



## MICRONÚCLEOS Y ANORMALIDADES NUCLEARES EN CÉLULAS DE MUCOSA BUCAL DE INDIVIDUOS EXPUESTOS A LA SOLUCIÓN ELECTROLIZADA DE SUPEROXIDACIÓN (OXORAL®).

César Michel Baltazar<sup>a</sup>, M.G. Noriega Flores<sup>a</sup>, A.L. Zamora Pérez<sup>a</sup>, Y.M. García Ortiz<sup>a</sup>, C. Guerrero Velázquez<sup>a</sup>, F.R. Saldaña Velasco<sup>a</sup>, B.C. Gómez Meda<sup>b</sup> y G. Zúñiga González<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Investigación en Odontología, CUCS, U de G. cesar\_mb8@hotmail.com, gera\_noriega27@hotmail.com, anazamora@gmail.com, ortizgamarlene@hotmail.com

<sup>b</sup> Instituto de Biología Molecular y Medicina Genómica, CUCS, U de G. Laboratorio de Mutagénesis, CIBO, IMSS. beligomezmeda@gmail.com, mutagenesis95@gmail.com

### RESUMEN

**INTRODUCCIÓN:** Existe una amplia gama de productos o materiales dentales de los cuales el odontólogo puede valerse para brindar la mejor atención a sus pacientes. Las soluciones electrolizadas de superoxidación con pH neutro son de uso común, y a pesar de su alto contenido de iones o radicales son pocos los estudios que se han realizado para determinar su potencial genotóxico y citotóxico. Existen diversas pruebas para determinar la genotoxicidad, una de ellas es el análisis de micronúcleos (MN) en células de mucosa bucal. **OBJETIVO:** Determinar el daño al ADN por medio del conteo de MN y anomalías nucleares (AN) en células de mucosa bucal de individuos expuestos a solución electrolizada de superoxidación (Oxoral®).

**MATERIAL Y MÉTODOS:** Se formaron 2 grupos: grupo 1 expuesto a Oxoral® enjuague (n=20) y grupo 2 expuesto a Oxoral® gel (n=20). El grupo 1 y 2 se muestrearon al inicio del estudio, 15 días y 30 después. Las muestras de células de mucosa fueron procesadas para su análisis al microscopio de fluorescencia.

**RESULTADOS:** Se observó que el uso de Oxoral® gel en células de lengua incrementó significativamente ( $P < 0.05^*$ ) el número de micronúcleos, células binucleadas, y cromatina condensada comparado con la muestra basal. En el grupo Oxoral® enjuague en células de carrillo se presentó incremento en células ( $P < 0.05^*$ ) picnóticas, mientras que en células de lengua hubo incremento ( $P < 0.05^*$ ) de prolongaciones nucleares y cariólisis respecto a la muestra basal.

**CONCLUSIONES:** Nuestros resultados reflejan el daño al ADN por el uso de las soluciones electrolizadas de superoxidación; con esto debemos enfatizar la responsabilidad que tiene el profesional de la salud para la prescripción y delimitación del uso del producto.

### 1. INTRODUCCIÓN

Los organismos vivos están expuestos a diversos agentes o elementos que por sus propiedades físicas, químicas y/o biológicas, al ser ingeridos, inhalados, aplicados tópicamente o inyectados, son capaces de provocar alteraciones orgánicas, funcionales y aún la muerte <sup>Córdoba 2001</sup>.

La genética toxicológica es la unión de dos grandes áreas de conocimiento como son la toxicología y la genética, mediante la cual se pretende determinar el impacto que distintos agentes pueden ocasionar sobre el material genético.

Tal exposición puede ser inadvertida, accidental e incluso inevitable. Algunos de estos elementos son "inocuos", pero la mayoría provocan reacciones biológicas de naturaleza farmacológica y tóxica. A menudo estas reacciones dependen de la conversión de las sustancias absorbidas en un



metabolito activo, que podría causar con ello fenómenos de mutagenicidad, teratogenicidad o carcinogenicidad<sup>Montoya-Cabrera 1992</sup>.

