, CO2 Incubator)

Tubo eppendorf de 400µl (Cat. 2236390-5, Westbury, NY, USA)

Paraformaldehído al 4% pH 7.23

EDTA al 10% pH 8

PBS (Solución de fosfatos buffer) pH 7.4

Histoquinette (Jung Histokinette 2000, leica, Alemania)

Paraplast Plus Tissue Embedding Médium (Cat. 8889-502004, Oxford, St. Louis USA).

Portaobjetos silanizados (Biocare Medical, HIER Slide, Ref. SFH1103)

Kit para la detección de apoptosis (Dead End TM Fluorometric TUNEL System, Promega, Cat. G3250)

Vectashield Mounting Medium for fluorescence (Vector laboratories, Inc. Burlingame, CA).

Microscopio Olympus BX 40 (Japón)

Microscopio de fluorescencia Axiophote (Zeiss)

10.2 Método.

Se utilizaron 16 crías de murinos Balb/c de 1 día neonatal y se tomó peso y talla. Se transportaron a la campana de flujo laminar en condiciones de esterilidad.

Las crías neonatales se colocaron bajo el microscopio estereoscópico (NIKON, PFX), para observar si existían alteraciones clínicas. Las crías se decapitaron para posteriormente separar la mandíbula, la que se dividió en hemimandíbulas para obtener el germen dental, se colocaron 15 minutos en solución de Hanks hasta el momento de ser cultivadas.

Se colocó 9 ml de BGJb suplementado con suero fetal bovino al 10% con 20 μ L de antibiótico (Penicilina Sodica G 10,000 unidades/mL, Sulfato de Estreptomicina 10,000 μ g/mL y 25 μ g/mL de anfotericina B) en un tubo Coster de 10 ml, manteniendo la solución en agitación constante.

Para este estudio se utilizaron concentraciones de fluoruro de sodio de 1 y 5 mM de fluoruro de sodio en los grupos experimentales y el grupo control se incubó con agua desionizada esteril. Se incubaron durante 3 días a 37°C (Jeng 1998 y Chang 2001).

Para el cultivo de gérmenes dentales se utilizaron cajas de cultivo de 24 pozos. Se adicionó 500 μ l de medio de cultivo a cada pozo y fluoruro de sodio a partir de una solución stock de 1M. A los grupos experimentales se les agregó una solución 1 mM (0.5 μ l) y 5 mM (2.5 μ l) y al grupo control 1 μ l de agua desionizada estéril. Se colocó un filtro de 0.1 μ m en cada pozo y se tomó la hemimandíbula con pinzas de microdissección y se depositó en el filtro orientando al germen dental hacia al centro, cuidando que la porción lateral externa de la hemimandíbula quedara en contacto con el filtro. Se incubó a 37° C (Fisher Scientific, CO2 Incubator). Se realizó cambio de medio de cultivo en la campana de flujo laminar durante los tres días de cultivo.

Los especímenes fueron transportados a tubos eppendorf que contenían 400 μ l paraformaldehído al 4% pH 7.23. Se fijaron durante 24 horas a 4°C, se lavaron con agua corriente durante 2 horas, se descalcificaron en EDTA al 10% pH 8 durante 10 días. Se

colocaron en el Histoquinette para después ser embebidos en parafina. Se realizaron cortes seriados longitudinales de 4µm de grosor. Los cortes se colocaron en portaobjetos recubiertos con silano y se tiñeron con Hematoxilina-eosina (H-E) para el análisis microscópico de los grupos experimentales y control.

10.2.1 Técnica de TUNEL

Para realizar la técnica de TUNEL se siguieron las instrucciones recomendadas por el fabricante (Dead End TM Fluorometric TUNEL System, Promega). Las laminillas se desparafinaron con dos baños de xilol fresco cada uno por 5 minutos, se sumergieron en etanol al 100% por 5 minutos y se rehidrataron en alcohol al 95%, 85%, 70% y 50% durante 3 minutos en cada uno. Se lavaron las laminillas con PBS al 0.1M pH 7.4 por 5 minutos y se fijaron con paraformaldehído al 4% pH 7.23 por 15 minutos a temperatura ambiente.

Se lavaron las laminillas con PBS por 5 minutos y se cubrieron los cortes con Proteinasa K (20µg/mL) por 10 minutos y nuevamente se lavaron con PBS por 5 minutos. Se le colocaron 100µL de buffer de equilibrio por 5 minutos, se decantó el líquido. A partir de este momento se trabajó en condiciones de oscuridad. Se agregó amortiguador TdT de incubación (buffer de equilibrio 45µl + mezcla de nucleótido 5µl + 1µl enzima TdT), se colocó un cubreobjetos plásticos para distribuir el buffer y se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Posteriormente se retiró el cubreobjetos plástico y las laminillas se sumergieron en 40 ml de solución 20X SSC a una dilución 1:10, se lavaron con PBS por 5 minutos, se tiñeron sumergiéndolas en 40 ml de yoduro de propidio (1µL/ml) por 15 minutos y se lavaron 3 veces con agua desionizada a temperatura ambiente, se eliminó el excedente de agua, procurando dejar la mínima cantidad posible, posteriormente se agregaron 25µl de Vectashield, se colocaron los cubreobjetos los que se sellaron con barniz para uñas. Las laminillas se analizaron en un microscopio de fluorescencia (Axiophot, Zeis) y se almacenaron a 4 °C en la oscuridad.

11. RECURSOS

11.1 Humanos

Director

Asesor en metodología de investigación

Asesor en interpretación histológica

Asesor en interpretación de la técnica TUNEL

11.2 Físicos

Estos recursos se encuentran disponibles en el Laboratorio de Inmunología y Bioterio de la División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología, UNAM.

12. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Ratones hembras sanas vírgenes de la cepa Balb/c de 21- 23 g de peso promedio al inicio del experimento.
- Ratones hembras que cuenten con 8 a 20 semanas de vida.
- Ratones crías de ambos géneros de 1 día neonatal que no presenten anomalías morfológicas.

13. CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

- Ratones hembras que enfermen durante el experimento.
- Hemimandíbulas y gérmenes dentales molares lesionados durante el proceso de disección.

14. VARIABLE INDEPENDIENTE

Inducción de apoptosis en el germen dental murino.

15. VARIABLE DEPENDIENTE

Concentraciones de 1mM (19 ppm) y 5 mM (95ppm) de fluoruro de sodio en el medio de cultivo.

16. ANALISIS ESTADÍSTICO DE DATOS.

Se calcularon medidas de tendencia central y ANOVA usando el programa SigmaStat 3.1.

17. RESULTADOS

17.1 PESO Y TALLA

El peso y la talla promedio obtenidos de las crías de 1 día neonatal fueron de 1.94 gramos y 2.875 cm respectivamente; además se obtuvieron las medidas máximas, mínimas, desviación estándar y varianza de cada uno. (Cuadro 1)

	Peso (g)	Talla (cm)
Promedio	1.94	2.875
Máximo	2.57	3.2
Mínimo	1.24	2.4
Desv Estan	0.52568323	0.33273756
VAR	0.27634286	0.11071429

Cuadro 1. Descripción.

17.2 RESULTADOS HISTOLÓGICOS

El germen dental del primer molar inferior del grupo control presentó las características propias desarrollo normal propio de la etapa de campana tardía, con mineralización ósea entre el epitelio bucal y el del órgano del esmalte (Fig. 1A). Los diferentes tipos celulares del órgano del esmalte se encontraron visibles, además de tener una clara delimitación de las cúspides y la presencia de predentina (Figs. 1 B y C).

En el germen dental del primer molar inferior del grupo experimental cultivado con fluoruro de sodio a 1mM no se observó organización de las células del retículo estrellado y estrato intermedio, además se observó separación de los ameloblastos y odontoblastos de la matriz dentinaria no mineralizada de las cúspides (Fig. 1D); también se apreció mayor cantidad de matriz dentinaria que con el grupo control (Figs. 1E y F). En el grupo experimental cultivado con fluoruro de sodio a 5mM se presentó un grado mayor de desorganización en la región del retículo estrellado, estrato intermedio, ameloblastos y odontoblastos (Fig. 1G), además de la separación de los ameloblastos y odontoblastos de la matriz dentinaria no mineralizada secretada (Figs. 1H y I).

17.3 TÉCNICA DE TUNEL

En el germen dental del grupo control, se observaron escasas células apoptóticas en el estrato intermedio, retículo estrellado y ameloblastos (Fig. 2A, B, C). En el grupo experimental incubado con fluoruro de sodio a 1mM, se observó en el germen aumento de células apoptóticas, principalmente en la región del estrato intermedio, retículo estrellado y ameloblastos (Fig. 2D, E, F). En el grupo experimental incubado con fluoruro de sodio a 5mM, se observaron células apoptóticas en la región del estrato intermedio, retículo estrellado, incrementándose células apoptóticas en los ameloblastos, además de leve presencia de células apoptóticas en el mesenquima de la papila dental. (Fig. 2G, H, I). En ambos grupos experimentales se observó un depósito amorfo y grandes espacios indicando pérdida celular.

