




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

EFFECTO DE LA INGESTA DE FLUORURO DE SODIO SOBRE
LA PRODUCCIÓN DE MALONDIALDEHÍDO (MDA) Y LA
ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA ENZIMA CATALASA COMO
INDICADORES DE LA GENERACIÓN DE RADICALES LIBRES
EN LA MUCOSA BUCAL DE LA RATA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
CIRUJANO DENTISTA
P R E S E N T A :
GONZÁLEZ VELASCO LUCILA



DIRECTOR: DR. JOSÉ A. MORALES GONZÁLEZ
ASESOR: DR. JOSÉ GUTIÉRREZ SALINAS



MÉXICO, D.F.

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

AGRADECIMIENTOS.

La presente tesis fue realizada bajo la dirección del DR. José Antonio Morales González del Laboratorio de Bioquímica Médica de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM y la supervisión del DR. José Gutiérrez Salinas del Laboratorio de Bioquímica y Medicina Experimental de la unidad de Investigación Biomédica del centro Medico Nacional "20 de Noviembre" ISSSTE.

Esta tesis fue apoyada parcialmente por el donativo IN-211402-3 Y IX-21060 del DGAPA-PAPIIT, UNAM de la FES-IZATACALA y por la Sociedad Mexicana de Investigación Biomédica A



MÉXICO, D.F.

2004

DEDICATORIA.

A mis padres:

Sr. Luis y Sra. Ma Elena. Que a lo largo de mi vida y carrera me han apoyado incondicionalmente, poniendo todas sus ilusiones en hacer de mí una mujer exitosa y feliz.

Agradezco especialmente a mis hermanas Norma y Sandy por los momentos compartidos, así como por sus sinceros consejos y críticas, para la realización de esta tesis.

Hago una mención especial a dos grandes amigos Serch y Miguel, los cuales me apoyaron con sus conocimientos de computación para el éxito de este proyecto.

A mis amigos:

Aileen, Edgar, Raúl, Heriberto, Juan José, Dulce, Lucero, etc., que han sido como mis hermanos, compartiendo alegrías y tristezas, triunfos y derrotas. Y que estoy segura que caminarán junto a mí en este largo camino que es la vida.

Porque te hago saber
Sancho,
que la boca sin muelas
es como el molino sin piedra,
y mucho más se ha de estimar
un diente que un diamante.

Miguel de Cervantes Saavedra

Nuestra lealtad es para las especies Y el
planeta.
Nuestra obligación de sobrevivir no es sólo
para nosotros mismos sino también para ese
cosmos antiguo y vasto, del cual derivamos.

Anónimo.

INDICE.

RESUMEN.	1
INTRODUCCIÓN	2
- Aspectos químicos de fluoruro	2
- Antecedentes históricos de fluoruro	2
- Fuentes del fluoruro de sodio	7
- Toxicología del fluoruro de sodio	7
Toxicidad aguda	7
Toxicidad crónica	8
Fluorosis dental	8
Fluorosis esquelética	9
Concentración óptima del fluoruro de sodio	9
- Vías de administración del fluoruro	9
Fluoruros sistémicos	9
Fluoruros tópicos	9
- Absorción y excreción del fluoruro de sodio	10
-Estructura del esmalte dental y el mecanismo de incorporación del fluoruro sodio en este	11
Las concentraciones tisulares del fluoruro de sodio	11
Efecto remineralizante	12
Efecto antimicrobiano	12
- Efectos adversos producidos por el fluoruro de sodio en cavidad bucal	15
- Radicales libres	17
Definición.	
- Formación de radicales libres	17
Factores endógenos	17
Factores exógenos	18
- Daño celular inducida por radicales libres	19
Lípidos	21
Proteínas	23
Ácido desoxirribonucleico (DNA)	23
Estrés oxidativo	23
- Efectos positivos de los radicales libres en el ser humano	24
-Mecanismos antioxidantes	24
Enzimas antioxidantes	25
Proteínas que contienen a un metal de transición	28
Proteínas que protejan a las biomoléculas	28
Agentes antioxidantes de bajo peso molecular	28
- EL fluoruro de sodio y la producción de radicales libres en la mucosa bucal	28
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	30
JUSTIFICACIÓN	31
HIPOTESIS	32
- Hipótesis	32

- Hipótesis nula.....	32
OBEJETIVOS	33
- Objetivo general.....	33
- Objetivos específicos.....	33
DISEÑO Y DURACIÓN	35
MATERIAL Y METODOS...	36
- Procedimiento general.....	37
Criterios de inclusión.....	37
Criterios de exclusión.....	37
Criterio de eliminación.....	38
Aspectos de ética y bioseguridad.....	38
- Obtención del tejido bucal.....	38
- Determinación de la concentración de MDA.....	38
- Determinación de la actividad específica de la enzima catalasa.....	39
- Análisis estadístico.....	40
RESULTADOS	41
DISCUSIÓN	56
CONCLUSIONES	60
BIBLIOGRAFIA	61
ABREVIATURAS	67

RESUMEN.

Se sabe que el fluoruro de sodio (NaF) es utilizado como medida preventiva ante la caries dental por lo cual es un componente importante de una gran variedad de productos para la higiene bucal, sin embargo, posee una alta reactividad química por lo que es posible que actúe como un inductor de daño sobre la mucosa bucal de la rata incrementando la producción de radicales libres derivados del oxígeno. **Objetivo:** Determinar el efecto de la ingesta de NaF sobre la producción de radicales libres en la mucosa bucal de la rata mediante la determinación de la concentración de malondialdehído (MDA) y la determinación de la actividad específica de la enzima catalasa. **Métodos:** Se utilizaron ratas hembras y machos de la cepa Wistar (300 g peso promedio) las cuales fueron tratadas con 1 ó 50 ppm de NaF administrado en el agua de bebida *ad libitum* por un período de cuatro semanas. Las ratas fueron sacrificadas por decapitación directa cada semana hasta el término del tratamiento. Una vez sacrificadas, se obtuvo por disección dirigida la mucosa bucal la cual fue homogenizada en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) para posteriormente ser centrifugado y obtener una fracción soluble total para la determinación de la concentración de malondialdehído (MDA como un marcador de radicales libres), así como la determinación de la actividad específica de la enzima catalasa. **Resultados:** Los machos fueron más sensibles a la toma de NaF en comparación con las ratas hembras en las dos dosis probadas, denotándose por la disminución en la concentración de MDA a lo largo del tiempo. Por otro lado, la catalasa aumentó su actividad específica en ambos sexos en el transcurso del tratamiento. **Conclusiones:** Los resultados demuestran que el tratamiento con NaF en el modelo experimental que hemos evaluado, si produce cambios importantes en la mucosa bucal denotados por los cambios en la concentración del MDA así como en la actividad específica de la catalasa; siendo estos cambios disímiles entre ambos sexos y entre ambas dosis. Por otro lado, los cambios en la concentración de MDA y en la actividad de la catalasa no son correlacionados por lo que se deben hacer más investigaciones al respecto para determinar si dichos cambios tienen relación directa con la producción de radicales libres.

INTRODUCCIÓN.

ASPECTOS QUIMICOS DEL FLUORURO.

El flúor (en latín fluo, que quiere decir flujo), de símbolo químico F, es un elemento gaseoso, químicamente reactivo y venenoso. Se encuentra en el grupo 17 (VIIA) de la tabla periódica, y es un halógeno. Este elemento fue descubierto en 1771 por el químico sueco Carl Wilhelm Scheele, y fue aislado por el químico francés Herí Moissan en 1886¹.

El flúor es un gas amarillo verdosos pálido, ligeramente más pesado que el aire, venenosos, corrosivo y que posee un olor penetrante y desagradable. Su masa atómica es de 18.998. Tiene un punto de fusión de - 219.61 °C, un punto de ebullición de -188.13 °C y una densidad relativa de 1.51 en estado líquido. Es el elemento no metálico más activo químicamente. Se combina directamente con la mayoría de los elementos e indirectamente con nitrógeno, cloro y oxígeno; se mezcla con la mayoría de los compuestos formando fluoruros que paradójicamente se encuentran entre los compuestos químicos más estables ¹.

ANTECEDENTES HISTORICOS DEL FLUORURO.

Hasta finales del siglo XIX la presencia de fluoruro y su posible papel en la fisiología tisular no era evidente para algunos investigadores y su uso para propósitos dentales empezó en el siglo XIX.

La importancia del flúor fue subrayada por Sir James Crichton Browne en un discurso a la rama de condados orientales de la Asociación Dental Británica en 1892 quién dijo: "una causa específica del aumento de la caries dental es el cambio en la alimentación, dado que los elementos gruesos (cortezas exteriores de los granos, salvado, cáscaras de trigo etc.) han sido eliminados y sustituidos por pan blanco y harina fina y ya no se consumen en la misma cantidad, como lo hacían nuestros ancestros y en cierta medida nos privamos de un elemento químico que ellos recibían en abundancia; el flúor".

Probablemente el primer informe de la concentración de fluoruro en el agua potable fue citada en partes por millón (ppm) por Hillbrand (1893), quién reportó un valor de 5.2 ppm (mg/L) de F (10.7% como fluoruro de calcio) en el agua de un manantial termal en Nuevo México.

Entre los años de 1895 y 1920 algunos países reportaron poblaciones con diferentes grados de fluorosis, entre los que se encontraron Italia, Japón, Argentina, Gran Bretaña, España y China.

McKay reporta en 1925, en la ciudad de Oakley Idaho, (EUA) que los dientes manchados de los niños era afectado por el consumo de agua, lo que sugiere también que el agua inhibía la caries

En 1931, en Bauxita, (EUA) Churchill publicó los resultados de la elevada concentración de fluoruro en el agua; al mismo tiempo Smith y Lanz, de la universidad de Arizona, que estudiaban el mismo problema, informaron que: “el flúor era responsable del esmalte moteado” y lo denominaron fluorosis endémica.

En el año de 1932 se realizó una investigación en algunas ciudades de Estados Unidos, México, Holanda, India y algunas regiones de África observándose que un contenido de 1.37 ppm en el agua provocaba manchas en el esmalte y que un contenido de fluoruro entre 0.6-1.2 ppm en el agua de consumo no producía fluorosis y a la vez disminuía la caries dental. En 1935, en el servicio de salud pública de los Estados Unidos realizaron investigaciones para conocer cual era el nivel máximo aceptable de fluoruros en agua y observaron que la fluorosis no sólo dependía de la concentración de fluoruro en agua, sino también de la cantidad de agua bebida.

Justo antes de la segunda guerra mundial, se descubrieron los efectos reductores del flúor sobre la formación de caries dental. En la posguerra, el trabajo de investigación dental, junto con el de todos los campos de la ciencia, creció y desarrollo a una velocidad meteórica. Se desarrolló el uso de flúor en el agua potable, aparecieron los consultorios dentales, programas escolares y los dentífricos, al final de los años setenta, se descubrió la disminución en la formación de caries dental.

El fluoruro de sodio neutro fue el primer agente aplicado tópicamente estudiado independiente por Kntuson y Armstrong (1943) y Bibby (1944). La primera publicación que describió el uso de enjuague bucal con fluoruro fue Bibby y colaboradores quienes probaron una solución ácida de fluoruro de sodio (NaF), buscando un método de administración local de fluoruros que no requiriera de un profesional en donde utilizo una solución de NaF diluida 1/1000 con un pH de 4 en estudiantes voluntarios de Massachussets (EUA).

El 2 de mayo de 1945 en el estudio Newburgh-Kingstong, se utilizó 1ppm de NAF en el agua de consumo diario de la ciudad, y se confirmó que el fluoruro participa en la prevención de la caries dental de la población infantil, y que aún a los 44 años de edad se obtenía un 20% de prevención en las zonas ricas con dicho elemento.

En el año de 1947 Rusell y Elvove establecieron que la presencia de fluoruros en agua de bebida durante el período de formación dental producía una marcada disminución en la prevalencia de caries dental, estando el grado de afectividad directamente relacionado con la concentración de fluoruros, hasta valores de 1.5 ppm. En México, la Secretaría de Salud informa actividades preventivas a partir de 1959, educación para la salud y aplicaciones tópicas de fluoruro.

El primer país en legislar la fluoración del agua de bebida fue Irlanda en 1960, y a ésta se sumaron otros países como Australia, Canadá, etc. el efecto era mayor si los niños y adultos consumían agua fluorada durante toda su vida.

La OMS recomendó en la 31 asamblea en 1978, así como en diferentes publicaciones e informes técnicos, la administración de suplementos fluorados para la prevención de la caries dental: "instando a los estados miembros a que estudiaran la fluoración del agua de abastecimiento público como parte de sus planes nacionales de prevención y lucha contra la caries dental y recomendó que cuando la fluoración del agua no fuera viable se estudiara otros métodos que permitieran conseguir una aplicación o ingestión diaria óptima de fluoruros"².

En la década de los 90s, se estableció la incorporación de flúor a la tradicional sal de mesa yodada ³ como medida de prevención, implementado por las autoridades sanitarias correspondientes, por lo que se considera innecesario en la actualidad la ingestión de algún suplemento que contenga flúor como medida preventiva para evitar la conocida fluorosis dental o aparición de manchas cafés en los órganos dentales ⁴ (Tabla 1 datos históricos del flúor).

Tabla 1 datos históricos del fluoruro

AÑO	DESCUBRIMIENTO
1771	Descubrimiento de fluoruro por el químico Carl Wilhelm Scheele.
SIGLO XIX	La presencia del fluoruro y su fisiología era desconocida. Empieza a usarse el fluoruro para propósitos dentales
1892	Sir James Crichton Browne subraya la importancia de fluoruro y la alimentación
1893	HILBRAND Da por primera vez la concentración de fluoruro en partes por millón (ppm) para el agua potable.
1895-1920	Algunos países reportan diferentes grados de fluorosis
1925	MC KAY Sugirió que el agua producía el esmalte manchado e inhibía la caries.
1931	CHURCHIL. Publicó los resultados de la elevada concentración de fluoruro en el agua
1931	SMITH Y LANZ Denomina al esmalte moteado fluorosis endémica.
1932	Investigación acerca de la concentración de fluoruro en el agua. Observando que 0.6 -1.2 ppm en el agua no provocaba fluorosis y disminuía la caries
1935	Investigación para determinar el nivel óptimo de fluoruro aceptable en el agua
	Justo antes de la 2da guerra mundial se descubren los efectos del fluoruro para disminuir la caries.
1943	KNTUSON Y ARMSTRONG Hicieron estudios acerca del fluoruro de sodio neutro aplicado tópicamente.
1944	BIBBY primera publicación sobre el uso del enjuague bucal con fluoruro
1945	NEW BURGH- KINGSTONG Utilizo 1ppm de NaF en el agua de uso diaria y se confirma que sirve para prevenir la caries.
AÑO	DESCUBRIMIENTOS

1947	RUSELL Y ELVOVE Establecen que el F en el agua a 1.5 ppm en la etapa de formación dental para disminuir la caries.
1960	Irlanda es primer país en legislar la fluoración de agua
1978	OMS Hace un llamado para que se estudie la fluoración del agua.

FUENTES DEL FLUORURO DE SODIO.

El flúor existe en la naturaleza combinado en forma de criolita, apatito, y fluorita, de la que se derivan la mayoría de los compuestos fluorados en los que cabe destacar al NaF se encuentra en el agua de mar, en los ríos, en los manantiales minerales, en los tallos de algunas hierbas, en las partes calcáreas, huesos, conchas marinas, y por supuesto en los dientes de los animales y seres humanos ⁵.

Los fluoruros son usados en la industria para fabricar acero, sustancias químicas, cerámicas, lubricantes, tintas, plásticos y pesticidas (contra hormigas y cucarachas). El uso más importante para fines de nuestra investigación encontramos que el fluoruro de sodio (NaF), es el más común y frecuente componente de una variedad de productos dentales (pastas, enjuagues, geles, barnices, complementos alimenticios, etc.) debido a su afinidad por el agua, el bajo costo y de ser un elemento esencial para prevenir la caries ⁶.

TOXICOLOGÍA DEL NAF.

El flúor es considerado como un elemento traza potencialmente tóxico con algunas funciones bioquímicas indispensables, ya que se requiere para la formación de tejido óseo y para mantener su integridad. Existen reportes controversiales sobre el beneficio de los fluoruros ya que pequeñas cantidades ayudan a la prevención de la caries dental. Sin embargo cantidades excesivas pueden perjudicar la salud dental y sistémica ⁷.

La ingesta de fluoruros en dosis mayores a las indicadas como terapéuticas o preventivas para cada caso en particular, puede provocar intoxicaciones en un rango de agudas a crónicas, dependiendo de la magnitud de la ingesta, del peso corporal del individuo, del tiempo de absorción del fluoruro, de la sal o vehículo ingerido, de la edad o período de desarrollo del paciente y otros factores que eventualmente puedan influir en las manifestaciones de su toxicidad ⁸.