El monitoreo del daño genético en las poblaciones expuestas utilizando biomarcadores se vislumbra como una herramienta útil en la prevención de los posibles agentes que pueden interaccionar negativamente con el ADN. Las mayores limitaciones que tienen como marcadores de efecto son que no caracterizan la naturaleza del daño nuclear inducido y que existe considerable variación intra e interindividual<sup>Bonassi 2002</sup>, por lo que no es suficiente aplicar una sola prueba para detectar con exactitud o predecir con confiabilidad los efectos genotóxicos de una sustancia<sup>Shelby 1993; Jena and Bhunya 1995</sup>, y conocer las propiedades genotóxicas de sustancias y el grado de daño que provocan estas en el contenido genético de nuestra población. Constantemente son desarrollados nuevos métodos e implementadas nuevas técnicas a fin de aumentar el repertorio de conocimiento que se tiene acerca la asociación de tóxicos y DNA<sup>Guachalla 2003</sup>. Tal es el caso del ensayo de MN un ensayo *in vivo* para detectar genotoxicidad, el cual es económico, sencillo y altamente informativo, pues su presencia no deja duda del daño producido<sup>Schmid 1975</sup>; así esta prueba permite delimitar los posibles riesgos de nuevos productos lanzados al mercado para uso cotidiano, tal como las soluciones electrolizadas de superoxidación con pH neutro, las cuales tiene un alto potencial óxido-reducción (Redox). La actividad antimicrobiana de esta solución ha sido probada contra las bacterias, micobacterias, virus, hongos y esporas. Los datos recientes han demostrado que la solución electrolizada de superoxidación es rápidamente efectiva Su pH neutro ha permitido la aplicación en tejidos bucales. Sus características fisicoquímicas y su amplio poder bactericida, basado en el efecto de los radicales libres de Na, Cl y O<sup>2</sup> que condicionan desnaturalización de las proteínas, hidratos de carbono y lípidos de la pared bacteriana, así como alteración de cápsidas, DNAsas y RNAsas virales, sugieren su utilidad en clínica, en el lavado de heridas, abscesos, en la esterilización de instrumental y material considerado crítico, entre otros usos<sup>Nachón 2005</sup>. Sin embargo, son pocos los estudios realizados sobre su potencial genotóxico.

## 2. TEORÍA

La solución electrolizada de superoxidación (Oxoral<sup>®</sup>) incrementa el número de MN y AN en células de mucosa bucal de humanos.

## 3. PARTE EXPERIMENTAL

Se tomaron muestras de 40 individuos adultos de entre 20 y 35 años de la comunidad universitaria del Centro Universitario de Ciencias de la Salud, de ambos sexos, que voluntariamente aceptaron participar en el estudio, mismos aparentemente sanos sistémicamente, que no estuvieran bajo ninguna terapia médica, fumaran o que hubiesen ingerido bebidas alcohólicas 30 días antes de tomar la muestra. Así mismo se consideró que contarán con buen estado de salud bucal.

Se formaron 2 grupos con 20 participantes cada uno para asegurar su poder estadístico.

Grupo 1: Individuos que realizaron enjuagues bucales de 30 segundos de duración, dos veces al día (mañana y noche) con 15 ml de solución electrolizada de superoxidación (Oxoral<sup>®</sup> enjuague) durante 30 días.

Grupo 2: Individuos que utilizaron solución electrolizada de superoxidación (Oxoral<sup>®</sup> gel) de forma tópica en carrillo y borde laterales de la lengua 2 veces al día por 30 días.

### *Criterio de inclusión*

- Individuos adultos de entre 20 a 40 años de ambos sexos, aparentemente sanos y con un estado bucal sano, que aceptaron participar en el estudio de manera voluntaria.
- Aquellos participantes que no usaron ningún producto con el principio activo de la solución electrolizada de superoxidación al menos 30 días antes participar en el estudio.

### *Criterios de exclusión*

- Aquellos voluntarios que utilizaban algún tipo de producto con el principio activo de la solución electrolizada de superoxidación.



- Mujeres embarazadas.
- Individuos con tratamiento de ortodoncia.
- Individuos fumadores o que ingirieran algún tipo de bebida embriagante 30 días antes de su participación en el estudio o durante el mismo.
- Individuos con enfermedades crónicas degenerativas que estuvieron bajo algún tratamiento farmacológico como antibióticos, inmunomoduladores, drogas antineoplásicas o antiinflamatorios.

*Criterios de eliminación*

- Muestras dañadas o que por fallas técnicas imposibiliten el conteo de células en los frotis.
- Participantes que no desearon continuar con el uso del producto.