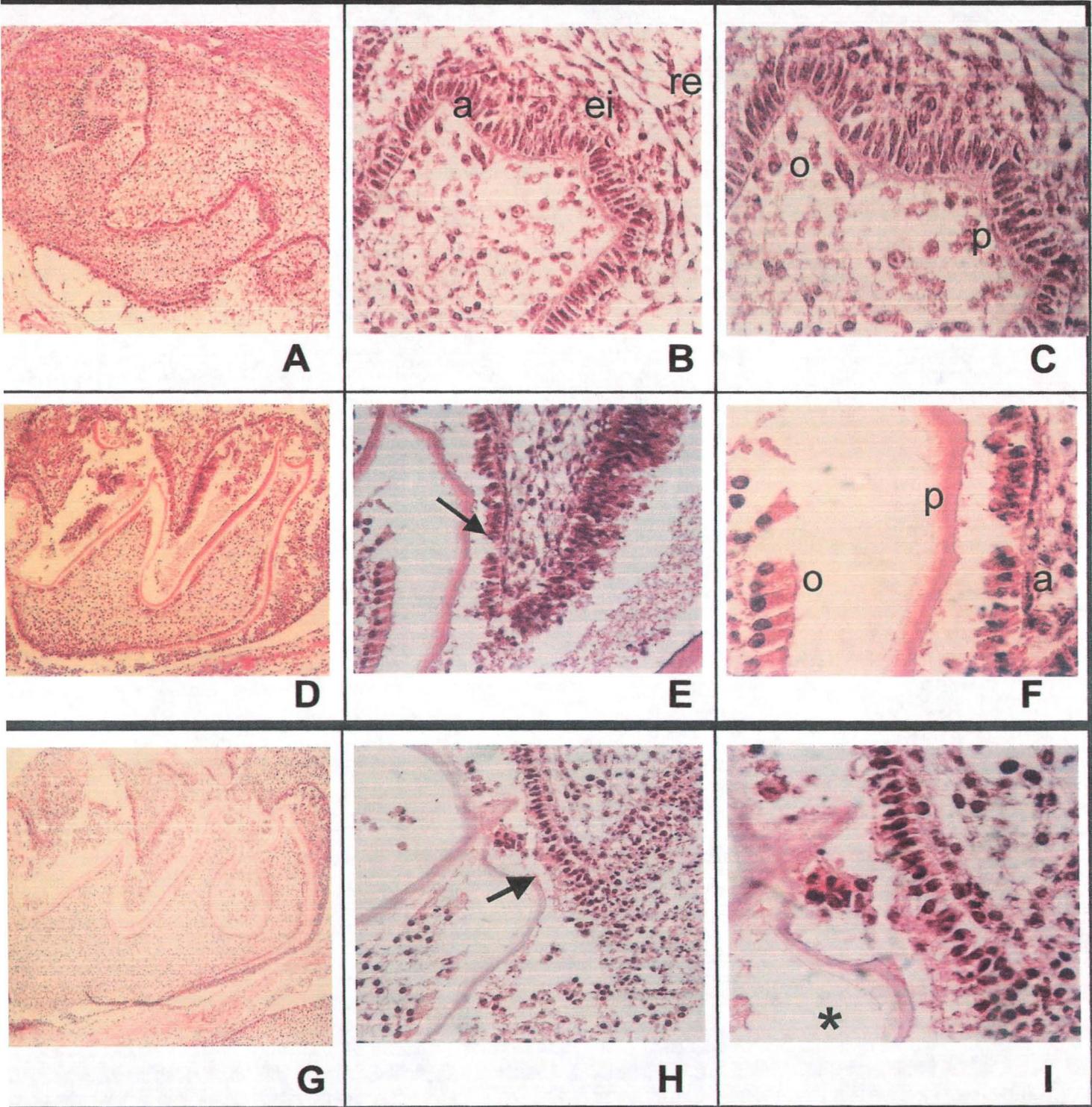


Fig. 1. Germen dental del primer molar inferior teñido con H-E. (A) Observamos la morfología propia del molar en una etapa tardía de campana. (B) Cúspide distal se observa el estrato intermedio (ei), etículo estrellado (re) y ameloblastos (a). (C) Observamos presencia de predentina (p) y algunos odontoblastos en empalizada (o). (D) Grupo experimental 1mM, se observa la desorganización en la morfología del germen dental. (E) Se observa la pérdida en el delimitado de la cúspide por parte de los ameloblastos (flecha). (F) Mayor depósito de predentina, con separación de los odontoblastos y ameloblastos de esta. (G) Grupo experimental 5mM presenta la misma desorganización en la morfología del germen dental. (H) Pérdida del delimitado celular de la cúspide (flecha). (I) Ausencia de odontoblastos (*). A, D, G 10X, B, E, H 40X, C, F, I 100X.

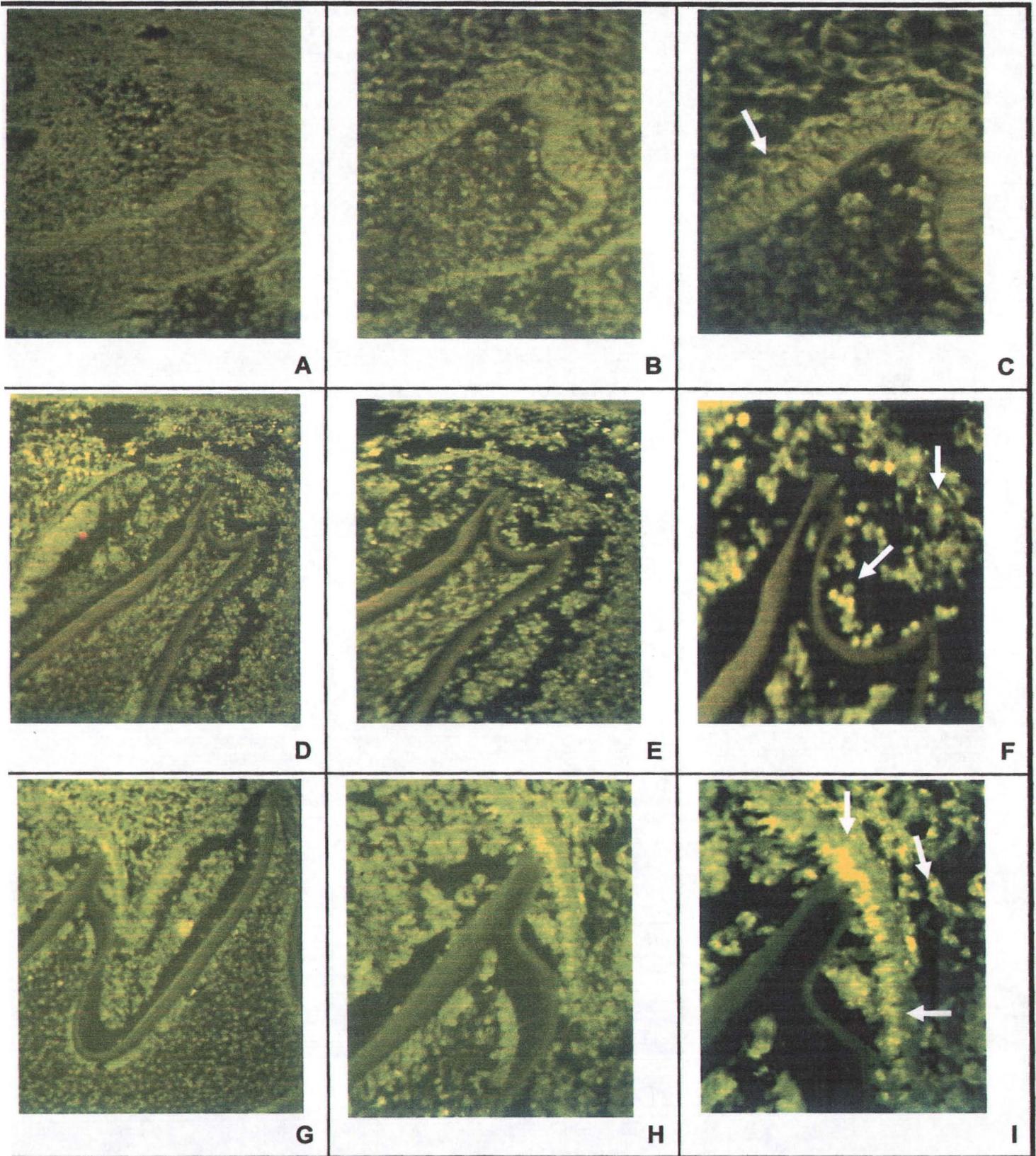


Fig. 2. Técnica de TUNEL. (A) Primer molar inferior grupo control. (B) Cuspide distal. (C) Leve marcaje positivo en ameloblastos (flecha). (D) Primer molar inferior grupo experimental 1mM. (E) Cuspide distal. (F) Incremento en el marcaje positivo (flechas). (G) Primer molar inferior grupo experimental 5mM. (H) Cuspide central. (I) Incremento en el marcaje positivo a TUNEL en ameloblastos (Flechas). A, D, G 20X, E, H 40X, C, F, I 60X.