Toxicidad aguda: Corresponde a una ingesta de 5 miligramos de fluoruro por kilogramo de peso corporal ⁹. Los signos y síntomas de una intoxicación aguda por fluoruros dependerán en primera instancia de la magnitud de la ingesta, en relación a la edad del paciente (peso corporal), los

efectos se manifestarán, en orden ascendente, de acuerdo a la dosis ingerida como náuseas, hipersalivación, vómitos, dolor abdominal y diarrea. Si la dosis es alta, y bajo las mismas condiciones clínicas, los efectos se manifestarán con convulsiones, arritmia cardíaca, estado comatoso, parálisis respiratoria y deceso.

Las medidas de urgencia a seguir en una intoxicación aguda por fluoruros será provocar el vómito inmediato, administrar leche o antiácidos, traslado del enfermo al Servicio de Urgencia Hospitalaria, donde evaluada la situación se le efectuará un lavado estomacal con hidróxido de Calcio y/o administración de Gluconato de Calcio intravenoso ¹⁰.

Toxicidad crónica: La ingesta por largo tiempo de cantidades diarias de fluoruros que conduzcan a dosis mayores de 0.1 mg por kilo de peso, puede ocasionar una intoxicación crónica, la que podría traducirse en manifestaciones clínicas en el esmalte de la pieza dentaria.

Una exposición por largo tiempo a altos niveles de NaF en la ingesta se manifiesta por una entidad patológica llamada fluorosis dental y/o fluorosis esquelética ¹¹.

Fluorosis Dental: Se caracteriza por afectar principalmente a los niños se observa una hipomineralización del esmalte, cuya severidad y distribución dependerá de la concentración plasmática de fluoruros, la etapa de actividad amelogénica y la susceptibilidad del huésped ¹².

Clínicamente estará caracterizada por opacidades color blanco-tiza de variada extensión, que afectarán a dientes homólogos; las que se confundirán con el esmalte sano adyacente, donde tinciones exógenas posteruptivas podrán agregarse en los casos de mayor severidad (mayor número y tamaño de las porosidades).

Si la ingesta prolongada en el tiempo se produce por sobre los 6 años de edad, el eventual daño dependerá principalmente de la magnitud de la ingesta y del estado de salud general del individuo, afectándose solamente los dientes posteriores ¹³.

Fluorosis esquelética: Se presenta en los adultos debido a la exposición prolongada y excesiva de NaF ¹⁴ ocasionando la formación de depósitos irregulares en los huesos, aumento de la densidad, fragilidad y posibilidad de fractura dolor de las articulaciones, movimientos limitados y una eventual invalidez. En los animales la exposición a altas dosis de NaF puede disminuir la fertilidad y producir daño en los espermatozoides y los testículos ¹⁵.

Concentración óptima de fluoruro: Se define como la concentración ideal de fluoruro recomendada para sistemas de agua fluorurada. Estos valores están basados principalmente en la concentración natural del ion fluoruro en el agua y de los resultados de los estudios epidemiológicos básicos que se realizan según el Programa Nacional de Vigilancia Epidemiológica del uso de fluoruros en la prevención odontológica ¹⁶.

VIAS DE ADMINISTRACIÓN DE FLUORUROS.

Fluoruros sistémicos: Los efectos de fluoruro de ese tipo se dan a través de la absorción del torrente sanguíneo con su posterior incorporación en los dientes que se encuentran en formación ¹⁷. Los métodos en los que se utilizan el fluoruro sistemáticamente son:

1. Fluoración de las aguas
2. La sal de mesa yodada y fluorada.
3. Complementos de fluoruro en la dieta.
4. Gran variedad de tabletas, gotas, soluciones líquidas las cuales pueden encontrarse en combinación con suplementos vitamínicos.

Fluoruros tópicos: Es la forma más general de aplicación de fluoruro y esta representado principalmente por los siguientes compuestos:

1. Dentríficos
2. Enjuagues bucales
3. Geles
4. Soluciones de uso profesional

ABSORCIÓN Y EXCRECIÓN DEL FLUORURO DE SODIO.

Los compuestos con fluoruro pueden acumularse en el cuerpo por la ingesta directa de sólidos o líquidos, por absorción a través de la piel, o bien por inhalación de compuestos gaseosos o partículas de polvo ¹⁸. El flúor como ión aislado no se encuentra en la naturaleza, y en el cuerpo humano se transporta a través de las membranas de los diferentes tejidos corporales como fluoruro de hidrógeno (HF). El fluoruro de hidrógeno es un ácido débil, por lo que muchas de sus funciones metabólicas se encuentran relacionadas con el pH de los fluidos que se encuentran en los diferentes compartimientos corporales.

De una ingesta dada de NaF el 80% de la absorción se lleva a cabo a través del tracto gastrointestinal en el estómago e intestino delgado ¹⁹ principalmente y el resto es eliminado a través de las deposiciones. El fluoruro absorbido pasa al plasma sanguíneo, luego es distribuido a los diferentes tejidos, donde se mantiene en proporciones establecidas respecto a la concentración plasmática. Este equilibrio dinámico es posible ya que el fluoruro no se encuentra unido a proteínas en el plasma ²⁰ y su difusión a través de las membranas se relaciona con diferentes factores como son: la cantidad de flúor ingerido, volumen de distribución y el tipo de absorción, la captación de fluoruro por los tejidos calcificados, depuración renal y ósea.

El flúor por lo tanto es excretado por la orina y las concentraciones de su absorción son variables debido a los siguientes factores:

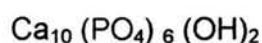
1. Metabólicos.
2. Tiempo.
3. Dietéticos.
4. pH.

Lo anterior no determina concentraciones de saturación en los diferentes compartimientos orgánicos, como se consideró inicialmente, puesto que el organismo humano no cuenta con mecanismos de regulación homeostática de flúor ²¹.

ESTRUCTURA DEL ESMALTE DENTAL Y EL MECANISMO DE INCORPORACION DEL FLUORURO DE SODIO EN ÉSTE.

Es importante destacar que el NaF es un compuesto que no pertenece de manera natural al esmalte de los dientes. Sin embargo, como también ya fue señalado en los párrafos previos, la incorporación del NaF al esmalte dental propicia una mejor resistencia a la caries.

El esmalte dental esta formado principalmente por una estructura de forma prismática caracterizada por tener un alto contenido de hidroxiapatita (su unidad estructural) su fórmula se expresa de la siguiente manera:



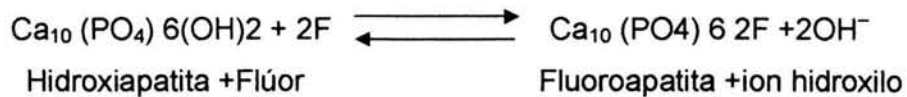
Es importante entender que el esmalte tiene una estructura porosa que permite a los iones difundirse a través de su estructura prismática; de hecho la composición de la matriz de hidroxiapatita no es uniforme en su totalidad. Permitiendo así el intercambiar iones de tamaño y cargas específicas con el medio externo.

El esmalte no esta formado por hidroxiapatita ²² pura, ya que también tiene una fase de no apatita fosfato o carbonato de calcio dismórfico). Dentro de los prismas el calcio puede ser substituido por radio, estroncio o plomo; el fosfato puede ser intercambiado por carbonatos y el hidroxilo por fluoruro, el sodio, magnesio y los grupos carbonatados pueden ser intercambiados o absorbidos en la superficie del prisma desde el exterior.

De esta manera se llevan acabo los procesos de remineralización o desmineralización del esmalte.

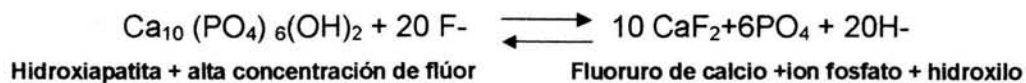
El NaF puede ser incorporado al tejido dentario por tres mecanismos:

1.) Las concentraciones tisulares de NaF: Son incorporados por los cristales de apatita durante su formación en el diente, al reducir su solubilidad formando los cristales de apatita convirtiendo la hidroxiapatita en fluoroapatita, haciendo más resistente al esmalte frente al ataque ácido. Este proceso químico queda ilustrado en la siguiente reacción química ²³.



La superficie de los cristales de hidroxiapatita establece aparentemente un campo eléctrico que atrae a las moléculas de agua y a los iones de NaF. La difusión de iones fluoruro en la cubierta iónica permite el intercambio de éstos con iones hidroxilo de la superficie de los cristales de hidroxiapatita. Dichos iones pueden migrar al cuerpo del cristal e incorporarse a la estructura interior; la migración iónica a través del esmalte durante la fase de mineralización es limitada y la concentración de flúor, por tanto, resulta más elevada en las zonas de la superficie que en partes profundas.

2.) Efecto remineralizante: Se lleva a cabo una vez que el diente este calcificado mediante la incorporación de fluoruros a elevadas concentraciones y pueden minimizar la pérdida de minerales de la superficie del cristal de hidroxiapatita y favorecer la remineralización por inclusión de sales de calcio y fosfatos. Depositando una gran cantidad de fluoruro cálcico, que puede liberarse lentamente y formar hidroxiapatita. La presencia de fluoruro iónico en el sitio de la desmineralización aumenta la remineralización, este proceso es continuo durante toda la vida. Por otro lado, el bajo pH de algunos agentes tópicos de fluoruro pueden aumentar la formación de fluoruro de calcio ²⁴ (Dibujo1).



Cuando la remineralización se efectúa en presencia de fluoruros el cristal reconstituido es más ácido-resistente que el esmalte original.

3.) Efecto antimicrobiano: Los fluoruros actúan sobre la flora microbiana de la placa dentaria, al inhibir las enzimas glucolíticas por los siguientes mecanismos:

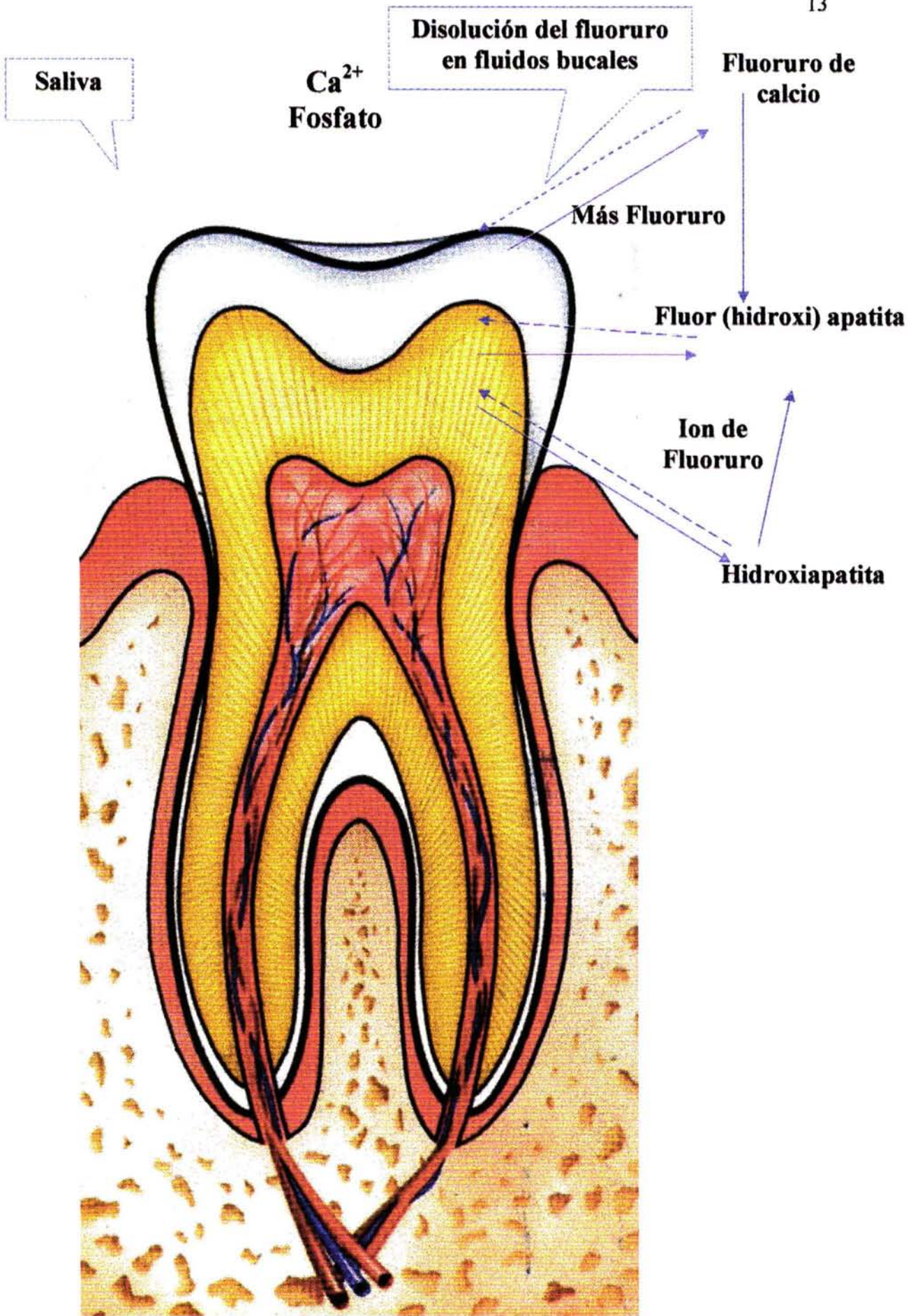


Fig. 1.4.2. Fluoruro de calcio en la saliva y en los fluidos bucales.

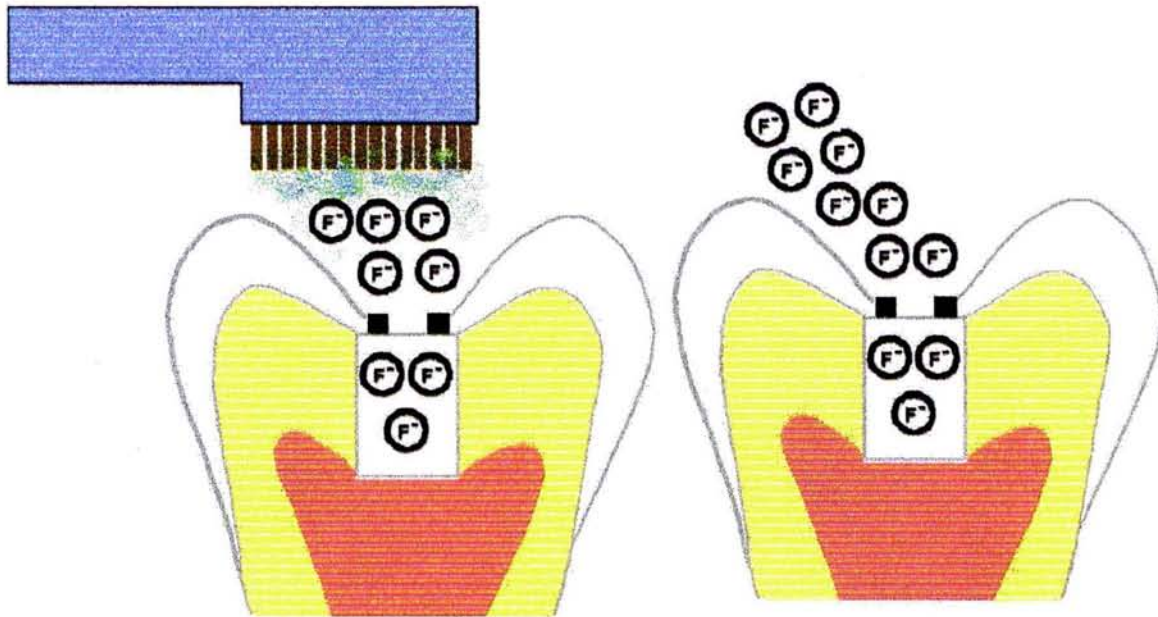
A.) Por inhibición sobre el ciclo glucolítico de las bacterias bucales, reduciendo la producción de ácidos desmineralizantes e interfiriendo con la regulación enzimática del metabolismo de los carbohidratos reduciendo el ácido glicólico y evitando así descensos del pH. El flúor puede inhibir las enzimas intracelulares (sobre todo la enolasa de la bacteria), produciendo una disminución de los productos metabólicos finales de la glucólisis como el ácido láctico ²⁵.

B.) El fluoruro ionizable tiene un enlace débil y puede ser liberado al disminuir el pH durante la formación de los azúcares ya que se encuentra presente en la placa dentó bacteriana quedando disponible para su incorporación a la hidroxiapatita del esmalte. Este efecto reduce la acumulación de polisacáridos intra y extracelulares importantes en los procesos de adherencia microbiana a la superficie dental, y acumulación de placa microbiana. Pero las dosis necesarias para producir estos efectos son bastante elevadas (Dibujo 2).