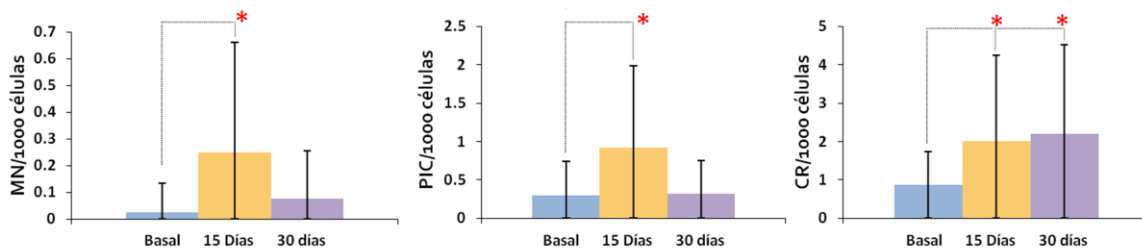
*Obtención y preparación de las muestras*

A todos los participantes se les tomaron muestras de células de mucosa bucal de lengua y de carillo y se realizaron dos frotis por participante antes durante y después del uso de la solución electrolizada de superoxidación. Se les pidió a los participantes que se enjuagaran la boca con agua; y después, con un portaobjetos se hizo un raspado de la mucosa bucal de los carillos y de los bordes laterales de la lengua y se extendieron las muestras en otra laminilla limpia y desengrasada, luego se repitió la operación para tener muestra por duplicado. Las muestras obtenidas se dejaron secar al aire y se fijaron en metanol al 80% por 48 horas, para proceder a la tinción.

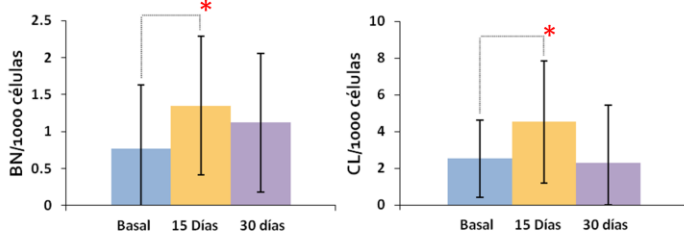
Las muestras se tiñeron con naranja de acridina<sup>Zúñiga-González 2003</sup>, colorante específico para ácidos nucleicos, el cual emite fluorescencia y las muestras se analizaron para contar el número de micrónúcleos (MN), prolongaciones nucleares (PN), células binucleadas (BN) y anomalías nucleares, como lo son la cariólisis (CL), cromatina condensada (CC), cariorexis (CR), picnosis (PIC) en 2000 células normales, con microscopio marca Olympus modelo CX31, con sistema iluminador de fluorescencia OLYMPUS modelo CX-RFLT50 (lámpara de mercurio 50W y filtro de fluorescencia azul DMB-2 OLYMPUS) y sistema fotográfico digital OLYMPUS modelo SC3512Y.



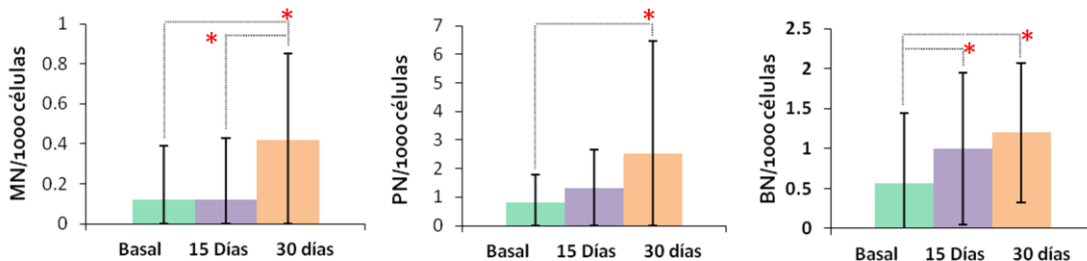
#### 4. RESULTADOS



**Gráficas 1. Comparación de micronúcleos (MN), células picnóticas (PIC) y cariorexis (CR) en el grupo Oxoral® enjuague en carrillo en los diferentes tiempos de muestreo. \*Significancia ( $p < 0.05$ ).**



**Gráficas 2. Comparación de células binucleadas (BN) y kariolisis (CL) en el grupo Oxoral® enjuague en lengua en los diferentes tiempos de muestreo. \*Significancia ( $p < 0.05$ ).**