18. DISCUSIÓN.

El fluoruro está reconocido como un agente anticariogénico efectivo y su aplicación local y sistémica ha sido recomendada ampliamente durante décadas pasadas. No obstante, recientemente se han estudiado los efectos tóxicos del fluoruro, como son la fluorosis dental y esquelética.⁷² También se ha reportado el efecto tóxico del fluoruro sobre riñones de diferentes especies después de su aplicación en dosis únicas o dosis prolongadas.^{73, 74, 75} El fluoruro afecta funciones celulares y la actividad enzimática, altera la función de neutrófilos e inhibe la actividad de fosfatasas y coesterinasas.^{76, 77, 78, 79} Se ha reconocido que el fluoruro produce aberraciones cromosómicas y mutaciones en genes de células de mamíferos.⁸⁰ Por lo antes expuesto consideramos que existe un amplio campo de exploración sobre los efectos tóxicos del fluoruro. Por otra parte también se han realizado investigaciones en el germen dental, demostrando que el fluoruro puede alterar la morfología intracelular de ameloblastos y odontoblastos.^{81,82,83}

Los hallazgos histológicos obtenidos de este estudio *in vitro*, mostraron que los primeros molares inferiores de ratón expuestos a fluoruro de sodio fueron sensibles ante este compuesto. Las concentraciones utilizadas fueron capaces de inducir cambios histológicos después de 3 días de cultivo. Se demuestra que concentraciones de 1 mM son capaces de afectar el desarrollo del germen dental directamente, producido por el exceso del mismo lo cual fue previamente probado por Bronckers (1984) obteniendo resultados similares.⁸⁴ De igual forma, nuestro hallazgo en la desorganización presentada tanto en los ameloblastos, células del retículo estrellado, estrato intermedio y odontoblastos, debida a concentraciones iguales o superiores a 1mM de fluoruro; no son impedimento para la presencia de matriz de dentina, lo cual coincide con un estudio realizado previamente.⁸⁵ Esta desorganización puede ser debida a alteraciones en la síntesis de proteínas, pues ya es conocido que el fluoruro puede afectar la síntesis de proteínas en los ameloblastos en etapa secretoria, debido a su afección en el transporte intracelular a través de las proteínas G.^{86,87,87} De manera general, se conoce que alteraciones en la síntesis de proteínas trae otras anomalías tales como afección en la replicación y transcripción del ADN, lo que puede propiciar una muerte celular.^{24, 88}

La apoptosis puede ser producida por diversos agentes: químicos, físicos y biológicos. El fluoruro, que se cataloga como un inductor químico, produce apoptosis en diversos órganos y tipos celulares.^{89, 86} Uno de estos órganos es el cerebro, que cuenta con un mismo origen germinativo que el germen dental (ectodermo), se demostró que ante la exposición al fluoruro desarrollaba apoptosis.⁹⁰ En las neuronas apoptóticas, investigadores determinaron cual es la principal vía de señalización, demostrando que la mitocondria es la vía por la cuál el fluoruro induce la apoptosis. Otros autores han demostrado que el fluoruro provoca incremento en la cantidad de radicales libres, lo que desencadena un estrés oxidativo. El estrés oxidativo afecta principalmente el potencial de membrana mitocondrial, provocando la liberación del citocromo c del espacio intermembranal, y de esta manera provoca apoptosis.^{37, 91} Investigaciones realizadas en ameloblastos han demostrado que el fluoruro puede inhibir su proliferación e inducir apoptosis, resultando en un disfunción de secreción y absorción de las proteínas de la matriz del esmalte.⁹²

Se han establecido en los años recientes diversos métodos para la detección de apoptosis a través del marcaje *in situ*.^{93, 94, 95} Se ha usado el método TUNEL en pocos estudios de la odontogénesis.^{64, 66, 67, 68, 69} Estas investigaciones han demostrado la existencia de apoptosis en ciertas regiones del germen dental a determinado tiempo en condiciones normales, mostrando que la presencia de células positivas al marcaje de TUNEL se encuentra en la lámina dental, epitelio externo del esmalte, folículo dental y en algunos ameloblastos. Los resultados de este estudio demuestran que el fluoruro puede incrementar la apoptosis en la región del epitelio del esmalte interno y externo, además de provocarla en la región de la papila dental, región en la que normalmente no se presenta marcaje positivo a TUNEL, mostrando una relación existente entre la cantidad de dosis expuesta y la expresión positiva a TUNEL detectada, confirmando de esta manera investigaciones previas (Wang, 2004).⁹⁶ No obstante, el fácil manejo del método TUNEL cuenta con dos características negativas: la primera, que es seguro totalmente solo en un 99%, debido a que pueden producirse falsos-positivos, pues la necrosis en sus últimas fases también muestra ruptura del ADN.⁹⁷ La segunda es que al aplicarlo en muestras sobre portaobjetos se impide obtener una cuantificación. La técnica recomendada con fines cuantificativos es la citometría fluida; sin embargo esta técnica no ha sido aplicada en el caso del germen dental.⁹⁸

Bajo las condiciones experimentales se observaron zonas con morfología propia de necrosis, además de presentar materia amorfa no identificable en espacios donde no hubo presencia de células. Esto hace pensar que ese material puede ser restos celulares no fagocitados; estos hallazgos son similares a los descritos en un estudio previo donde se probó que el fluoruro es capaz de inducir cambios celulares.⁹⁹

19. CONCLUSIONES

En nuestro estudio se pudo comprobar que la técnica de TUNEL para la detección de apoptosis es un método fácil y rápido, lo cual favorece la aplicación a un mayor número de especímenes para poder corroborar la información obtenida. Bajo las condiciones experimentales de este estudio, el fluoruro provoca alteraciones en la formación del órgano dental y los efectos de daño celular provocados con el flúor están en relación directa con la concentración utilizada. Sin embargo a diferencia de otros investigadores en este estudio, encontramos evidencia de apoptosis en odontoblastos y células de la papila dental en nuestro grupo control sin tratamiento, por lo que propone realizar un estudio utilizando diferentes tiempos en el cultivo de gérmenes dentales con una amplio rango en la concentraciones que se planean utilizar y realizar un comparativo utilizando un modelo *in vivo* donde se investiguen cronológicamente el efecto del fluoruro en la apoptosis de cada una de las diferentes etapas de la odontogénesis.