Por otro lado, estudios comparativos sobre la composición de la microbiota oral después de la administración de fluoruros ²⁶, a dosis normales no se han observado diferencias significativas en la reducción del número de microorganismos lo cual puede ser debido a una adaptación de estos al medio fluorado, pero si al emplear dosis muy elevadas (para las bacterias el fluoruro es tóxico en concentraciones elevadas). Disminución en la capacidad de la adherencia bacteriana a la superficie dental, pues disminuyen la formación de polisacáridos extracelulares, por lo que se cree que desempeñan un importante papel en la adhesión microbiana. Alteración de la cápsula bacteriana al inhibir las enzimas intracelulares, evitando la formación de ácidos y con ello, reduce la destrucción del esmalte. Disminución del paso de nutrientes. El flúor presente en saliva ²⁷ se encuentra como flúor iónico o ionizable y fácilmente difusible dentro de la placa dentobacteriana, la cual realiza una captación constante de éste.

EFFECTOS ADVERSOS PRODUCIDOS POR EL FLUORURO DE SODIO EN LA CAVIDAD BUCAL.

In vitro: Se ha reportado que, en células en cultivo provenientes de la cavidad bucal (células de los carrillos), la aplicación de este compuesto produce un aumento en la producción de interleucinas (1,6, y 8) además de una alteración a las membranas celulares, activación de leucocitos y macrófagos y un aumento en la producción de óxido nítrico (NO)^{27 Y 28}.



**Al usar una pasta dental con flúor.
F se recargan con iones de flúor**

Dibujo 2. Representación del intercambio iónico del fluoruro en el esmalte dental.

A – el medio de integración de fluoruro en el esmalte

B – intercambio iónico del fluoruro

RADICALES LIBRES.

En 1954, una investigadora argentina, la doctora Rebeca Gerschman, sugirió por primera vez que los radicales libres eran agentes tóxicos y generadores de enfermedades. De igual modo, describió a los radicales libres como "moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón impar en la orbita externa y una configuración espacial que genera una alta inestabilidad." ²⁹.

Definición de radical libre (RL): Es un átomo o molécula con uno o más electrones no apareados y por esto es susceptible de reaccionar con otras sustancias buscando su estabilidad. Esta podría lograrse bien con la pérdida del electrón (oxidación), con la ganancia de un segundo electrón (reducción) o mediante la unión a otra molécula no radical libre" ³⁰.

Los RL son moléculas extremadamente inestables y altamente reactivas al entrar en contacto con sustancias químicas inorgánicas u orgánicas (proteínas, lípidos, carbohidratos), en especial con moléculas clave de las membranas y con los ácidos nucleicos ³¹

Los RL remueven el electrón que les hace falta, de las moléculas que están a su alrededor para obtener su estabilidad. La molécula atacada (que ahora no tiene un electrón) se convierte entonces en un RL y de esta manera se inicia una reacción en cadena que dañará muchas células y puede ser indefinida si los antioxidantes no intervienen.

FORMACIÓN DE RL.

Los RL provienen de dos procesos llamados exógenos y endógenos:

A.) Factores endógenos: Los RL son generados *in vivo* en el ser humano a través de los procesos bioquímicos y fisiológicos normales del organismo como entes químicos resultantes del metabolismo de los alimentos, la respiración y el ejercicio. Todos estos RL provienen en su mayoría de la reducción univalente o parcial del oxígeno y de otras reacciones redox. Entre un 2% y 5% del O₂, genera RL y estos a su vez pueden oxidar diferentes componentes celulares afectando así la estructura y/o función celular. Los principales RL que produce el organismo son: anión superóxido (O₂⁻), peróxido

de hidrogeno ($H_2 O_2$) y radical hidroxilo (OH^*). Así, una vez formados los RL pueden atacar a cualquier molécula de nuestro organismo entre que los encontramos a los lípidos, proteínas, hidratos de carbono, ácidos nucleicos, entre otros y estos se encuentran tanto dentro como fuera de las células susceptibles a un continuo daño ocasionado por una alta elevación en la producción de radicales libres ³⁰.

B.) Factores exógenos: Diversos factores ambientales incrementan la producción de RL en diferentes sistemas biológicos tales como la contaminación industrial, el humo del tabaco, la absorción de energía radiante (por ejemplo luz ultravioleta y rayos x), el ozono, metales pesados, medicamentos, asbestos, los compuestos organoclorados, el metabolismo enzimático de sustancias químicas exógenas o fármacos que se introdujeron al organismo (como por ejemplo la producción de tricloruro de carbono a partir del tetracloruro de carbono que es metabolizado por el citocromo-P450), en los alimentos procesados y pesticidas solo por nombrar los más comunes de los contaminantes ambientales que causan intoxicaciones en seres humanos y cuyos mecanismos de acción sobre los sistemas biológicos involucran a los RL ³².

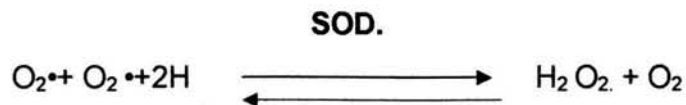
Dentro de los RL más dañinos y más importante generados tanto por factores endógenos como exógenos, tenemos al superóxido, al peróxido de hidrógeno y al radical hidroxilo.

El radical superóxido es generado dentro de la célula directamente durante la autooxidación en las mitocondrias pero también se forma en las reacciones enzimáticas que se encuentran en el citosol como es el caso de la enzima xantina oxidasa y en el retículo endoplásmico liso por acción del citocromo P- 450 y otras oxidasas que se encuentran en los peroxisomas ³³.

El proceso general de producción del radical superóxido por estos sistemas se ilustra como sigue:



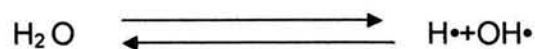
Una vez producido, el O_2 puede inactivarse de forma espontánea o, con mayor rapidez, por la enzima superóxido dismutasa (SOD) formando $H_2 O_2$.



El peróxido de hidrógeno es producido por la dismutación del O_2 como se acaba de ilustrar en la reacción anterior, sin embargo, también puede producirse directamente por las oxidasas presentes en los lisosomas (en muchas células hay organelos que contienen catalasa por ejemplo los peroxisomas).

Por su parte, los radicales hidroxilos se pueden generar por las siguientes reacciones:

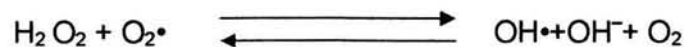
- 1.) La hidrólisis del agua causada por la radiación ionizante.



- 2.) La interacción con metales de transición (p.ej; hierro y cobre) en una reacción llamada de tipo Fenton.

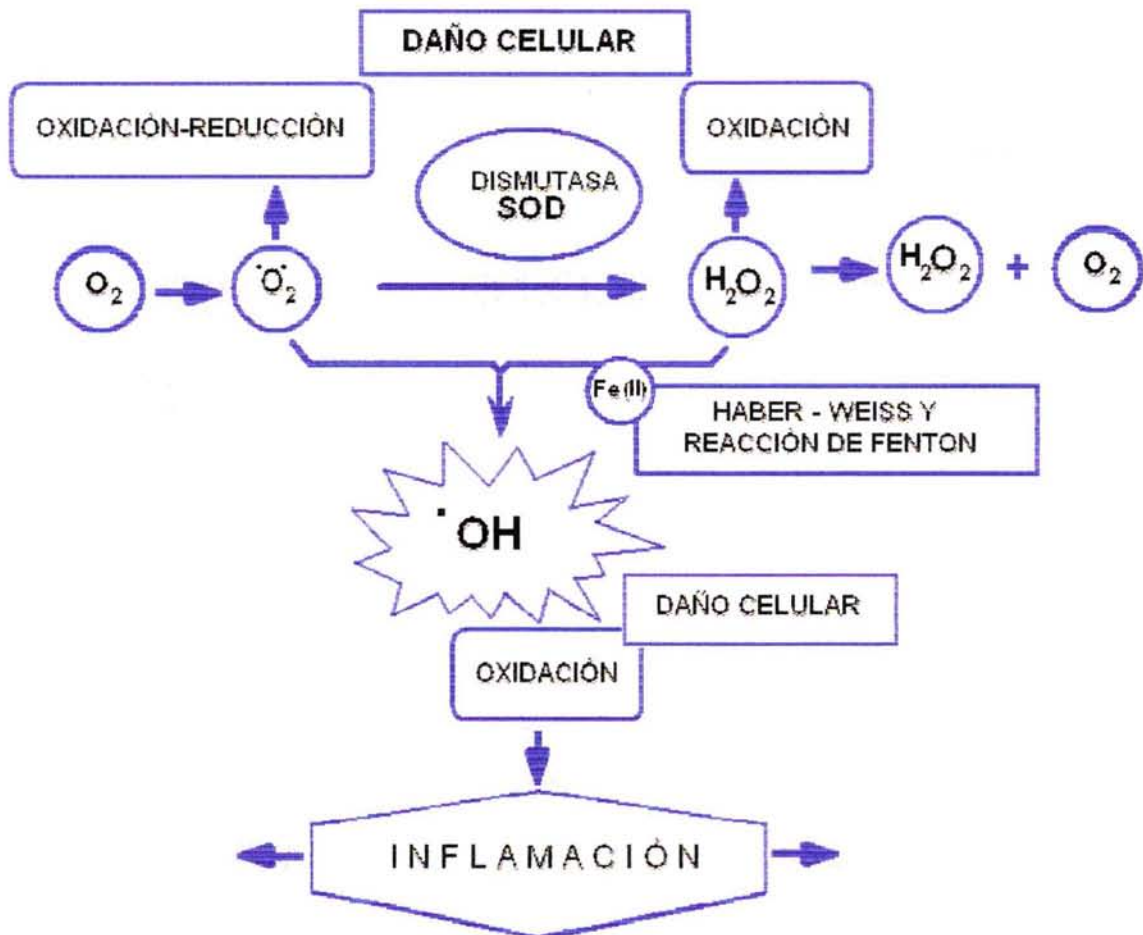


- 3.) A través de una reacción llamada del tipo Haber-Weiss.



DAÑO CELULAR INDUCIDA POR RADICALES LIBRES.

Una vez formados los RL, éstos pueden atacar a cualquier molécula de nuestro organismo tomando el electrón que le hace falta, especialmente de los lípidos, proteínas, hidratos de carbono y ácidos nucleicos. Los elementos anteriores son muy susceptibles al ataque por los RL ya que contienen dentro de su estructura molecular, dobles enlaces carbono-carbono que son altamente atractivos para los RL ³⁴(Dibujo 3).



Dibujo 3. Muestra el daño ocasionado por un radical libre que origina una reacción en cadena

El daño producido por los RL a las moléculas biológicas se describe a continuación:

A-) Lípidos: Son componentes fundamentales de las membranas intra y extracelulares. Este tipo de moléculas son las más sensibles al daño por exceso de RL, sobre todo los ácidos grasos de cadena insaturada que son los principales componentes de las membranas celulares. El daño a los ácidos grasos insaturados producidos por los RL se conoce como lipoperoxidación ³⁵. Las interacciones lípido-radical dan lugar a peróxidos, iniciando la subsiguiente reducción de otro ácido graso generando una reacción autocatalítica en cadena (denominada propagación) responsables de los efectos citotóxicos de los RL ³⁶.

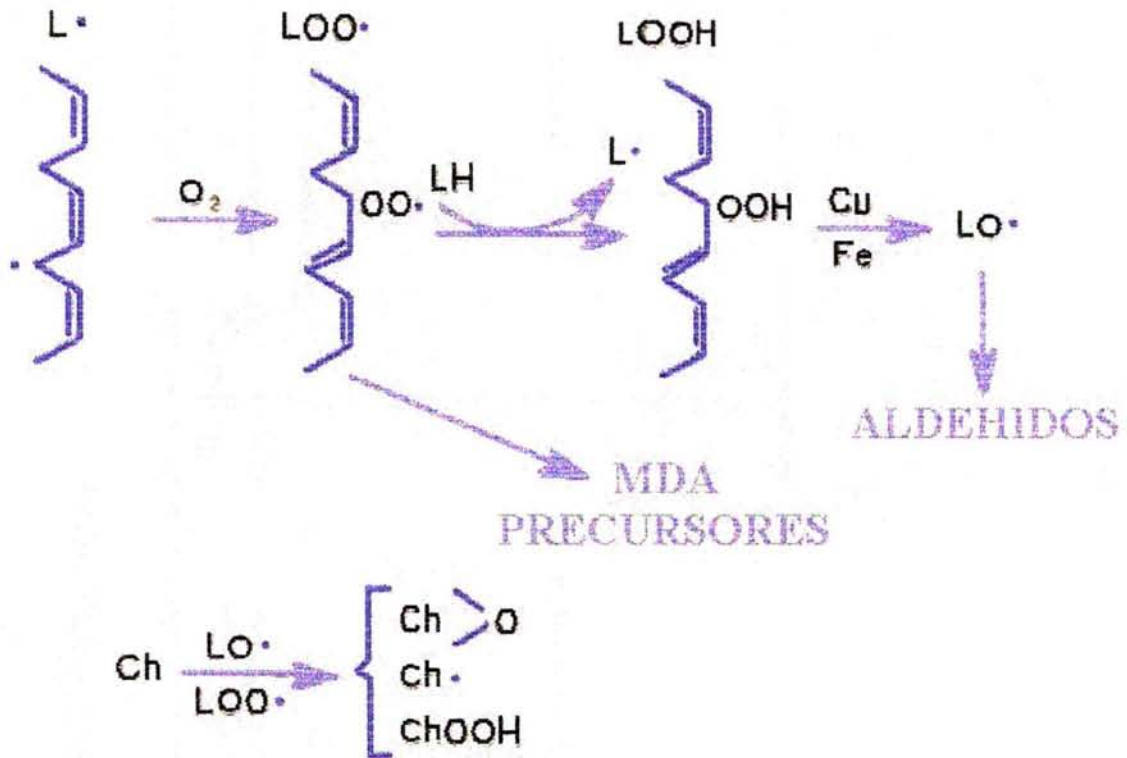
Los factores que influyen en la magnitud de la peroxidación lipídica son:

- A- La cantidad disponible de ácidos grasos poliinsaturados de la membrana celular
- B- La tensión de oxígeno
- C- La presencia de hierro.
- D- La activación y el contenido celular de antioxidantes que pueden terminar la reacción en cadena.

El producto final del proceso de la lipoperoxidación es una molécula llamada malondialdehído (MDA). El MDA es una molécula que se polimeriza consigo mismo y con otros productos de degradación formando un pigmento insoluble llamado lipofuscina que se acumula en algunos tejidos envejecidos. El medir la concentración del MDA ha sido considerado desde hace varias décadas como un marcador de la presencia de lipoperoxidación en los tejidos. Debido a que los RL atacan a las moléculas de su alrededor produciendo en ellos una peroxidación, el MDA es un producto de la degradación de la peroxidación en los tejidos.

El MDA puede ser detectado mediante su conjunción con dos moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) el cual da una coloración rosada al medio de reacción. El binomio MDA-TBA es soluble en solventes orgánicos y puede detectarse mediante un espectrofotómetro a 532nm. Para controlar los efectos potencialmente devastadores de la peroxidación lipídica, tanto en los seres humanos como en la naturaleza, usan los antioxidantes (Dibujo 4).

LIPOPEROXIDACIÓN



Dibujo 4. Efecto de la degradación de los ácidos grasos y los subproductos de la lipoperoxidación se encuentra el MDA

2.) Proteínas: Cuando un radical libre ataca a una proteína, hay oxidación de un grupo de aminoácidos como son la fenilalanina, tirosina, histidina y metionina; generando la formación de entrecruzamientos de cadenas peptídicas y formación de grupos carbonilos.

3.) Ácido desoxirribonucleico (DNA): Los RL también ejercen su acción sobre los ácidos nucleicos mediante la ruptura y alteración química de sus bases o por fenómenos de entrecruzamiento (Cross- Linking). Su acción sobre el ADN nuclear se ha relacionado con fenómenos de mutación, carcinogénesis, procesos auto inmunes mientras que su acción sobre el ADN mitocondrial se relaciona con enfermedades degenerativas ³⁷.

Los RL también pueden contribuir al crecimiento anormal de las células, al perder éstas la capacidad de "reconocer" las células vecinas. Esa proliferación sin control se produce en los tumores benignos o malignos (cáncer) ³⁸.

Muchas enfermedades crónicas se han ligado directamente con los radicales libres, como la enfermedad cardiovascular, Alzheimer accidente vascular cerebral, hepatitis, hipertensión, artritis reumatoide, lupus, diabetes mellitus, enfermedad periodontal, colitis ulcerativa, aterosclerosis, falla renal crónico y muchas otras ³⁹.

Los RL toman electrones de los lípidos y proteínas de la membrana celular que al ser dañada, no podrá cumplir sus funciones tales como el intercambio de nutrientes y la limpieza de materiales de deshecho haciendo imposible el proceso de regeneración y reproducción celular.

4.) Estrés Oxidativo: En los organismos aeróbicos la producción de RL derivados del oxígeno esta regulado por las defensa antioxidantes que este posee. Esta relación no siempre es perfecta ya que algunos RL producen daño a grandes moléculas que tienen que ser reparadas o reemplazadas. Cuando existe un desbalance entre la producción de RL y las defensas de la célula o del organismo, se dice que existe un estrés oxidativo que se caracteriza por un aumento importante en la producción de RL y una disminución de los mecanismos antioxidantes ⁴⁰.