**Gráficas 3. Comparación de micronúcleos MN, prolongaciones nucleares (PN) y células binucleadas (BN) en el grupo Oxoral® gel en lengua en los diferentes tiempos de muestreo. \*Significancia ( $p < 0.05$ ).**

En los individuos del grupo Oxoral® enjuague se observó que en células de carrillo el número de MN incremento significativamente (3.5 veces) a los 15 días de uso en comparación de la muestra basal, sin embargo el valor obtenido de MN a los 30 días regresa a valores similares a los basales; en este mismo tejido el número de PIC incrementó significativamente (3 veces) a los 15 días de muestreo comparado con los valores de la muestra basal, mientras que el valor a los 30 días de muestreo disminuyó a valores similares a los basales.; también el número de CR incrementó significativamente a los 15 y 30 días en comparación de la muestra basal (2.29 veces y 2.52 veces respectivamente) (Gráfica1)

En células de lengua, el número de BN incrementó significativamente (1.75 veces) a los 15 días de muestreo en relación a la muestra basal; mientras que las CL incrementaron significativamente (1.79 veces) a los 15 días de muestreo con respecto al valores basal, y a los 30 días de muestreo este valor disminuyó hasta valores parecidos a los basales en ambas anomalías. (GRÁFICA 2)



En el grupo que utilizo Oxoral<sup>®</sup> gel no se observó incremento significativo en ninguna anomalía en células de carrillo; mientras que en células de lengua, el número de MN incremento significativamente (3.5 veces) en la muestra de 30 días en comparación a la muestra basal y a los 15 días; el número de PN incremento (3 veces) a los 30 días en comparación a la muestra basal; mientras que las BN incrementaron a los 15 y 30 días (1.7 y 2.1 veces respectivamente) respecto al valor basal. (Gráfica 2)

## 5. CONCLUSIONES

- ✓ Tanto la presentación gel como enjuague de Oxoral<sup>®</sup> mostraron incrementos de marcadores de genotoxicidad y citotoxicidad debido a la presencia de iones de Cl, Na y O<sup>2</sup>.
- ✓ En el grupo de Oxoral<sup>®</sup> enjuague se observó incremento significativo en el número de PIC en células de mucosa bucal de carrillo, mientras que en células de mucosa bucal de lengua encontramos incremento significativo en células con PN y CL.
- ✓ El uso de Oxoral<sup>®</sup> gel mostró incremento significativo de MN, BN, y CC en células de lengua.
- ✓ La variable de sexo y edad no mantuvieron relación con el incremento de daño al ADN.
- ✓ El uso de la presentación enjuague o gel no condiciona el incremento de MN y AN.
- ✓ El tejido de lengua y carrillo no influye en la presencia de MN y AN.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Bonassi S, Au WW. Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction. *Mutat. Res.* 2002; 511: 73-86.
2. Cabello C, Rosete D, Manjarrez M. Efecto de una solución electrolizada de superoxidación con pH neutro sobre la infección del virus de influenza A en células MDCK. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.* 2009; 22: 280-287.
3. Guachalla LM, Rudolph KL. ROS induced DNA damage and checkpoint responses: influences on aging?. *Cell Cycle.* 2010 Oct 15;9(20):4058-60.
4. Jena GB, Bhunya SP. Use of chick, *Gallus domesticus*, as an *in vivo* model for the study of chromosome aberration: A study with mitomycin C and probable location of a "hot spot". *Mutat Res.* 1995; 334: 167-174.
5. Montoya-Cabrera MA. Toxicología Clínica. Ed. Francisco Méndez Cervantes. México. 1992; 315.
6. Schmid W. The micronucleus tests. *Mutat Res* 1975; 31:9-15.
7. Rutala WA, Weber DJ. New disinfection and sterilization methods. *Emerg Infect Dis.* 2001; 7: 348-353.
8. Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, Fenech M: Buccal micronucleus cytome assay. *Nature Protocols.* 2009; 4: 825-837.
9. Zúñiga-González G, Ramírez-Muñoz MP, Torres-Bugarín O, Pérez-Jiménez J, Ramos-Mora A, Zamora-Perez A, Gallegos-Arreola MP, Sánchez-Corona J. Induction of micronuclei in the domestic cat (*Felis domesticus*) peripheral blood by colchicine and cytosine-arabinoide. *Mutat Res* 1998; 43:187-189.