Se reconoce el efecto del flúor como un agente anticariogénico. Las diferentes medidas aplicadas desde su descubrimiento, como por ejemplo la fluoración del agua y la sal, han traído beneficios tangibles con respecto a prevención en salud dental. Su gran capacidad de difusión lo ha convertido en un éxito, por el hecho de poder abarcar tanto grandes ciudades como pequeños poblados y estar disponible para la mayor parte de las clases sociales. No obstante, esta misma gran difusión se convierte en un arma de dos filos cuando varios elementos convergen en un mismo punto, es decir, no sólo se cuenta con las fuentes antes mencionadas, sino además con suplementos dentales; esto provoca una sobrexposición a este agente. Reportes recientes de fluorosis dental cada vez se hacen mas frecuentes y esto es un indicador de lo que está sucediendo. No obstante, el desarrollo de una controversia sobre el conocimiento del fluoruro en la totalidad de sus campos y modos de acción, tanto

Bajo las condiciones experimentales se observaron zonas con morfología propia de necrosis, además de presentar materia amorfa no identificable en espacios donde no hubo presencia de células. Esto hace pensar que ese material puede ser restos celulares no fagocitados; estos hallazgos son similares a los descritos en un estudio previo donde se probó que el fluoruro es capaz de inducir cambios celulares.⁹⁹

19. CONCLUSIONES

En nuestro estudio se pudo comprobar que la técnica de TUNEL para la detección de apoptosis es un método fácil y rápido, lo cual favorece la aplicación a un mayor número de especímenes para poder corroborar la información obtenida. Bajo las condiciones experimentales de este estudio, el fluoruro provoca alteraciones en la formación del órgano dental y los efectos de daño celular provocados con el flúor están en relación directa con la concentración utilizada. Sin embargo a diferencia de otros investigadores en este estudio, encontramos evidencia de apoptosis en odontoblastos y células de la papila dental en nuestro grupo control sin tratamiento, por lo que propone realizar un estudio utilizando diferentes tiempos en el cultivo de gérmenes dentales con una amplio rango en la concentraciones que se planean utilizar y realizar un comparativo utilizando un modelo *in vivo* donde se investiguen cronológicamente el efecto del fluoruro en la apoptosis de cada una de las diferentes etapas de la odontogénesis.

Se reconoce el efecto del flúor como un agente anticariogénico. Las diferentes medidas aplicadas desde su descubrimiento, como por ejemplo la fluoración del agua y la sal, han traído beneficios tangibles con respecto a prevención en salud dental. Su gran capacidad de difusión lo ha convertido en un éxito, por el hecho de poder abarcar tanto grandes ciudades como pequeños poblados y estar disponible para la mayor parte de las clases sociales. No obstante, esta misma gran difusión se convierte en un arma de dos filos cuando varios elementos convergen en un mismo punto, es decir, no sólo se cuenta con las fuentes antes mencionadas, sino además con suplementos dentales; esto provoca una sobreexposición a este agente. Reportes recientes de fluorosis dental cada vez se hacen mas frecuentes y esto es un indicador de lo que está sucediendo. No obstante, el desarrollo de una controversia sobre el conocimiento del fluoruro en la totalidad de sus campos y modos de acción, tanto

benéficos como tóxicos, ha provocado que los investigadores aborden diversas líneas de estudio del tema, demostrando que esta controversia no es del todo negativa, probando que este campo aún continúa siendo un área con grandes posibilidades de crecimiento y esclarecimiento. La investigación de la apoptosis inducida por el flúor en diversos órganos es un ejemplo, un tema que comienza a crecer. Por la larga historia en el uso de fluoruros en el ámbito odontológico, se demuestra la importancia de la investigación en este tema. Esto podría aclarar muchas preguntas y en el camino formular nuevas lo que implica la elaboración de más y diversa investigación para cumplir los objetivos.

20. BIBLIOGRAFÍA

- 1 Daintith J. A dictionary of Chemistry, Third Ed Oxford University Press ed: 1996.
- 2 Whitford GM. The physiological and toxicological characteristics of fluoride. J Dent Res (1990) 69 (Spec Iss): 539-549.
- 3 Whitford GM. Intake and metabolism of fluoride, Adv Dent Res (1994) 1: 5-14.
- 4 FDI Dental World, Declaración de principios sobre fluoruros y fluoración para la prevención de caries, (1993).
- 5 MCDonagh MS, Whiting PF, Wilson PM, Sutton AJ, Chestnutt I, Cooper J, Misso K, Bradley M, Treasure E, Kleijnen J. Systematic review of water fluoridation, BMJ (2000): 321.
- 6 Pratten J, Bedi R, Wilson M. An *In Vitro* study of the effect of fluoridated milk on oral bacterial Biofilms. Applied and environmental microbiology, BMJ (2000) pp 1720-1723.
- 7 De la Cruz CD, Camacho GE, Castillo GL, Cervantes A, Sánchez BC. Resistencia al ataque ácido en esmalte dental humano antes y después de la aplicación tópica de tres agentes fluorurados, Revista ADM (2001) 58: 31-5.
- 8 Widmer RP, Cameron AC. Handbook of pediatric dentistry (2003) second edition, Edit. Mosby.
- 9 Featherstone JDB. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. Community Dent Oral Epidemiol (1999) 27: 31-40.
- 10 Van Loveren C. The antimicrobial action of fluoride and its role in caries inhibition, J Dent Res (1990) 69 (Spec Iss): 676-81.
- 11 O'Mullane DM. Introduction and rationale for the use of fluoride for caries prevention. International Dental Journal (1994) Vol. 44 No. 3 (Supplement 1).
- 12 Duckworth RM, Morgan SN. Oral fluoride retention after of fluoride dentifrices, Caries Res (1991) 25: 123-9.
- 13 Jacobson APM, Stephen KW, Strang R. Fluoride uptake and clearance from the buccal mucosa following mouthrinsing. Caries Res (1992) 26: 56-8.
- 14 Boink ABTJ, Wemer J, Meulenbelt J, Vaessen HAMG Wildt DJ. The mechanism of fluoride-induced hypocalcaemia Human and experimental toxicology (1994) 13: 149-155.