El estrés oxidativo puede ser inducido en la célula o en el organismo por causas internas o externas. Dentro de las causas internas podemos mencionar

los mecanismos de envejecimiento y las alteraciones en el metabolismo intermedio. Dentro de las causas externas que producen estrés oxidativo podemos mencionar a los agentes físicos, químicos y biológicos, que afectan al organismo o la célula en general ³⁴. Una vez que la célula se encuentra en estrés oxidativo, se producen dentro de ésta alteraciones en el metabolismo intermedio energético así como daño a las macro moléculas que componen a la célula, lo que puede desencadenar en un daño mucho más severo que produzca la muerte de ella ⁴¹.

Como ejemplo de un estrés oxidativo controlado, tenemos el caso de los macrófagos del sistema inmune, los cuales crean RL para matar bacterias y virus, pero si no hay un control (ejercido por los antioxidantes) se produce un desbalance entre la producción de los RL y la capacidad de la célula de neutralizarlos mediante las enzimas antioxidantes por lo que se pueden dañar a las células vecinas, generando un aumento en la concentración en el estado estacionario de RL lo cual define una situación de estrés oxidativo.

EFFECTOS POSITIVOS DE LOS RADICALES LIBRES EN EL SER HUMANO.

Los RL han sido implicados en un sin número de procesos normales y naturales en los seres vivos ⁴². Particularmente en el humano, se ha visto que están involucrados en los siguientes procesos:

1. Acción sobre los lípidos activando la síntesis del ciclo de formación de prostaglandinas y leucotrienos
2. Participan en las reacciones de la respiración mitocondrial
3. Reacciones de detoxificación microsomal (ingesta de barbitúricos).
4. Participación en el fenómeno de la fagocitosis.

MECANISMOS ANTIOXIDANTES.

Los antioxidantes son sustancias que tienen la capacidad de inhibir la oxidación causada por los RL ya que son capaces de atrapar al electrón desapareado que este tipo de especies tiene. Unos actúan a nivel intracelular y otros en la membrana de las células, siempre en conjunto para proteger a los diferentes órganos y sistemas del ataque de los RL y potenciando ciertos sistemas de enzimas y antioxidantes naturales obtenidos en la dieta o bien administrados como fármacos ³⁹.

Los sistemas antioxidantes están divididos en varios grupos, según su origen en exógenos, endógenos y no enzimáticos y se ilustran en la (Tabla 2). En esta clasificación se incluyen sustancias con grupos sulfidrilos o tioles de tipo de la N-acetil-cisteína (NAC), los cuales tienen un efecto barredor directo y son potenciadores de la síntesis de otros sistemas antioxidantes. Por otro lado, en la (Tabla 3) se ilustra la clasificación de los antioxidantes de acuerdo al sitio en donde ejercen su acción antioxidante.

Por otro lado, ³¹ clasifican a los antioxidantes de la siguiente forma:

1. Enzimas antioxidantes: Su mecanismo de acción consiste en reaccionar catalíticamente con el RL y transformarlo en una especie menos reactiva o neutral. Como ejemplos más importantes tenemos a las enzimas superóxido dismutasa y a la catalasa. Esta última ejerce una dual función como mediador para eliminar a los RL. La descomposición de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) utilizando, como mediador a la enzima catalasa, el cual se rompe y nos da como resultado agua (H_2O) y oxígeno (O_2) ³⁹.

La predisposición para activar la reacción de la enzima catalasa depende de la concentración de hidrógenos donadores, o bien del constante estado de la concentración o de la velocidad de producción de H_2O_2 en el sistema. En ambos casos la actividad de la catalasa- H_2O_2 . Complejo I se forma primero por la descomposición de dos moléculas peróxido de hidrógeno (H_2O_2), en el cual la segunda molécula de H_2O_2 sirve como hidrogeno donador del complejo ⁴³. La descomposición de peróxido de hidrogeno (H_2O_2), en el cual la segunda molécula de H_2O_2 sirve como hidrogeno donador del complejo I, es un proceso extremadamente rápido (a una velocidad constante $k = 10^7 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$) la reacción peroxidativa procede relativamente despacio ($k = 10^2 - 10^3$). La cinética de la catalasa no obedece el normal patrón, sin embargo no es posible saturar la enzima con sustrato, por lo tanto la velocidad de la concentración es factible (up de $5\mu - H_2O_2$), y sobre la otra reacción hay una rápida inactivación de catalasa de la concentración por arriba de 0.1 M, cuando se activa la enzima H_2O_2 del complejo I, se convierte e inactiva por el complejo II o III ⁴⁴.

Tabla 2. Clasificación de los antioxidantes, según origen

Origen	Acción
1. Exógenos	
Vitamina E	- Neutraliza al oxígeno singulete
	- Captura radicales libres hidroxilo
	- Captura O ₂
	- Neutraliza peróxidos
Vitamina C	- Neutraliza al oxígeno singulete
	- Captura radicales libres de hidroxilo
	- Captura O ₂
	- Regenera la forma oxidada de la vitamina E
Betacarotenos	Neutraliza al oxígeno singulete
Flavonoides, Licopenos	
2. Endógenos	
Enzimáticos	Cofactor
Superóxido dismutasa (SOD)	Cobre, sodio, manganeso
Catalasa (CAT)	Hierro
Glutación peroxidasa (GPx)	Selenio
3. No enzimáticos	
Glutación	Barreras fisiológicas que enfrenta el oxígeno a su paso desde el aire hasta las células
Ácido Tioctico	Transportadores de metales (transferrina y ceruloplasmina)

Tabla 3. Clasificación de los antioxidantes según el sitio donde ejercen su acción

Intracelular	Membrana	Extracelular
Superóxido dismutasa	Vitamina E	Ceruloplasmina
Catalasa	Betacarotenos	Transferinas
Peroxidasa	Ubiquinol-10	Lactoferrinas
DT-deafarasa		Albúminas
GSH		Haptoglobinas
Proteínas que ligan metales		Vitamina C
Sistemas proteolíticos		Ácido úrico
Vitamina C		Vitamina E

2. Proteínas que contienen a un metal de transición: Su mecanismo de acción consiste en disminuir la cantidad del metal transición y atraparlo (acción quelante) para que no reaccione con los RL y como ejemplo tenemos a: las proteínas de tipo hemo (citocromos y hemoglobina), Haptoglobulinas, metalotioneinas y ceruloplasmina.

3. Proteínas que protegen a las biomoléculas: Su mecanismo de acción consiste en unirse a proteínas y a los ácidos nucleicos para evitar que pierdan su actividad o su configuración terciaria y como ejemplo tenemos a las proteínas de tipo Heat Shock.

4. Agentes antioxidantes de bajo peso molecular: Su mecanismo de acción es variado, hablando químicamente es que con mayor frecuencia se combina con los RL neutralizándolo o convirtiéndose ellos mismos en un radical más estable. Como ejemplo de dichas sustancias tenemos a las vitaminas (A, C y E), el glutatión, la bilirrubina y al ácido úrico³¹.

EL NaF Y LA PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES EN LA MUCOSA BUCAL

Tal como se ha mencionado en párrafos anteriores, el NaF es uno de los principales componentes de los productos dentales usados a nivel comercial y por los odontólogos. Como también ya se ha mencionado, esta molécula ejerce efectos importantes sobre el tejido dentarios, principalmente como un componente del esmalte dental lo que lo hace mas resistente a la acción bacteriana y por tanto, a la caries⁴⁵. Sin embargo, no se conocen efectos adversos que pudiese tener esta molécula sobre las células que componen a la mucosa bucal⁴⁶. Debido a que la concentración de fluoruro en los diferentes tejidos luego de su absorción, depende de la ingesta y depuración plasmática. Este equilibrio es posible ya que el fluoruro no se encuentra unido a proteínas en el plasma y su difusión a través de las diferentes membranas es dependiente de gradientes de pH. Lo anterior no determina concentraciones de saturación en los diferentes compartimientos celulares, puesto que el organismo humano no cuenta con mecanismos de regulación hemostática de

fluoruro. Esta molécula no ionizada al ser ingerida posiblemente este alterando y modificando las funciones celulares de la mucosa bucal que se induzca a la producción de RL. Destacando como indicadores de referencia de la presencia de los RL al MDA y a la enzima catalasa ⁴⁷.

La producción de RL ocurre como un subproducto del metabolismo oxidativo celular normal ⁴⁸, y la mucosa bucal, como todos los demás tejidos del organismo que realiza la respiración metabólica, induciendo así la activación de los RL sobre los lípidos de la célula. Esta generación es conocida como lipoperoxidación y de esta manera ha sido señalada como un monitor de la presencia de RL sobre la célula. Sin embargo, de igual forma, la ingesta de NaF posiblemente estaría alterando la producción del peróxido de hidrógeno en el peroxisoma de la célula; a su vez, el peróxido de hidrógeno puede reaccionar en la presencia del hierro (en un sistema tipo Fenton o Haber- Weiss), y contribuir a la generación de RL altamente tóxicos para la célula. Esta alteración sería mediada por la vía de la catalasa ⁴⁹.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Es reconocido que la declinación de las caries a nivel mundial se ha producido gracias a la introducción de los fluoruros, especialmente fluoruro de sodio (NaF) como elemento preventivo el cual es considerado como una de las medidas de salud pública más impactantes del siglo. Sin embargo, en la actualidad ninguna teoría explica en forma adecuada por sí misma, todos los fenómenos biológicos y/o fisiológicos que el NaF pudiese ocasionar en el ser humano

Por otro lado, se desconocen los efectos que puede provocar el NaF sobre los tejidos blandos (especialmente, la mucosa bucal), ya que los estudios realizados en la actualidad sobre este compuesto, no han contemplado los probables efectos colaterales que ésta molécula pudiera tener sobre la mucosa bucal ya que hablando químicamente, el NaF es un producto químico altamente reactivo el cual constituye el principal elemento contenido en las pastas dentales y enjuagues bucales que han sido utilizadas en la prevención de la caries dental.

Por lo escrito anteriormente, este estudio pretende registrar los probables efectos colaterales que el NaF pudiese tener sobre la mucosa bucal en ratas tratadas con este compuesto, determinando dicho daño mediante la determinación de la concentración de malondialdehído como un indicador de la presencia de radicales libres derivados del oxígeno (RL) y la determinación de la actividad específica de la enzima catalasa.

JUSTIFICACIÓN.

Los problemas en la actualidad a los que se han enfrentado México y otros países latinoamericanos en cuanto a salud dental, es la distribución hegemónica de la caries. El problema de la caries dental requiere de amplios programas preventivos que incluyen, entre otras cosas, el uso adecuado de productos que tienen como base activa al NaF. Esta molécula es el compuesto fluorado más frecuentemente agregado a los productos de uso dental (pastas, geles, enjuagues) ya que presenta una gran facilidad de manejo; se incorpora rápidamente al tejido dentario y tiene un bajo costo.

Durante el proceso de la limpieza dental hecha con productos que contienen como agente principal al NaF, resultan evidentes que pueden existir cambios metabólicos del tejido dentario, en especial, de la mucosa bucal y que no han sido estudiados con precisión, dado el efecto excepcionalmente benéfico del NaF sobre el esmalte. Es evidente que la absorción de NaF a nivel sistémico requiere un gran gasto de energía, ajustes en el metabolismo y en el pH que proporcionen las condiciones adecuadas para la absorción del NaF por el diente y así, prevenir a la caries.

A su vez el NaF, como molécula, presenta una alta reactividad que pudiese dañar a los tejidos, sin embargo se ha dejado a un lado el posible efecto que este compuesto pueda provocar en la mucosa bucal por lo que los probables mecanismos de daño por la ingesta de NaF sobre estos tejidos no se conocen. Estudios encaminados a dilucidar estos mecanismos de daño ayudarían a entender los mecanismos fisio-patológicos que pudiese presentar el tejido dental y en especial, la mucosa bucal en los sujetos que usan productos químicos que tienen como base al NaF, tales como son las pastas, geles y enjuagues bucales.

HIPOTESIS.

La ingesta del fluoruro de sodio inducirá la generación de radicales libres derivados del oxígeno, provocando un daño que se refleje en la mucosa bucal de la rata; utilizando como indicadores de dicho daño la determinación de la concentración de malondialdehído (MDA) y la actividad específica de la enzima catalasa.

La determinación de dichos parámetros pudiesen ser un reflejo del daño a la mucosa bucal provocado por los radicales libres derivados del oxígeno inducido por la presencia del fluoruro de sodio.

HIPOTESIS NULA

Que el fluoruro de sodio no este involucrado con la generación de radicales libres ocasionando daño sobre la mucosa bucal y por lo tanto, no se observen cambios en la concentración del malondialdehído ni en la actividad de la enzima catalasa en la mucosa bucal de la rata.

OBJETIVO GENERAL.

Evaluar mediante la determinación de las variaciones en la concentración de malondialdehído y de la actividad específica de la enzima catalasa, el daño producido por radicales libres derivados del oxígeno, a la mucosa bucal en ratas hembras y machos sometidos a una ingesta de dos distintas dosis de fluoruro de sodio por cuatro semanas.

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

1. Determinar la concentración de malondialdehído en la mucosa bucal de ratas hembras y machos tratados con dos dosis de NaF por cuatro semanas.
2. Determinar la actividad específica de la enzima catalasa en la mucosa bucal de ratas hembras y machos tratados con dos dosis de NaF por cuatro semanas.
3. Evaluar si la concentración de malondialdehído presenta variaciones a lo largo del tiempo en el grupo de la ratas hembras tratadas con dos dosis distintas de fluoruro de sodio
4. Evaluar si la concentración de malondialdehído presenta variaciones a lo largo del tiempo en el grupo de la ratas machos tratadas con dos dosis distintas de fluoruro de sodio
5. Evaluar si existen variaciones en la actividad específica de la enzima catalasa en la mucosa bucal de ratas hembras tratadas con dos dosis distintas de fluoruro de sodio.
6. Evaluar si existen variaciones en la actividad específica de la enzima catalasa en la mucosa bucal de ratas machos tratadas con dos dosis distintas de fluoruro de sodio.
7. Comparar las concentraciones de malondialdehído obtenidas tanto de las ratas hembras como de las ratas machos a las dos dosis de tratamiento con fluoruro de sodio para evaluar sus probables similitudes o diferencias entre sexos.
8. Comparar las actividades específicas de la enzima catalasa obtenidas tanto de las ratas hembras como de las ratas machos a las dos dosis de

tratamiento con fluoruro de sodio para evaluar sus probables similitudes o diferencias entre sexos.

9. Correlacionar los resultados obtenidos tanto con el MDA y la catalasa para evaluar si los efectos observados con estos dos parámetros se traducen como daño a la mucosa oral provocado por el fluoruro de sodio.
10. Evaluar si dichos daños son dependientes del sexo de la rata.

DISEÑO Y DURACIÓN.

El protocolo de estudio se realizó en un período de 10 meses, repartido en bimestres, siendo el cronograma de actividades el siguiente:

Durante el primero bimestre se realizó una revisión bibliográfica meticulosa sobre el tema relacionado con el NaF y sus efectos en la cavidad bucal para establecer las bases de nuestro conocimiento en el tema de estudio a través de artículos publicados en revistas de investigación. Por otra parte, durante este tiempo se estandarizaron cada una de las técnicas bioquímicas empleadas en este estudio.

Durante el segundo bimestre se obtuvieron las ratas (hembras y machos) y se procedió a distribuir las en dos grupos generales que fueron el control y el experimental. El grupo experimental recibió un tratamiento con NaF por disolución en agua de 1 ó 50 ppm. También durante este período, se obtuvieron las muestras semanales de mucosa bucal de estos grupos en estudio

Durante el tercer bimestre se analizaron las muestras de mucosa bucal del modelo experimental así como del grupo control. El análisis incluyó la determinación de la cantidad de proteína total así como la determinación de la concentración de malondialdehído (MDA) de acuerdo a la técnica descrita en el inciso correspondiente en material y métodos para cada una de las muestras obtenidas.

Durante el cuarto bimestre se determinó la actividad de la enzima catalasa en las muestras obtenidas de la mucosa del grupo experimental y del grupo control.

Durante el quinto bimestre se procedió a redactar y analizar los resultados obtenidos, así como también, se discutieron los mismos para la elaboración de la tesis correspondiente.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Para este estudio, se utilizaron reactivos químicos de las siguientes marcas comerciales: Amersham Biosciences, Sigma, J T Baker, Mallinckrodt, Fluka. Todos ellos fueron de la mejor calidad disponible y fueron usados en las cantidades y proporciones señaladas en las técnicas. Por otro lado, en la siguiente tabla se enumeran tanto los reactivos como los materiales y equipos de laboratorio usados.

Reactivos	Material	Equipo
Cloruro de sodio	Equipo de disección Probetas graduadas	Sistema potter con cabezal de porcelana y taladro
Solución amortiguadora de fosfatos (PBS).	Vasos de precipitado Matraces Erlenmeyer	Agitador orbital y de cabezal tipo Vortex- Genie.
Ácido acético	Tubos de ensaye	Sonicador Fisher- Scientific Mod. 3200
Cloruro de potasio	Tubos eppendorf	Medidor de pH marca Fisher-Scientific, Mod. 3M
Butanol	gradillas	Baño maría (Thermomix)
piridina		Centrifuga clínica
OPD (o- fenilendiamina dihidroclororidica)	Pipetas Pasteur de tallo corto y largo	
Peróxido de hidrógeno	Pipetas serológicas graduadas	Espectrofotómetro (Helios Unicam)
ácido tiobarbitúrico	Cubetas de cuarzo	Micropipetas automáticas de diversas capacidades
Reactivo de Folin- Ciocalteus		
Albúmina bovina		
Carbonato de sodio		
Bicarbonato de Sodio		
Hidróxido de Sodio		
Fluoruro de sodio		
Hidróxido de Potasio		
Agua bidestilada		

PROCEDIMIENTO GENERAL: Se realizó un estudio longitudinal, prospectivo, experimental y comparativo empleando 108 ratas de la cepa Wistar (300 g de peso promedio corporal), divididas en dos grupos acorde al sexo correspondiendo al 50% (54) para ratas hembras y 50% (54) de ratas machos. Los animales fueron proporcionados por el bioterio de la FES-Iztacala (UNAM) y fueron alimentados corrientemente con croquetas (Purina de México S A) y agua *ad libitum*⁵⁰.

Las ratas fueron divididas en los siguientes grupos de estudio:

1.-) Grupo control: Consta de 36 animales divididos por sexo (18 hembras y 18 machos) a los cuales únicamente se les conservó en las condiciones estándar de alimentación y toma de agua *ad libitum*.

2.-) Grupo experimental. Este grupo fue dividido a su vez en dos subgrupos a los cuales se les trató con dos distintas concentraciones de NaF teniendo 36 animales en cada grupo divididos por sexo en 18 hembras y 18 machos. Los grupos tuvieron un tratamiento con 1ppm ó 50ppm de NaF disuelto en el agua de bebida corriente además de su alimento normal.

Todos los grupos anteriormente descritos fueron tratados por espacio de cuatro semanas. Una vez iniciado el esquema de tratamiento, fueron sacrificadas por grupos homogéneos (controles y experimentales) cada siete días hasta completar el tiempo descrito.

Criterios de inclusión:

1. Ratas de la cepa Wistar con un tamaño y peso promedio de 300g
2. Igual número de especies de acuerdo al sexo (machos y hembras).
3. Ratas que al momento de iniciar el esquema de tratamiento experimental estén aparentemente sanas.

Criterios de exclusión:

1. Ratas que no sean de la cepa requerida
2. Ratas que no tengan el tamaño y peso promedio requerido
3. Ratas que presenten algún tipo de enfermedad antes de iniciar el esquema de tratamiento.
4. Ratas que presenten algún defecto físico visible.

Criterios de eliminación

1. Ratas que se lleguen a morir durante el tiempo que dure el tratamiento
2. Ratas que presenten algún tipo de enfermedad sistémica o local no atribuible al tratamiento

Aspectos de ética y bioseguridad

El manejo de las ratas y de las muestras biológicas se llevo a cabo de acuerdo con los criterios, normas y reglas establecidas dentro de la FES-Iztacala para el uso, manejo y disposición de animales de laboratorio que están acorde con las normas internacionales para el uso de animales de experimentación.

OBTENCIÓN DEL TEJIDO BUCAL

Una vez que las ratas cumplían con el esquema de tratamiento, fueron sacrificadas semanalmente para obtener mediante disección dirigida, la mucosa bucal. Brevemente, las ratas (machos y hembras; controles y experimentales) fueron sacrificadas por decapitación, obteniendo la cabeza de donde se obtuvo la mucosa bucal. La mucosa bucal (consistente en paladar duro, paladar blando, mucosa yugal, piso de la boca y las encías) fue obtenida y colocada en una solución de cloruro de sodio (NaCl) isotónico frío para ser lavada dos veces. Una vez limpia, la mucosa fue homogenizada (usando un sistema de potter con cabezal de porcelana hendido) en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) fría. Posteriormente, el homogenizado fue sometido a tres períodos de sonicación (de 10 segundos cada uno a 150 mHz) para disociar aún mas al tejido. El resultado fue centrifugado a 3500 rpm a 4°C por 15 minutos al término de los cuales, se tomo el sobrenadante el cual fue alicuotado y se utilizo para la determinación de la concentración total de proteína ⁵¹; la determinación de la concentración de MDA ³⁶ y la actividad de la enzima catalasa ⁵²

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE MALONDIALDEHÍDO

La determinación de la concentración del malondialdehído (MDA) como reflejo de la peroxidación de lípidos se llevó a cabo mediante la técnica de

Gutterige ³⁶ como se describe a continuación: Las muestras (100 mg) de extracto total de mucosa bucal se le agrego 1.5 ml de ácido acético (3%), 1.5 ml de ácido tiobarbitúrico (0.8%) y se agito en vortex. Se le coloco un tapón a cada una de las muestras y se incubo durante 30 minutos a temperatura de ebullición (94°C) en un baño maría (Thermomix 1420). Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las muestras fueron sacadas y enfriadas en hielo picado y/o al chorro del agua durante 5 min para, posteriormente agregarles 1 ml de KCL (2%) y 3 ml de butanol/piridina (10/1 v/v) y se agito en vortex. A continuación se centrifugo en una centrifuga clínica durante 15 minutos a 3000 rpm, y el sobrenadante fue retirado con la ayuda de una pipeta Pasteur y se colocó en una cubeta de cuarzo para leer su absorbancia a 532 nm en un espectrofotómetro (Helios UNICAM). La concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (MDA) fue expresada como nano moles por miligramo de proteína (nmoles/mg de prot).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA ENZIMA CATALASA.

El mejor método para determinar la actividad de la enzima catalasa es por medio de la técnica descrita por Aeby ⁵². Brevemente, esta técnica consistió en lo siguiente: A una muestra (100 mg) de mucosa bucal ya sea control o experimental, se le agregó 2 ml de una solución amortiguadora de fosfatos (PBS, pH 7.4) y OPD (o-fenilendiamina dihidroclorídica; 0.005 M), se agito en vortex y se dejo incubar durante 3 minutos, después del tiempo transcurrido se leyó a 492 nm (tiempo cero), posteriormente se procedió a dispar la reacción con 0.1 ml de peroxido de hidrogeno (300 mM), se agito en vortex y se dejo incubar durante 15 minutos al termino de los cuales, se procedió a realizar nueva lectura a en cada una de las muestras. Los resultados son expresados como mili mol de peroxido de hidrógeno eliminado sobre minuto sobre miligramo de proteína.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los datos fueron analizados por el programa Excel para Microsoft (versión 5.0), se calculó la media y la desviación estándar en cada uno de los grupo de acuerdo al sexo de las ratas. La comparación entre los grupos control y el grupo experimental fueron llevados acabo usando la prueba de *t* de student para las muestras pareadas. Todos los valores son expresados como promedio más menos error estándar, tomando en cuenta una ($p < 0.05$).

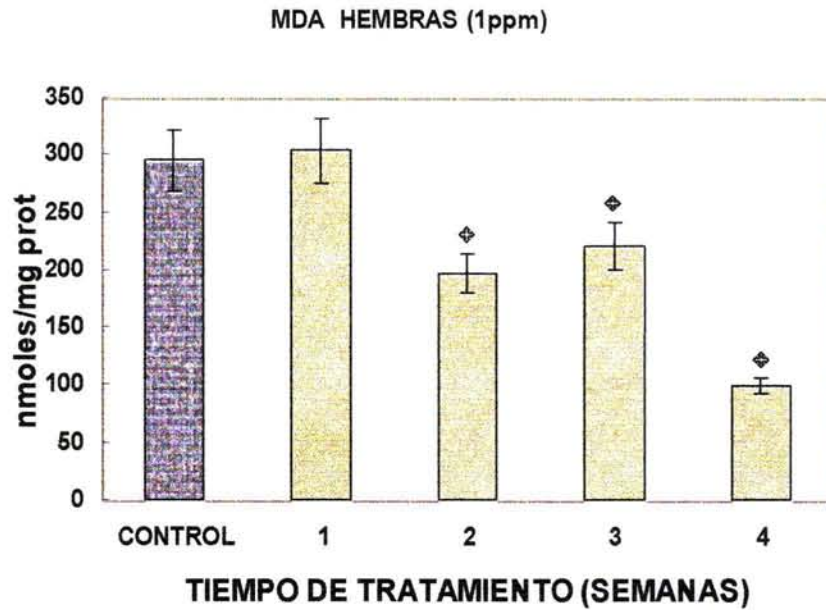
RESULTADOS.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran en general que la concentración de MDA y la actividad de la enzima catalasa en la mucosa bucal de las ratas hembras y machos, tratados con dos diferentes dosis de NaF (1 y 50 ppm), varían a lo largo de cuatro semanas de tratamiento.

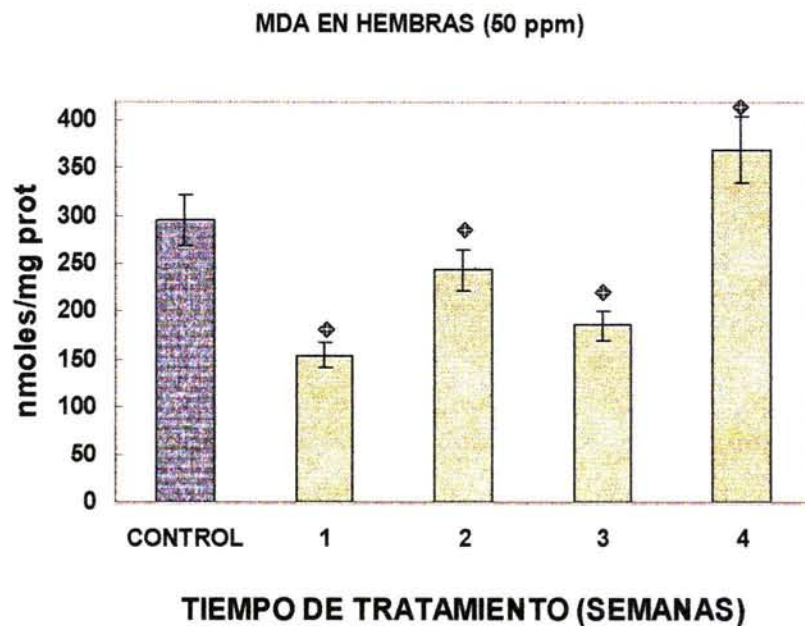
Concentración de malondialdehído.

El malondialdehído es un indicador de la presencia de radicales libres en los tejidos ya que es un derivado directo de la lipoperoxidación de los ácidos grasos que componen a las membranas celulares. De esta forma, en nuestro estudio determinamos las concentraciones de ese metabolito como un indicador del daño producido a los tejidos por la presencia de los radicales libres derivados del oxígeno.

En la Gráfica 1 se observa que la concentración de MDA determinada en el grupo de ratas hembras con un tratamiento de NaF de 1 ppm por un período de cuatro semanas, presentan los siguientes cambios: En la primera semana de tratamiento, no se presentó ningún cambio significativo con respecto al grupo control en la concentración del MDA. Por el contrario, a partir de la segunda semana, disminuyó la concentración de MDA en un rango que va de 75 a 200 nmoles por miligramo de proteína, que se observa hasta el término del tratamiento. En la Gráfica 2 se muestra el curso temporal de la concentración de MDA determinada en el grupo de ratas hembras con un tratamiento de NaF de 50 ppm presentándose de la primera a la tercera semana de tratamiento una disminución estadísticamente significativa en la concentración de MDA que oscila entre 150 a 290 nmoles por miligramo de proteína en comparación con el grupo control. Por otro lado, cabe destacar que en la cuarta semana de tratamiento se presentó un incremento estadísticamente significativo en la concentración del MDA (de 75 nmoles por miligramo de proteína con respecto al grupo control) tal como se puede apreciar en la gráfica. La Gráfica 3 muestra la comparación de la concentración de MDA en los dos grupos de ratas hembras, aquellas que recibieron 1 y 50 ppm de NaF, respectivamente (de acuerdo a las gráficas 1 y 2). Como puede observarse, existen diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos a lo largo del tiempo; pero sin un patrón definido.

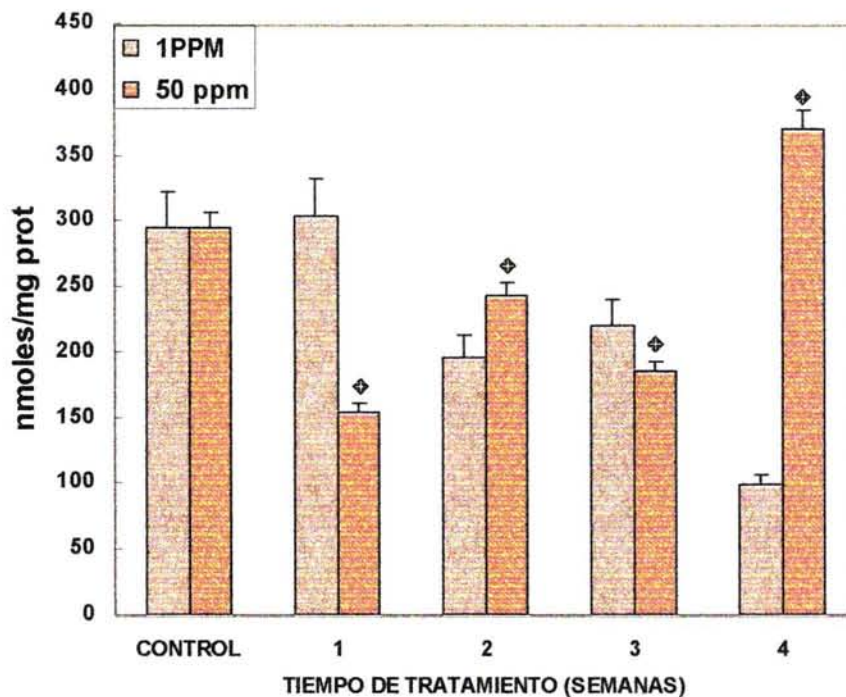


GRAFICA 1: Concentración de MDA en mucosa bucal en ratas hembra tratadas con NaF a una concentración de 1 ppm. Las barras representan la concentración de MDA (nmoles/mg prot +/- error estándar) tanto del grupo control (barra azul) como del grupo experimental (barras color hueso). El asterisco representa una diferencia estadísticamente significativa contra el grupo control ($p < 0.05$).



GRAFICA 2: Concentración de MDA en mucosa bucal en ratas hembra tratadas con NaF a una concentración de 50 ppm. Las barras representan la concentración de MDA (nmoles/mg prot +/- error estándar) tanto del grupo control (barra azul) como del grupo experimental (barras color hueso). El asterisco representa una diferencia estadísticamente significativa contra el grupo control ($p < 0.05$).

COMPARACIÓN DE LA CONCENTRACION DE MDA EN
HEMBRAS (1ppm y 50 ppm de NaF)



GRAFICA 3: Comparación entre las concentraciones de MDA en mucosa bucal en el grupo de ratas hembras que fueron tratadas ya sea con 1 ó 50 ppm de NaF. Las barras representan la concentración de MDA (nmoles/mg prot +/- error estándar) tanto de una dosis de 1 (barras rosas) como de 50 (barras color mamey) ppm del grupo de ratas hembras. El asterisco representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre el grupo que recibió 50 ppm de NaF, en contra del grupo que recibió 1 ppm de NaF.

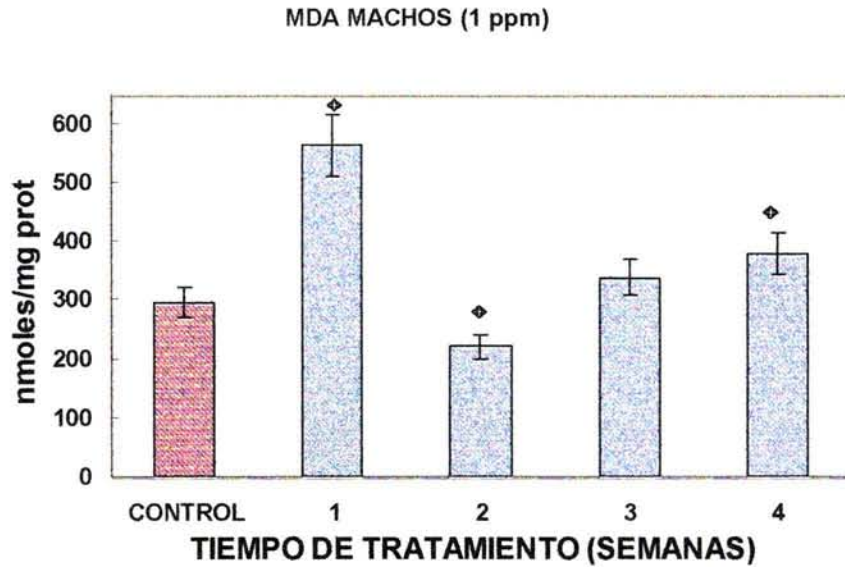
Al respecto, las diferencias más importantes fueron en la primera y cuarta semana de tratamiento en donde existe una disminución importante en la primera semana en el grupo con 50 ppm; en contraparte, a la cuarta semana existe el incremento en el grupo con 50 ppm y un descenso en el grupo que recibió 1 ppm.