-
- 15 Appleton J. Changes in the plasma electrolytes and metabolites of the rat following acute exposure to sodium fluoride and strontium chloride, *Arch Oral Biol* (1995) Vol. 40 (4): 265-268.
- 16 Heard K, Hill R, Cairns C, Dart RC. Calcium neutralizes fluoride bioavailability in a lethal model of fluoride poisoning, *Clinical Toxicology*, (2001) 39 (4): 349-353.
- 17 Dote T, Kono K, Usuda K, Nishiura H, Tagawa T, Miyata K, Shimahara M, Hashiguchi N, Senda J, Tanaka Y. Toxicokinetic of intravenous fluoride in rats with renal damage caused by high-dose fluoride exposure, *Int Arch Occup Environ Health* (2000) 73 (suppl): S90-2.
- 18 Kumar A, Susheela K. Effects of chronic fluoride toxicity on the morphology of ductus epididymis and maturation of spermatozoa of rabbit, *Int J Exp Path* (1995) 76: 1-11.
- 19 Yamamoto S, Katagiri K, Ando M. Suppression of pulmonary antibacterial defenses mechanisms and lung damage in mice exposed to fluoride aerosol. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* (2001) 62: 485-94.
- 20 Wang YN, Xiao KQ, Liu JL, Dallner G, Guan ZZ. Effect of long term fluoride exposure on lipid composition in rat liver, *Toxicology* (2000) 146: 161-9.
- 21 Mihashi M, Tsutsui T. Clastogenic activity of sodium fluoride to rat vertebral body-derived cell in culture, *Mutation Research* (1996) 368: 7-13.
- 22 Aardema MJ, Gibson DP, LeBoeuf A. Sodium fluoride-induced chromosome aberrations in different stages of the cell cycle: a proposed mechanism, *Mutation Research* (1989) 223: 191-203.
- 23 Hayashi N, Tsutsui T. Cell cycle dependence of cytotoxicity and clastogenicity induced by treatment of synchronized human diploid fibroblasts with sodium fluoride, *Mutation Research* (1993) 290: 293-302.
- 24 Jeng JH, Hsieh CC, Chang MC, Lin SK, Hahn LJ, Kuo MYP. Cytotoxicity of sodium fluoride on human oral mucosal fibroblasts and its mechanisms, *Cell Biol and Toxicology* (1998) 14: 383-9.
- 25 Chang YC, Chou MY. Cytotoxicity of fluoride on human pulp cell cultures in vitro, *Oral Surg oral Med Oral Pathol Radiol Endod* (2001) 91:230-4.

-
- 26 Cittanova ML, Lelongt B, Verpont MC, Geniteau ML, Wahbe F, Prie D, Coriat P, Ronco PM. Fluoride ion toxicity in human kidney collecting duct cells, *Anesthesiology* (1996) 84: 428-35.
- 27 Moseley R, Sloan AJ, Waddington RJ, Smith AJ, Hall RC, Embery G. The influence of fluoride on the cellular morphology and synthetic activity of the rat dentine-pulp complex in vitro, *Arch of Oral Biology* (2003) 48: 39-46.
- 28 Fejerskov O, Manji F, Baelum V. The nature and mechanism of dental fluorosis in man, *J Dent Res* (1990) 69 (Spec Iss): 629-700.
- 29 Sesikeram B, Krishnamurthy D, Harinarayana RS, Ramachandran EP, Raja RD. Studies on skeletal muscle biopsies in endemic skeletal fluorosis, *Neurology India* (2000) 48:187-8.
- 30 Den Besten PK. Biological mechanisms of dental fluorosis relevant to use of fluoride supplements. *Community Dentistry and Oral Epidemiology* (1999) 27: 41-7.
- 31 NUTRITION REVIEW, (1976) Vol. 34, No. 10.
- 32 Veron MH, Couble ML. The biological effects of fluoride on tooth development: possible use of cell culture systems, *International Dental Journal*, (1992) 42:108-12.
- 33 Robinson C, Connell S, Kirkham J, Brookes SJ, Shore RC, Smith AM. The effect of fluoride on the developing tooth *Caries Res* (2004) 38: 268-76.
- 34 Smid JR, Monsour PA, Harbrow DJ, Young WG. A histochemical study of effects of high doses of sodium fluoride on dipeptidyl peptidase II activity in the rat incisor ameloblast, *Arch Oral Biol* (1990) Vol. 35 (8): 671-5.
- 35 Milan AM, Waddington RJ, Embery G. Fluoride alters casein kinase II and alkaline phosphatase activity in vitro with potential implications for dentine mineralization, *Archives of oral biology* (2001) 46: 343-51.
- 36 Den Besten PK. Effects of fluoride on protein secretion and removal during Enamel development in rat, *J Dent Res* (1986) 65 (10): 1272-7.
- 37 Anuradha CD, Kanno S, Hirano S. Oxidative damage to mitochondria is a preliminary step to caspase-3 activation in fluoride-induced apoptosis in HL-60 cells, *Free Radical Biology & Medicine* (2001) Vol. 31, (3): 367-73.
- 38 Traen EV, Refsnes M, Thoresen GH, Låg M, Schwarze PE. Fluoride-Induced apoptosis in epithelial lung cell involves activation of MAP kinases p38 and possibly JNK, *Toxicological Sciences* (2001) 61: 83-91.