Nuestro segundo grupo de estudio fue el de las ratas machos donde se evaluó la concentración de MDA que fueron tratadas con 1 y 50 ppm de NaF esto se ejemplifica en las gráficas 4 a la 6.

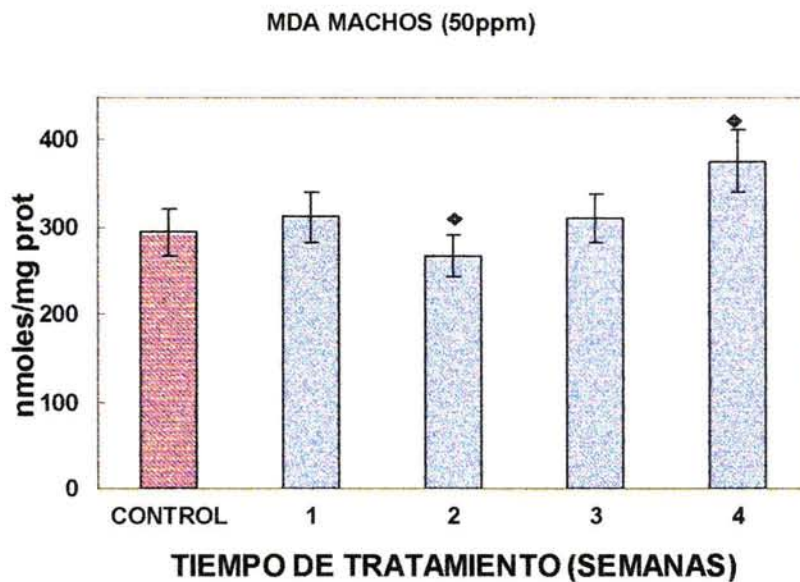
Durante el tratamiento con NaF de 1 ppm se determinó la concentración de MDA la cual se observa en la Gráfica 4, originándose en la primera semana un aumento estadísticamente significativo en la concentración de MDA con respecto al grupo control. Cabe destacar la segunda semana de tratamiento ya que existió una disminución estadísticamente significativa de 90 nmoles por miligramo de proteína en comparación con el grupo control. A partir de esta misma semana se mostró un incremento gradual en la concentración de este metabolito hasta finalizar el tratamiento. Los resultados del grupo tratado con NaF de 50 ppm; se representan en la Gráfica 5, en la primera semana de tratamiento no existió ningún cambio significativo con respecto al grupo control; sin embargo, a partir de la segunda semana se presentó una disminución en la concentración de MDA, para, progresivamente, incrementarse hasta la cuarta semana. Se muestra en la Gráfica 6 la comparación entre los dos grupos de estudio descritos en las gráficas 4 y 5 respectivamente. Como puede observarse, la concentración de MDA disminuye a partir de la segunda semana de tratamiento en ambos grupos (grupo con 1 y 50 ppm de tratamiento con NaF, respectivamente), para, gradualmente incrementarse. Por otro lado, en la primera semana de tratamiento, es en donde se observan las diferencias más importantes entre ambos grupos, siendo el que fue tratado con 1 ppm de NaF el que presenta un incremento importante en la concentración del MDA.

Actividad específica de la enzima catalasa.

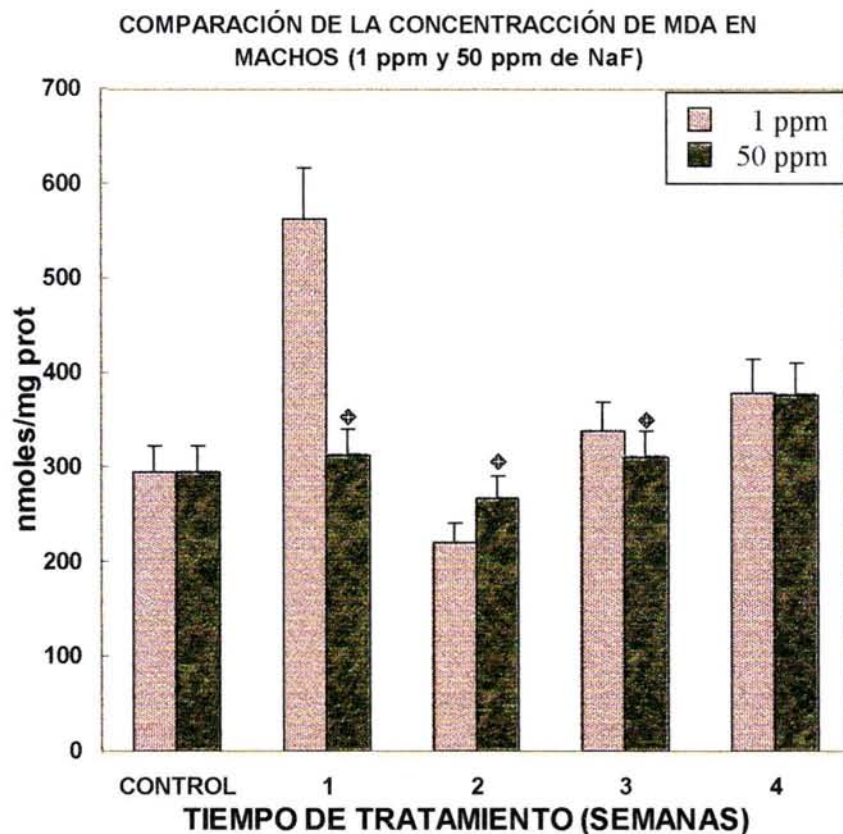
La catalasa es una enzima presente en todos los tejidos y se ha comprobado que su actividad específica se modifica por la presencia de peróxido de hidrógeno el cual es producido por los radicales libres derivados del oxígeno.



GRAFICA 4: Concentración de MDA en mucosa bucal en ratas macho tratadas con NaF a una concentración de 1 ppm. Las barras representan la concentración de MDA (nmoles/mg prot +/-error estándar) tanto del grupo control (barra rosa) como del grupo experimental (barras azules). El asterisco representa una diferencia estadísticamente significativa en contra del grupo control ($p < 0.05$).



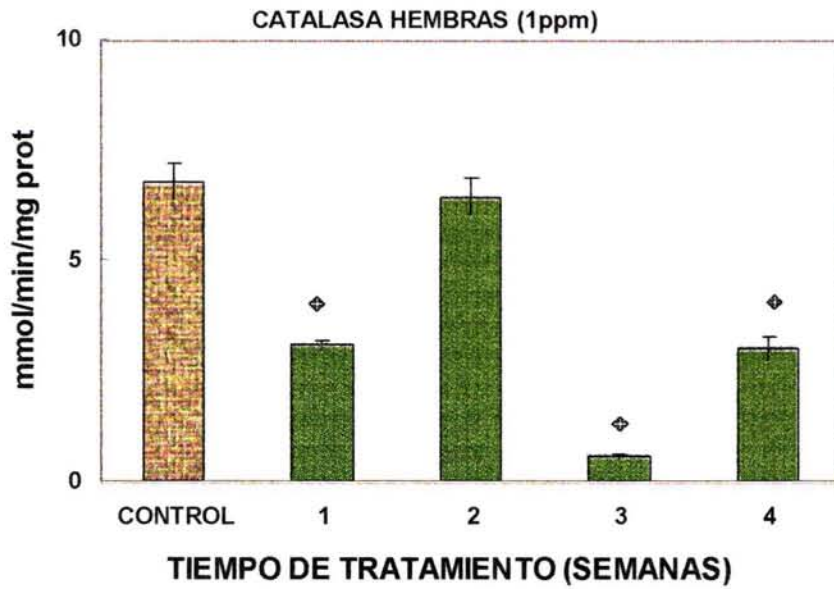
GRAFICA 5: Concentración de MDA en mucosa bucal en ratas macho tratadas con NaF a una concentración de 50 ppm. Las barras representan la concentración de MDA (nmoles/mg prot +/-error estándar) tanto del grupo control (barra rosa) como del grupo experimental (barras azules). El asterisco representa una diferencia estadísticamente significativa contra el grupo control ($p < 0.05$).



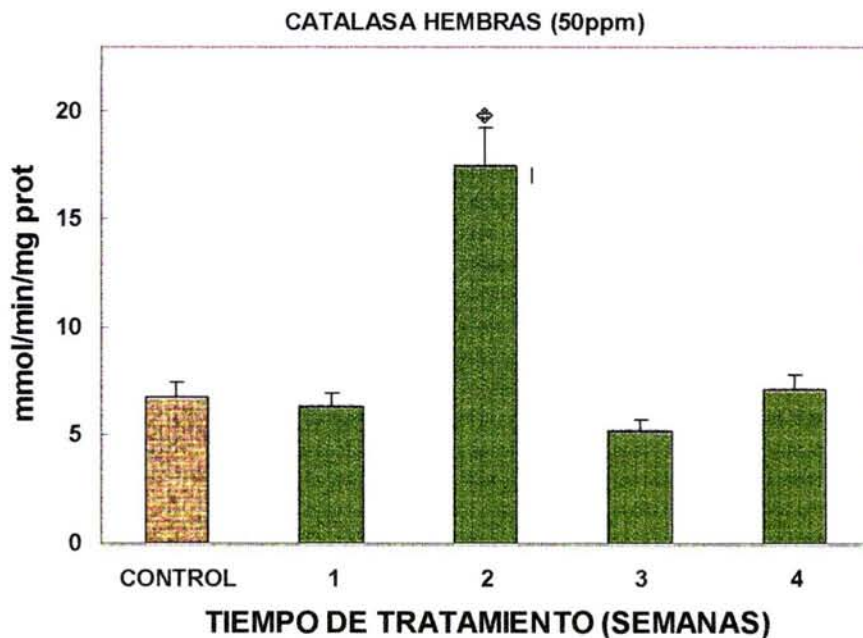
GRAFICA 6: Comparación entre las concentraciones de MDA en mucosa bucal del grupo de ratas machos que fueron tratadas ya sea con 1 ó 50 ppm de NaF. Las barras representan la concentración de MDA (nmoles/mg prot +/- error estándar) tanto de la dosis de 1 (barras cafés) como de 50 (barras verdes) ppm. El asterisco representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre el grupo que recibió 50 ppm de NaF, en contra del grupo que recibió 1 ppm de NaF.

De esta forma, la determinación de la actividad específica de la catalasa es un buen indicador de la presencia de radicales libres derivados del oxígeno, es por ello que, junto con el malondialdehído, nosotros determinamos su actividad en la mucosa de las ratas tratadas con NaF.

Como primer grupo de estudio fueron las ratas hembras tratadas con 1 y 50 ppm de NaF donde se determinó la actividad específica de la enzima catalasa por un período de cuatro semanas obteniendo los siguientes resultados: En la Gráfica 7 se muestra la actividad de la enzima catalasa determinada en el grupo de ratas hembras con un tratamiento de NaF de 1 ppm por cuatro semanas; a partir de la primera semana de tratamiento mostró una disminución estadísticamente significativa con respecto al grupo control; esta tendencia se repite tanto para la tercera como para la cuarta semana de tratamiento. Por el contrario, en la segunda semana no hubo ningún cambio estadísticamente significativo en la actividad de la enzima catalasa con respecto al grupo control. La actividad de la enzima catalasa en el grupo de ratas hembras con un tratamiento de NaF de 50 ppm a través del tiempo se observa en la Gráfica 8. Durante la primera, así como en la cuarta semana no hubo cambios estadísticamente significativos con respecto al grupo control. Por el contrario, como se puede observar, en la segunda semana hubo un incremento en la actividad de esta enzima estadísticamente significativa en comparación con el grupo control. En contraste, en la tercera semana hubo un descenso en la actividad de esta enzima estadísticamente significativa en relación al grupo control. Los resultados muestran en la Gráfica 9 la comparación de la actividad de la enzima catalasa en el grupo de ratas hembras que recibieron 1 y 50 ppm de NaF; determinando que existe un incremento importante en la actividad de la enzima en el grupo que recibió el tratamiento con 50 ppm de NaF a lo largo del tiempo en relación con el grupo que recibió 1 ppm. Cabe resaltar que en la segunda semana de tratamiento es en donde se presenta la diferencia más significativa entre ambos grupos, presentándose un incremento de cerca de 12 unidades para el grupo que recibió 50 ppm (que representan aproximadamente un 200% más de actividad de la catalasa).

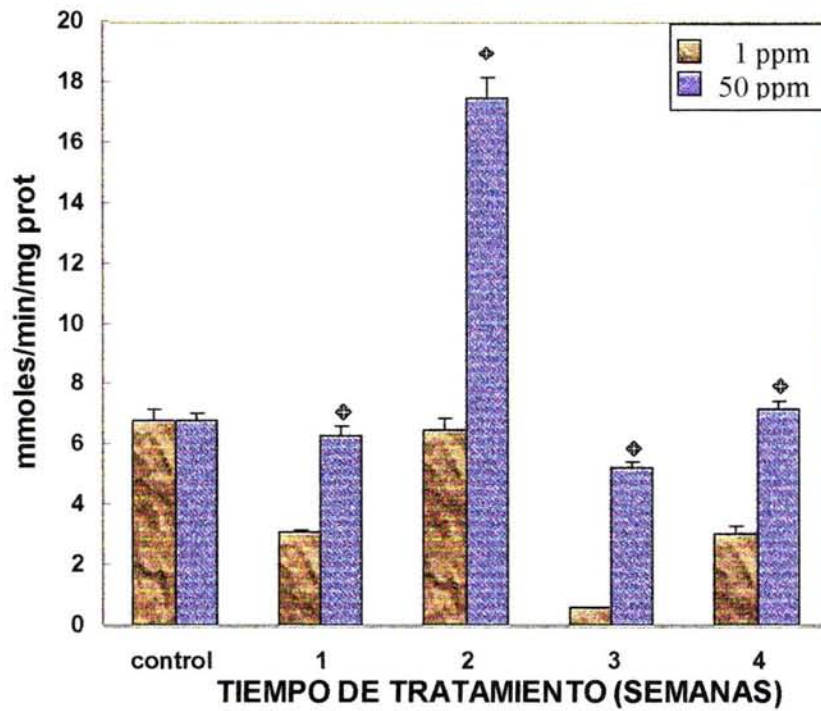


GRAFICA 7: Actividad de la enzima catalasa en mucosa bucal en ratas hembra tratadas con NaF a una concentración 1 ppm. Las barras representan la actividad de la catalasa (nmoles/min/mg prot +/- error estándar) tanto del grupo control (barra café) como del grupo experimental (barras verdes). El asterisco representa una diferencia estadísticamente significativa del grupo experimental contra el grupo control ($p < 0.05$).



GRAFICA 8: Actividad de la enzima catalasa en mucosa bucal en ratas hembra tratadas con NaF a una concentración de 50 ppm. Las barras representan la actividad de la catalasa (nmol/min/mg prot +/- error estándar) tanto del grupo control (barra café) como en el grupo tratado (barras verdes). El asterisco representa una diferencia estadísticamente significativa del grupo tratado contra el grupo control ($p < 0.05$).

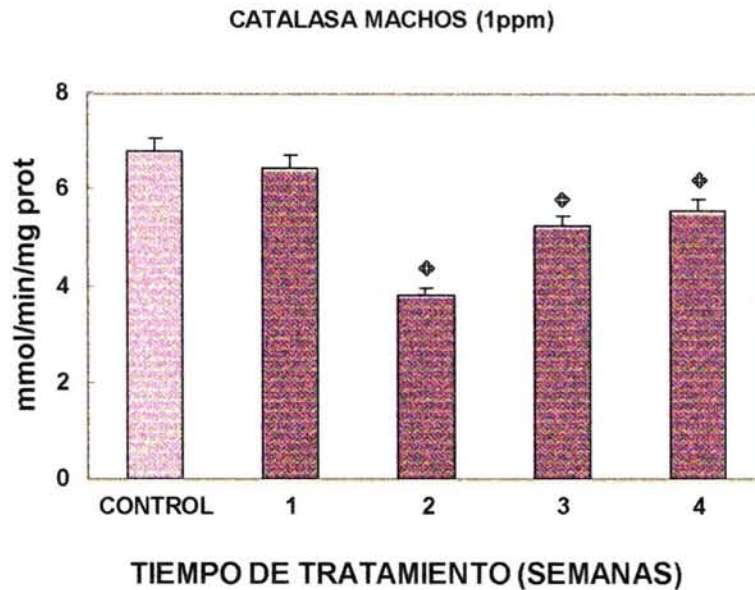
COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE CATALASA EN
HEMBRAS (1 ppm y 50 ppm de NaF)



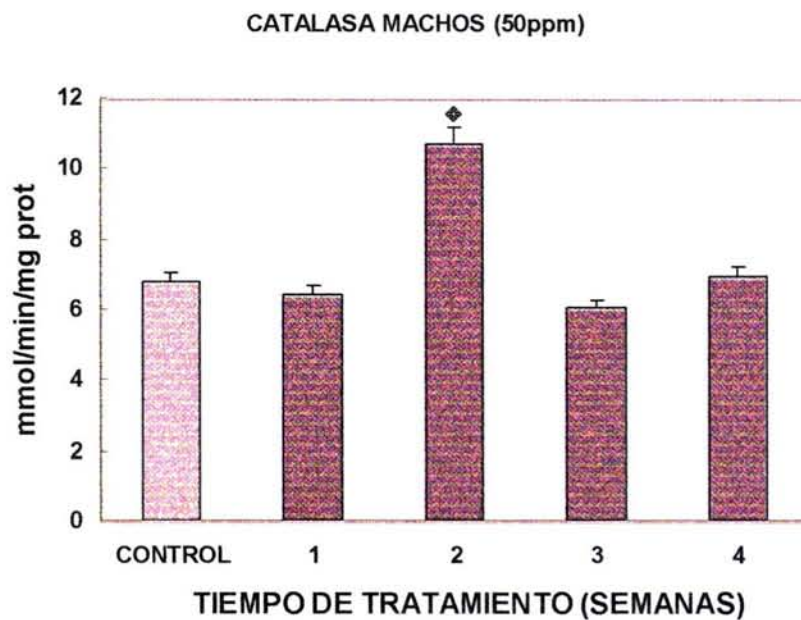
GRAFICA 9: Comparación entre la actividad de la enzima catalasa en mucosa bucal en el grupo de ratas hembras que fueron tratadas ya sea con 1 o 50 ppm de NaF. Las barras representan la actividad de catalasa (nmol/min/mg prot +/- error estándar) tanto de la dosis de 1 (barras cafés) como de 50 ppm (barras azules). El asterisco representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre el grupo que recibió 50 ppm de NaF, en contra del grupo que recibió 1 ppm de NaF.