-
- 39 Lockshin RA, Osborne B, Zakeri Z. Cell death in the third millennium. *Cell Death Diff* (2000) 7: 2-7.
- 40 Kerr JF. Apoptosis: a basic biological phenomenon form with wide-ranging implication in tissue kinetic, *Br J Cancer* (1972); 26: 239.
- 41 Alfaro ME, García C, Dueñas A. Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones, *Revista del Instituto Nacional de Cancerología* (2000) Vol 46 (4).
- 42 Ping S, Choi D. Ions Cell volume and apoptosis, *PNAS* (2000) Vol. 97 (17).
- 43 Ping S, Canzoneiro L, Choi D. Ion homeostasis and apoptosis, *Current Opinion in Cell Biology*, 2001, 13: 405-11.
- 44 Ávila-Casado MC. Apoptosis y Riñón, *Rev Fac Med UNAM* (2000) Vol. 43 (1): 12-5.
- 45 Sanchez-Socorrás V. Mecanismos reguladores de la muerte celular no necrótica, *Rev Cubana Invest Biomed* (2001) 20(4): 266-74.
- 46 Renehan AG. What is apoptosis, and why is it important?, *BMJ* (2001) Vol. 322: 1536-8.
- 47 Ortega-Carrillo C. La apoptosis y su importancia biomédica, *Gac Med Méx* (2001) Vol. 137, (6).
- 48 Ashhenazi A, Dittis V. Death receptors: signaling and modulation, *Science* (1998) Vol. 281.
- 49 Reap E, Roof K, Maynor K, Borrero M, Booker J. Radiation and stress-induced apoptosis: A role for Fas/Fas ligand interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1997) Vol. 94.
- 50 Thornberry N, Lazebnik Y. Caspases: Enemies within. *Science* (1998) Vol.281: 1312-1316.
- 51 Green-Douglas R, Reed John C. Mitochondria and apoptosis, *Science* (1998) Vol. 281: 1309-1312.
- 52 Holly TA, Drincic A, Byun Y, Nakamura S, Harris K, Klocke FL, Cryns VL. Caspase inhibition reduces myocyte cell death induced by myocardial ischemia and reperfusion *In Vivo*, *J Mol Cell Cardiol* (1999) 31: 1709-1715.
- 53 Tittle JN, Steller H. A Comparison of programmed cell death between species, *Genome Biology* (2000) 1 (3): reviews 0003.1-0003.6.

-
- 54 Arango-Prado MC, Llanes-Fernandez L, Diaz-Roman T, Faxas-Garcia ME. La apoptosis: sus características y su papel en la transformación maligna de la célula, *Rev Cubana Oncol* (1997) 13 (2): 126-134.
- 55 Lindenboim L, Haviv R, Stein R. Bcl-Xl inhibits different apoptotic pathways in rat PC12 cells, *Neuroscience* (1998) 253: 37-40.
- 56 Gleichmann M, Weller M, Schulz JB. Insulin-like growth factor-1-mediated protection from neuronal apoptosis is linked to phosphorylation of the pro-apoptotic protein BAD but not to inhibition of cytochrome c translocation in rat cerebellar neurons. *Neuroscience Letters* (2000) 282: 69-72.
- 57 Tan J, Town T, Placzek A, Kundtz A, Yu H, Mullan M. Bcl-Xl inhibits apoptosis and necrosis produced by Alzheimer's β -amyloid₁₋₄₀ in PC12 cells, *Neuroscience* (1998) 272: 5-8.
- 58 Lotem J, Peled-Kamar M, Groner Y, Sachs L. Cellular oxidative stress and control of apoptosis by wild-type p53, cytotoxic compounds, and cytokines, *Proc Natl Acad Sci USA* (1996) Vol. 93: 9166-9171.
- 59 Bedi A, Mookerjee B. Biological significance and molecular mechanisms of p53-induced apoptosis, *Apoptosis* (1998) 3: 237-244.
- 60 Honig LS, Rosenberg RN. Apoptosis and Neurologic disease, *The American journal of medicine* (2000) Vol. 108: 317-330.
- 61 Pulkkanen KJ, Laukkanen MO Naarala J, Yla-Herttuala S. False-positive signal in mouse kidney and liver detected with TUNEL assay, *Apoptosis* (2000) 5: 329-333.
- 62 Sasaki C, Sato T, Kozawa Y. Apoptosis in regressive deciduous tooth germs of *Suncus murinus* evaluated by the the TUNEL method and electron microscopy. *Archives of Oral Biology* (2001) 46: 649-660.
- 63 Jervall J, Åberg T, Kettunen P, Keränen, Thesleff I. The life history of an embryonic signaling center: BMP-4 induces p21 and is associated with apoptosis in the mouse tooth enamel knot, *Development* (1996) 125: 161-169.
- 64 Vaahtokari A, Åberg T, Thesleff I. Apoptosis in the developing tooth: association with an embryonic signaling center and suppression by EGF and FGF-4, *Development* (1996) 122: 121-129.

-
- 65 Matalova E, Tucker AS, Sharpe PT. Death in the life of a tooth, *J Den Res* (2004) 1: 11-6.
- 66 Kaneko H, Ogiuchi H, Shimono M. Cell death during tooth eruption in the rat: surrounding tissues of the crown, *Anat Embryol* (1997) 195: 427-434.
- 67 Kaneko H, Hashimoto S, Enokiya Y, Ogiuchi H, Shimono M. Cell proliferation and death of Hertwing's epithelial root sheath in rat. *Cell Tissue* (1999) 298: 95-103.
- 68 Joseph BK, Harbrow DJ, Sugerman PB, Smid JR, Savage NW, Young WG. Ameloblasts apoptosis and IGF-1 receptor expression in the continuously erupting rat incisor model, *Apoptosis* (1999) 4: 441-447.
- 69 Kondo S, Tamura Y, Bawden JW, Tanase S. The immunohistochemical localization of Bax and Bcl-2 and their relation to apoptosis during amelogenesis in developing rat molars. *Arch Oral Biol* (2001) 46: 557-568.
- 70 Nishikawa S, Sasaki F. Apoptosis of dental pulp cells and their elimination by macrophages and MCH class II-expressing dendritic cells, *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* (1999) Vol. 47 (3): 303-11.
- 71 Baratella L, Arana-Chavez VE, Katchburian E. Macrophages and apoptosis in the stellate reticulum of rat enamel organ, *J Anat* (2000) 197; 303-6.
- 72 Liang CK, Sun SZ, Ji RD, Cao SR. A dose-response relationship between population's total intake fluoride and fluorosis in burning coal fluorosis in China. *Proceeding of the XXth conference of the international society for fluoride research. ISFR* (1994), 5-9 September 1994. Beijing China, pp 84-5.
- 73 Kessabi M. Acute toxicity of sodium fluoride in the rat. *Toxicol Lett* (1980) 5: 169-174
- 74 Rush FG, Willis LR. Renal tubular effects of sodium fluoride. *J Pharmacol Exp Ther* (1982) 223: 275-9.
- 75 Bond AM, Murray MM. Kidney function and structure in chronic fluorosis *Br J Exp Pathol* (1952) 33: 168-76.
- 76 English D, Taylor G, Garcia JGN. Diacylglycerol generation in fluoride-treated neutrophils: involvement of phospholipase D. *Blood* (1991) 77: 2746-56.
- 77 Niessen HWM. Fluoride prevents degranulations of the azurophilic and specific granules in electropermeabilized neutrophils, *J Leukoc Biol* (1994) 55: 489-95.