Nuestro segundo grupo de estudios fue el de ratas machos tratadas por un período de cuatro semanas con las dos distintas dosis de NaF para la determinación de la actividad específica de la enzima catalasa. En la Gráfica 10 se observa la actividad de la enzima catalasa determinada en la mucosa del grupo de ratas macho con un tratamiento de NaF de 1 ppm por cuatro semanas. Durante la primera semana no se presentó ningún cambio estadísticamente significativo en relación al grupo control. A partir de la segunda semana, se observa una disminución estadísticamente significativa (3 nmoles por minuto por miligramo de proteína en comparación con el grupo control) en la actividad de esta enzima, la cual permanece menor en relación al grupo control hasta las cuatro semanas de tratamiento. Sin embargo, a partir de esta semana se presentó un incremento gradual en la actividad de la enzima hasta el término del tratamiento, sin embargo, este incremento no alcanza los niveles del control. La actividad de la catalasa determinada en el grupo de ratas macho con un tratamiento de NaF de 50 ppm se ejemplifica en la Gráfica 11 donde se observa que en general, no existen cambios significativos en dicha actividad en la primera, tercera y cuarta semana de tratamiento. Por su parte, como se puede observar, existe un incremento estadísticamente significativo en la actividad de esta enzima con respecto al grupo control (de hasta 4 unidades) en la segunda semana de tratamiento. En la Gráfica 12 se muestra la comparación entre los dos grupos descritos en las gráficas 10 y 11. Se observa que en la primera semana de tratamiento no hubo ningún cambio significativo entre ambos grupos. A partir de la segunda semana de tratamiento, se puede observar un incremento estadísticamente significativo en el grupo que recibió 50 ppm de NaF en comparación con el grupo que recibió solo 1 ppm. Cabe destacar que en la segunda semana es en donde se presenta el mayor incremento en la actividad de esta enzima para el grupo con tratamiento de 50 ppm.

Los siguientes resultados son los cotejos entre hembras y machos de acuerdo con la misma dosis de NaF, así como, el período de tratamiento de cuatro semanas para determinar la concentración de MDA. Se puede observar en la Gráfica 13 la comparación de la concentración de MDA en el grupo de ratas hembras y machos con un tratamiento de NaF de 1 ppm, originándose en

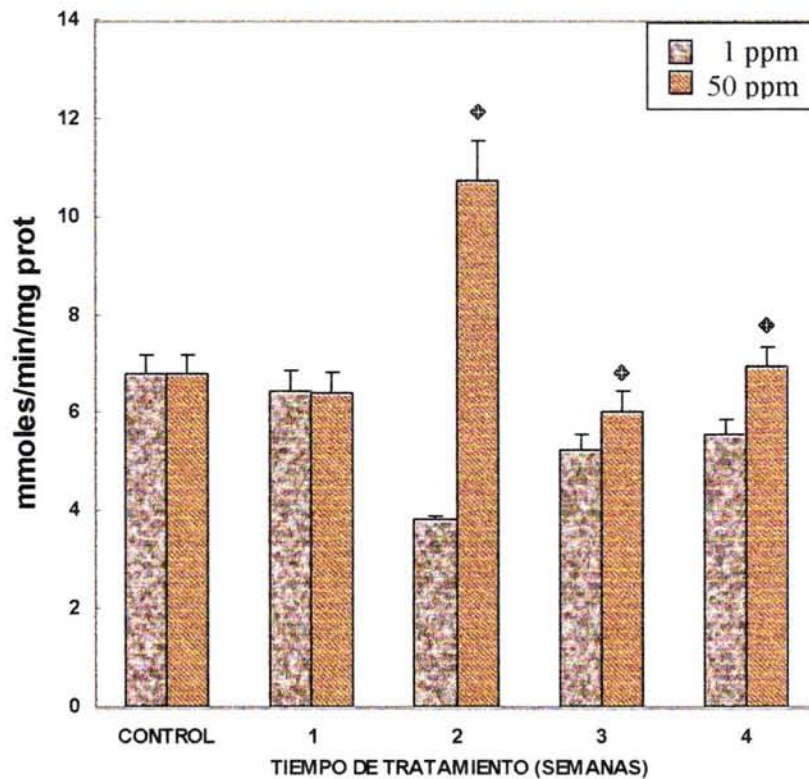


GRAFICA 10: Actividad de la enzima catalasa en mucosa bucal en ratas machos tratados con NaF a una concentración de 1 ppm. Las barras representan la actividad de la catalasa (nmoles/min/mg prot +/- error estándar) tanto del grupo control (barra rosa) como del grupo experimental (barras moradas). El asterisco representa una diferencia estadísticamente significativa del grupo tratado en contra el grupo control ($p < 0.05$).



GRAFICA 11: Actividad de la enzima catalasa en mucosa bucal en ratas machos tratadas con NaF a una concentración de 50 ppm. Las barras representan la actividad de la catalasa (nmoles/min/mg prot +/- error estándar) tanto del grupo control (barra rosa) como del grupo experimental (barras moradas). El asterisco representa una diferencia estadísticamente significativa del grupo experimental

COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE CATALASA EN
MACHOS (1 ppm y 50 ppm de NaF)

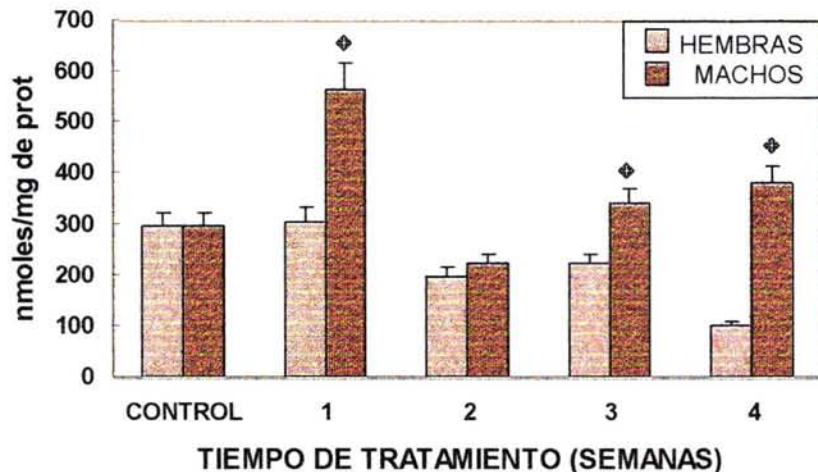


GRAFICA 12: Comparación de la actividad de la enzima catalasa en la mucosa bucal entre el grupo de ratas machos que fueron tratadas ya sea con 1 o 50 ppm de NaF. Las barras representan la actividad de catalasa (nmol/min/mg prot +/- error estándar) tanto de la dosis de 1 (barras grises) como de 50 ppm (barras cafés) del grupo de ratas macho. El asterisco representa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre el grupo que recibió 50 ppm de NaF, en contra del grupo que recibió 1 ppm de NaF.

la primera, así como en la tercera y cuarta semana en el grupo de ratas macho un incremento estadísticamente significativo en comparación con el grupo de ratas hembra. En contrate el grupo de ratas hembra a esta misma dosis se observa que en el transcurso del tiempo disminuye la concentración de este metabolito gradualmente hasta el término del tratamiento. La comparación de la concentración de MDA en el grupo de ratas hembras y machos con un tratamiento de NaF de 50 ppm por un período de cuatro semanas; se muestra en la Gráfica 14 así; tanto en la primera como en la tercera semana de tratamiento, las ratas macho presentaron un incremento estadísticamente significativo en la concentración de MDA con respecto al grupo de hembras. Por su parte, las ratas hembras de la primera y tercera semana de tratamiento, presentan una disminución muy importante en relación con los machos e incluso, con su control (ya señalado en la grafica 2).

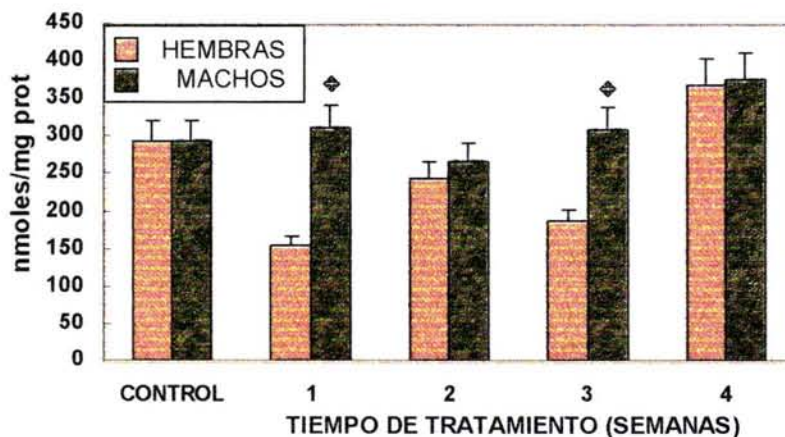
Los resultados que a continuación se describen son las combinaciones entre los grupos experimentales de ratas hembras y machos con la misma dosis y el tiempo de tratamiento de cuatro semanas determinando la actividad específica de la enzima catalasa. Se observa en la Gráfica 15 la comparación de la actividad de la enzima catalasa determinada en el grupo de ratas hembras y machos con un tratamiento de NaF de 1 ppm por cuatro semanas. Como puede observarse, existe una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos a lo largo del tiempo. Al comparar el grupo de machos en relación con las hembras, se puede apreciar que los machos presentan una actividad de catalasa mayor que las hembras a lo largo del tiempo. Lo anterior no es válido para la segunda semana en donde las hembras presentaron una mayor actividad de enzima en relación con los machos. Se muestra la comparación de la actividad de la catalasa en hembras y machos con un tratamiento de NaF de 50 ppm en la Gráfica 16, solo cabe destacar la segunda semana de tratamiento en ambos grupos de ratas. En esta semana se puede observar que en el grupo de ratas hembra se presentó un aumento estadísticamente significativo en la actividad de la enzima en comparación con el grupo de ratas macho. Por su parte, puede observarse que, tanto para la primera, tercera y cuarta semana de tratamiento, la actividad de la catalasa en ambos grupos fue la misma.

COMPARACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE MDA EN
HEMBRAS Y MACHOS (1 ppm de NaF).



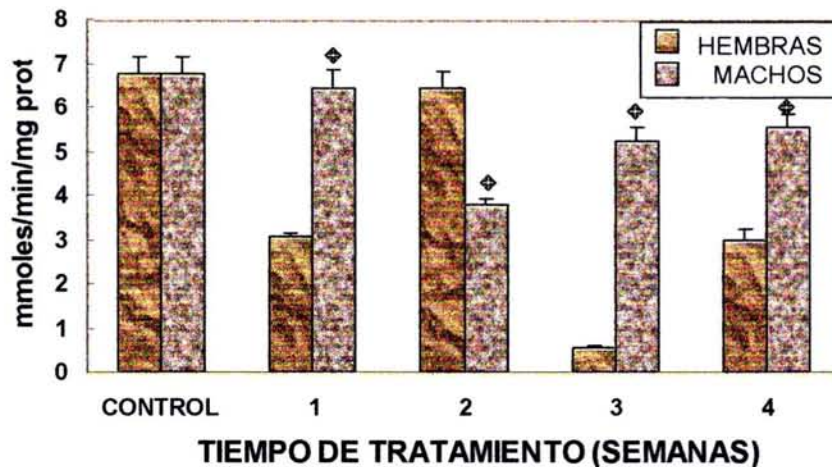
GRAFICA 13: Comparación de la concentración de MDA en mucosa bucal entre el grupo de ratas hembra y el grupo de ratas macho tratadas con NaF a una concentración de 1 ppm. Las barras representan la concentración de MDA (nmoles/mg prot +/- error estándar) tanto del grupo de ratas hembras (barras rosas) como del grupo ratas macho (barras cafés). El asterisco representa una diferencia estadísticamente significativa del grupo de machos en contra del grupo de hembras ($p < 0.05$).

COMPARACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE MDA EN HEMBRAS Y
MACHOS (50 ppm de NaF).



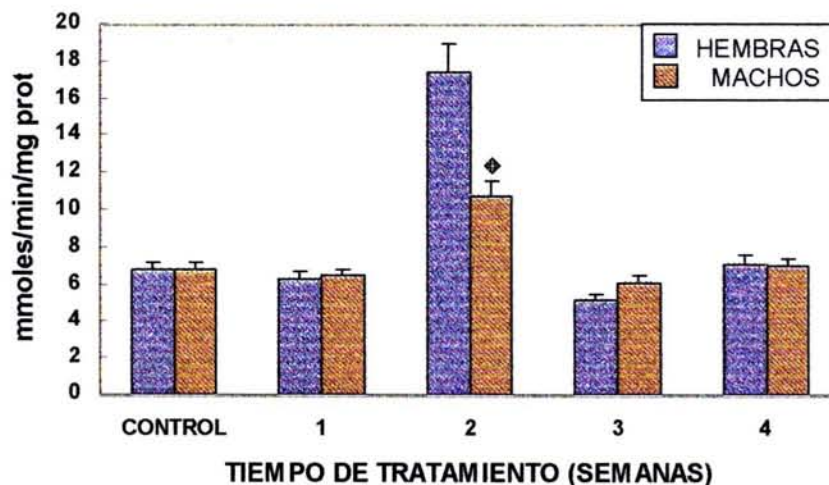
GRAFICA 14: Comparación de la concentración de MDA en mucosa bucal entre el grupo de ratas hembra y el grupo de ratas macho tratadas con NaF a una concentración de 50 ppm. Las barras representan la concentración de MDA (nmoles/mg prot +/- error estándar) tanto del grupo de ratas hembras (barras color mamey) como del grupo ratas macho (barras verdes). El asterisco representa una diferencia estadísticamente significativa del grupo de machos en contra del grupo de hembras ($p < 0.05$).

COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA
CATALASA EN HEMBRAS Y MACHOS (1ppm de NaF).



GRAFICA 15: Comparación de la actividad de la enzima catalasa en mucosa bucal entre el grupo de ratas hembra y el grupo de ratas macho tratadas con NaF a una concentración de 1 ppm. Las barras representan la concentración de MDA (nmol/mg prot +/- error estándar) tanto del grupo ratas hembras (barras cafés) como del grupo de ratas macho (barras grises). El asterisco representa una diferencia estadísticamente significativa del grupo de machos en contra del grupo de hembras ($p < 0.05$).

COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA CATALASA EN
HEMBRAS Y MACHOS (50 ppm de NaF).



GRAFICA 16: Comparación de la actividad de la enzima catalasa en mucosa bucal entre el grupo de ratas hembras y el grupo de ratas macho tratados con NaF a una concentración de 50 ppm. Las barras representan la concentración de MDA (nmol/mg prot +/- error estándar) tanto del grupo de ratas hembras (barras azules) como del grupo de ratas macho (barras cafés). El asterisco representa una diferencia estadísticamente significativa del grupo de machos en contra del grupo de hembras ($p < 0.05$).

DISCUSIÓN.