-
- 78 Leis JF, Kaplan NO. An acid phosphatase in the plasma membranes of human astrocytoma showing marked specificity toward phosphotyrosine protein. *Proc Natl Acad Sci USA* (1982) 79: 6507-11.
- 79 Dyring Q, Loe LV. Fluoride poisoning and cholinesterases in rat. *Acta Pharmacol Toxicol* (1956) 12: 364-8.
- 80 Charles CT, Mc Queen CA, Sharma VB, Williams GM. The lack of genotoxicity of sodium fluoride in a battery of cellular tests. *Cell Biol Toxicol* (1988) 4: 173-86.
- 81 Kruger BJ. Ultrastructural changes in ameloblast from fluoride treated rats. *Arch Oral Biol* (1968) Vol. 13, pp: 969-77.
- 82 Kruger BJ. The effect of different level of fluoride on the ultrastructure of ameloblast in the rat. *Arch Oral Biol* (1970) Vol. 15, pp: 109-14.
- 83 Walton RE, Eisenmann DR. Ultrastructural examination of various stages of amelogenesis in the rat following parenteral fluoride administration. *Arch Oral Biol* (1974) Vol. 19, pp: 171-82.
- 84 Bronckers ALJJ, Jansen Lyda-L, Woltgens JHM. A histological study of the short-term effects of fluoride on enamel and dentine formation in hamster tooth-germs in organ culture *in vitro*. *Arch Oral Biol* (1984) Vol. 29 No. 10 pp 803-10.
- 85 Bronckers ALJJ, Jansen Lyda-L, Woltgens JHM. Long-term (8 days) effects of exposure to low concentration of fluoride on enamel formation in hamster tooth-germs in organ culture *in vitro*. *Arch Oral Biol* (1984) Vol. 29 No. 10 pp 811-19.
- 86 Den Besten PK, Crenshaw MA. The effects of chronic high fluoride levels on forming enamel in the rat. *Arch Oral Biol* (1984) 29:675-9.
- 87 Matsuo S. Influence of fluoride on secretory pathway of the secretory ameloblast in rat incisor tooth germs exposed to sodium fluoride. *Arch Toxicol* (1996) 70: 420-9.
- 88 Matsuo S. Mechanism of toxic action of fluoride in dental fluorosis: whether trimeric G proteins participate in the disturbance of intracellular transport of secretory ameloblast exposed to fluoride. *Arch Toxicol*. 1998 Dec; 72 (12): 798-806.
- 89 Hirano S, Ando M. Apoptotic cell death following exposure to fluoride in rat alveolar macrophages. *Arch Toxicol* (1996) 70 (3-4): 249-51.
- 90 Chen J, Chen X, Yang K, Xia T, Xie H. Studies on DNA damage and apoptosis in rat brain induced by fluoride. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* (2002) 36 (4): 222-4.

-
- 91 Shan KR, Qi XL, Long YQ, Nordberg A, Guan ZZ. Decreased nicotinic receptors in PC12 cells and rat brains influenced by fluoride toxicity-a mechanism relating to a damage at the level in post-transcription of the receptor genes. *Toxicology* (2004) 200: 169-77.
- 92 Sun HC, Liu M, Ouyang J, Li GS. The effect of overdose fluoride on the proliferation and apoptosis of rat incisor ameloblast, *Zhoughua Kou Quian Yi Xue Za Zhi* (2003) 38 (3):217-219.
- 93 Anasari B. In situ end-labelling detects DNA strand break in apoptotic and other physiological and pathological states. *J Pathol* (1993) 170:1-8
- 94 Gorczyca W. Presence of DNA strand break and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res* (1993) 207: 202-5.
- 95 Wijsman JH. A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA. *J Histochem Cytochem.* (1993) 41: 7-12.
- 96 Wang AG, Xia T, Zhan M, Liu F, Chen XM, Yang KD. Effects of fluoride on lipid peroxidation, DNA damage and apoptosis in human embryo hepatocytes, *Biomed Environ Sci* (2004) 17 (2): 217-22, Jun.
- 97 Hayashi R, Ito Y, Matsumoto K, Fujino Y, Otsuki Y. Quantificative differentiation of both free 3'-OH and 5'-OH DNA ends between heat-induced apoptosis and necrosis. *J Histochem Cytochem* (1998) 46: 1051-59.
- 98 Shingo Y, Zhu Y, Matsui T, Tipirneni N, Yasuhara Y, Kaneki M, Rosenzweig A, Martyn J. Comparison of comet assay, electron microscopy, and flow cytometry for detection of apoptosis. *The journal of Histochemistry & Cytochemistry* (2003) 51(7): 873-85.
- 99 Seishiro H, Mitsuru A, Sanae K. Inflammatory responses of rat alveolar macrophages following exposure to fluoride. *Arch Toxicol* (1999) 73: 310-15.