Ha sido descrito para diferentes usos de prevención bucal, al NaF ya que ayuda a reducir o eliminar los microorganismos que se generan en la placa dentobacteriana. Pese a los efectos tóxicos que este compuesto pueda tener sobre el organismo (el cual se relaciona con la cantidad ingerida, la frecuencia, el tiempo, la edad y el sexo) no han sido estudiados los efectos deletéreos que pueda tener este compuesto sobre la mucosa bucal⁵³. Por ello, el objetivo principal de este estudio consistió en determinar el efecto de la ingesta de NaF sobre la producción de malondialdehído (como un indicador de daño por radicales libres) y la actividad específica de la enzima catalasa, en la mucosa bucal de ratas hembras y machos tratados por cuatro semanas con dos distintas dosis de NaF. Todo lo anterior, en un intento de saber si el NaF es capaz de generar daño por medio de la producción de radicales libres.

La presencia de RL se puede cuantificar mediante la determinación de la concentración de MDA como un producto de la degradación lipídica, siendo éste un indicador bioquímico de referencia. Por lo anterior, fueron evaluadas las concentraciones de este metabolito en el grupo de ratas hembras y machos con las dos distintas dosis de NaF en un intento de revelar la presencia de RL en la mucosa bucal⁵⁴.

Analizando la concentración de este metabolito en el grupo de ratas hembras con las dos diferentes dosis de NaF, se observó que hubo un patrón definido de disminución a lo largo del tratamiento entre ambas dosis. Solo cabe resaltar que en el grupo tratado con 1 ppm de NaF se inicio la disminución de la concentración de MDA a partir de la segunda semana tratamiento hasta el término del mismo. En contraste el otro grupo que fue tratado con 50 ppm de NaF inició su descenso en la concentración de este metabolito a partir de la primera semana de tratamiento.

El análisis de la concentración de MDA en el grupo de ratas macho con las dos diferentes dosis de NaF a lo largo del tratamiento señala que existe un comportamiento disímil entre ambas dosis ya que, para el grupo que recibió 1ppm de NaF, presenta mayores variaciones en la concentración de MDA, caracterizado por un aumento brusco en la concentración del metabolito en la primera semana de tratamiento para descender también súbitamente a partir de la segunda semana de tratamiento para incrementarse para el resto de las

semanas. Por su parte, las ratas tratadas con 50 ppm presentaron un comportamiento más estable en la concentración del MDA a lo largo del tratamiento.

Los datos anteriores contrastan con los obtenidos en el grupo de ratas hembras ya que como fue señalado, en ellas se presenta una disminución generalizada en la concentración de MDA.

Como ha sido descrito con anterioridad, el MDA es un producto de la degradación de los ácidos grasos que han sido relacionados con la presencia de RL en sistemas biológicos que se encuentran sometidos a algún tipo de estrés metabólico. En el caso que nos ocupa, el NaF agregado al agua de bebida en las ratas hembras, produjo cambios importantes en la concentración del MDA de la cavidad bucal, el cual presenta un perfil general tendiente a la disminución durante el tiempo de tratamiento.

Si consideramos que los incrementos en la concentración de MDA son interpretados como daño a las membranas, en el caso del grupo de las ratas hembras, podemos suponer que el NaF tiene un efecto protector sobre la mucosa bucal reflejándose ésta situación por la disminución encontrada en la cantidad de MDA. Por su parte, el grupo de ratas machos mostró una sensibilidad variable la cantidad de NaF administrado ya que el grupo que recibió 1 ppm presenta un comportamiento dispar entre cada semana de tratamiento, mientras que el grupo que recibió 50 ppm no muestra cambios a lo largo del tiempo que duró el tratamiento. Todo lo anterior nos indica que las ratas machos presentan una respuesta variable dependiendo de la concentración de NaF a la cual hayan sido sometidas. Así, resulta paradójico que las ratas machos que fueron tratadas con 50 ppm no presenten mayores cambios en la concentración del MDA, mientras que a menor concentración de NaF, hay una respuesta disímil en la concentración del MDA de la mucosa bucal.

Al momento no se tiene una respuesta para explicar esta disimilitud en la respuesta a las dos dosis de NaF en el grupo de ratas machos y la concentración de MDA encontrada en la mucosa bucal, por lo que deben hacerse más estudios al respecto para determinar las causas de este fenómeno.

Durante el metabolismo oxidativo natural de la célula, se generan RL los cuales son neutralizados por mecanismos de defensa de la célula, principalmente a través de enzimas antioxidantes tales como la catalasa. La catalasa es una enzima dependiente de la disponibilidad de peróxido de hidrógeno por lo que un aumento o disminución éste metabolito puede activar o inhibir la reacción de esta enzima. Esta enzima depende a su vez de la acción de otra enzima que es la superóxido dismutasa la cual convierte al radical superóxido en peróxido de hidrógeno el cual es tomado por la catalasa y convertido en agua.

En este estudio se utilizó otro marcador bioquímico de referencia para determinar la presencia de RL como la catalasa. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que el NaF es capaz de modificar la actividad específica de la enzima catalasa en la mucosa bucal de las ratas en ambos sexos y con las dos diferentes dosis de tratamiento con NaF.

El análisis del comportamiento de la actividad específica de la catalasa tanto en el grupo de ratas hembra como machos a las dos dosis administradas muestra que la catalasa en el grupo de ratas hembras tratadas con 1 ppm de NaF presentan un patrón de disminución en la actividad de esta enzima mientras que el tratamiento con 50 ppm los cambios en la actividad de la catalasa no muestran un patrón definido, destacando sobre todo, un aumento muy importante en la actividad a las dos semanas de tratamiento en este grupo de estudio.

Por su parte, en las ratas machos encontramos que la actividad de la catalasa en el grupo tratado con 1 ppm presenta un patrón de disminución en tres de cuatro semanas de tratamiento; lo cual es muy semejante al grupo de ratas hembras tratadas con la misma dosis. En contraste, cuando las ratas son tratadas con 50 ppm de NaF, no se encuentran cambios importantes en la actividad de esta enzima con excepción de la segunda semana de tratamiento que destaca por tener una alta actividad en esta enzima.

Por lo anteriormente descrito, las ratas hembra como machos tratados con 1 ppm presentaron una disminución en la actividad específica de la catalasa, lo que nos indica una probable disminución en la generación de radicales libres en la mucosa bucal. Sin embargo, es de notar que, viendo las concentraciones de MDA descritas en líneas anteriores, únicamente existe una

correlación entre la disminución en la concentración del MDA y una disminución en la actividad de la catalasa en el grupo de las ratas hembras tratadas con 1 ppm de NaF. Lo anterior puede interpretarse como un efecto protector del NaF hacia la mucosa bucal en las ratas hembras.

En el grupo de ratas macho con las distintas dosis hubo un comportamiento similar entre ambas dosis a lo largo del tratamiento. Sin embargo, en la segunda semana en el tratamiento con 50 ppm de NaF hubo un aumento y por el contrario de 1 ppm tuvo un descenso.

Los varios tipos de células en la mucosa bucal se diferencian entre si en su resistencia contra los RL derivados del oxígeno. Dicha diferencia se pueden explicar en parte por diferencias en los mecanismos de defensa antioxidantes y/o el equilibrio de antioxidante/oxidante que cada tipo celular posee ⁴⁸.

El análisis estadístico de nuestros resultados muestran la presencia de RL, que posiblemente se generaron a partir del intercambio iónico provocado por el NaF alterando los niveles de MDA y catalasa. Entre lo que cabe destacar al pH ácido favorece el desplazamiento de iones hidroxilo por iones de fluoruro de tal forma que esta característica fomenta un tiempo de intercambio iónico suficiente para permitir así formar compuestos estables o inestables. No obstante, este podría ser el momento idóneo para la generación de RL ya que pueden este momento captar o atraer los electrones que les hace falta para así iniciar una reacción en cadena ³⁷.

Aunque no se obtuvieron los resultados esperados, se puede aportar con el presente estudio que la ingesta del NaF durante el transcurso del tratamiento de cuatro semanas, si se alteraron los niveles de RL en la mucosa bucal. Tomando esto posiblemente se requiera de prolongar el tiempo de estudio y relacionarlo con el sexo de las ratas especialmente en las hembras debido a que las hormonas si tienen influencia sobre la producción de RL. También se debe tomar como punto importante la edad de la rata debido a que casi todos los estudios del NaF se realizando en ratas jóvenes y en este estudio se utilizaron ratas más viejas.

CONCLUSIONES.

De los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir lo siguiente:

Que el tratamiento con NaF en nuestros modelos experimentales que han sido analizados, se observó que las ratas fueron sensibles a las dos diferentes dosis de NaF; esta sensibilidad esta relaciona con el sexo del animal y el tiempo del tratamiento.

Se determinó que si se generaron cambios importantes en la mucosa bucal denotados por los cambios en la concentración del MDA así como en la actividad específica de la catalasa; siendo estos cambios disímiles entre ambos sexos y entre ambas dosis

Se ha visto hubo una correlación entre la producción de MDA y la actividad de catalasa. Sin embargo, las modificaciones obtenidas en la concentración de MDA y la actividad específica de la enzima catalasa posiblemente sean un indicador de daño sobre la mucosa bucal de las ratas.

Buscando puntos de unión entre los posibles mecanismos acción de los RL y sus efectos que pudieran estar alterando la mucosa bucal de las ratas por la ingesta del NaF se lograría armar cuadro global del funcionamiento de los procesos complejos del NaF.

Esta relación plantea el desafío de futuras investigaciones que permitan establecer las consecuencias que se genera por la ingesta de NaF a nivel de la mucosa bucal.

Esto favorecería a prevenir y/o mejorar la ingesta de NaF para considerar los efectos este compuesto genere sobre la mucosa bucal.

Por lo que se considera que se deben hacer más investigaciones al respecto para determinar si dichos cambios tienen relación directa con la producción de radicales libres que afecten a la mucosa bucal.

La importancia clínica que tiene este estudio, sobre el NaF el cual pudiera estar induciendo la producción de RL, sin embargo, esta es una mera hipótesis ya que es necesario realizar más estudios encaminados para establecer si se produce daño a la mucosa bucal por la ingesta de NaF. Además se estaría aportando conocimientos para una mejorar la ingesta de NaF mediante una dosificación adecuada en conjunción con un menor daño a la mucosa bucal. Así brindar conocimientos para futuras investigaciones.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Lehninger A L, Nelson D L, Cox M M, Principles of Biochemistry. Worth Publishers, New York, NY USA 1993.
2. Herazo A B, Fluoruros, 1ª edición, Bogota Colombia, Ed Moserrate, Pág 90- 107 ,1988.
3. Barray S, Cabello M, Magaña J, Rodríguez E, Sal fluorada riesgo o beneficio para la población de la ciudad de Chihuahua. Rev ADM; 2:80-89 1994.
4. Hardy Limeback, BSc, PhD, DDS,Recent studies confirm old problems with water fluoridation: a fresh perspective. Guest Editorial; 34(1):1-5, 2001.
5. Williams, Elliott, Bioquímica dental básica y aplicada, México, Ed Manual Moderno pp 387- 395 ,1990.
6. Casa N E, Kaufer M, Horwitz A B, Pérez L, Arroyo P, Nutriología médica, 2ª edición, México, Ed Panamericana, pp 192-207, 2001.
7. Ekambaram P, Paul V, Calcium preventing locomotor behavioral and dental toxicities of fluoride by decreasing serum fluoride level in rats. Environ Toxicol Pharmacol; 9(4):141-146, 2001.
8. Evdokimova GA; Fluorine in the soils of the White Sea Basin and bioindication of pollution. Chemosphere; 42 (1):35-43 2001.
9. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) The Draft Toxicological profile for fluorine, hydrogen fluoride and fluorides. EE,UU September 2001.

10. Clark DC, Et al influence of exposure to various fluoride technologies on the prevalence of dental fluorosis. *Community Dent Oral Epidemiol*, 22:461-4, 1994.
11. Withford GM. The physiological and toxicological characteristics of fluoride. *J Dent Res; (Spec Iss)* 69:539-549 1990.
12. Bottenberg P, Declerck D, Martens L, Fluorosis: diagnosis, risk assessment and epidemiology. *Rev Belge Med Dent*; 56(4):291-309, 2001.
13. Choubisa SL, Endemic fluorosis in southern Rajasthan, India. *Fluoride*; 34(1):61-71 2001.
14. Beata Urbanska, Wojciech Czarnowski, Jerzy Krechniak, Iwona Inkielewicz, Katarzyna Stolarska, Skeletal Metabolism and bone mineral density in fluoride-exposed rats. *Fluoride*; 34(2):95-102 2001.
15. Guna Sherlin DM, Verma RJ, Vitamin D ameliorates fluoride-induced embryotoxicity in pregnant rats. *Neurotoxicol Teratol*; 23(2):197-201, 2001.
16. De la american dental association *Terapéutica odontológica aceptada 39ª edición México*, Ed Panamericana pp. 320-337 ,1989.
17. McIntyre J, Williams P, Ha HD, Najee S, Anh VT, Ivanow G, Ngo H, Fraser M, Rice as a vehicle for dietary fluoride uptake. *Gen Dent*; 49(6):604-7, 2001.
18. Withford GM, Intake and metabolism of fluoride. *Adv Dent Res*; 8(1): 5-14 1994.
19. Ten CJM, Current concepts on the theories of the mechanism of action of fluoride. *Acta Odontol Scand*, 57(6): 325-9, 1999.

20. Singer L, Armstrong WD. Regulation of human plasma fluoride concentration. *J Appl Physiol*;15(3):508-510, 1960.
21. Stephen K W, Fluoride prospects for the new millennium community and individual patient aspects. *Acta Odontol Scand*, 57:352-5 1999.
22. Gómez D F, Campos M A, *Histología y embriología buco dental*, México, Ed Panamericana. 1999.
23. Irigoyen M E, Sánchez Hinojosa G, Changes in dental caries prevalence 12 year old students in the state of México after 9 years of salt fluoridation. *Caries Res*; 34:303-307 2000.
24. Vilchis Ventura H, Caballero Carmen G, Recopilación bibliográfica de los mecanismos de acción del flúor y su metabolismo en los seres humanos, así como su recuperación en los tejidos dentarios. *Rev Méd (Aguascalientes)*; 4:77-84, 1997.
25. Yin F, Yao Y, Liu CC, Wen ML, Developments in the analysis of fluoride 1997-1999. *Fluoride*; 34(2):114-125, 2001
26. Branemark PI, Local tissue effects of sodium fluoride, *Odontologisk Revy*. 18(3):273-94, 1967.
27. Jos Ž Nicolau and Mariana Ferreira Leite, In vitro and in vivo effects of fluoride solutions on human salivary amylase, *Fluoride*; 34(1):55-60 2001
28. Korkmaz O, In vitro effects of sodium fluoride and sodium dichromate on dynamic properties of human erythrocyte membrane. *Biophysical Chem*. 83(2):111-20, 2000.
29. Gerschman R, Gilbert D L, Nye S W, Dwyer p y Fenn W O, Oxygen poisoning and-irradiation:a mechanism in common. *Science* 119: 623-626 1954

30. Cheesman KH, Slater TF, An introduction to free radical biochemistry. Br Med Bull; 49: 481-93, 1998.
31. Halliwell B, Gutteridge J M. C, Free radicals in biology and medicine, edition second. Oxford Science Publications; pp 105- 140, 2000.
32. Cotran, Kumar, Robbins, patología estructural y funcional, 5ta edición, México, Ed Interamericana 1995.
33. Díaz Z JC, Hicks G JJ, Bioquímica, 2da edición, México Interamericana-MC Graw-Hill, 715-723 1995.
34. Fraga CG, Oteiza PI, Vitaminas antioxidantes: bioquímica, nutrición y participación en la prevención de ciertas patologías. BEB; XIV (1) ,12:17, 1995.
35. Chakraborty M, Ghosal J, Bismas T, Datta AG. Effect of erythropoitein on membrana lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase of rat RBC (red blood cell). Biochem Med Biol; 40(1): 8-18, 1998.
36. Gutteridge MC, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. Elsevier Science Publishers LTD, 1990.
37. Suska M, The effect of sodium fluoride on the adenine nucleotide pool in erythrocytes of Wistar rats. Int J Occup Med Environ Health; 14(4):369-73 2001.
38. Mustafa MG, Biochemical basis of ozone toxicity. Free Radic Biol Med; 9(3):245-65,1990.
39. Díaz P, Concheiro A, Mainou C, Jiménez R, Radicales libres y antioxidantes en pediatría. BEB; Vol 80(3): 156-163,1999.

40. Jerlick A, Pitt AR, Schaur RJ, Spickett CM Pathway of phospholipids oxidation by HOCL in human LDL, detected by LC- MS. *Free Radic Bio Med*; 28 (5):673-82 2000.
41. Piña G E, Huberman A, Chàvez R, Frenks. Los radicales libres, beneficios y problemas. *Gac Med Méx* 132 (2):183-203 1996.
42. Mendez F, Héctor G Ramos Rodriguez, Sobre los beneficios de los radicales libres. *Rev Med IMSS (Mex)*, vol 35 (4): 309-313 1997.
43. Chow CK, Dietary vitamin E and levels of reduced glutathione, glutathione peroxidase, catalase and dismutase in rat blood. *J Vitam Nutr Res*;47(3):268-73,1997.
44. Pentiuik AA, Lakovleva OA, Konovalova GG, Lankin v. Activity of glutathione dependent enzymes, catalase and superoxido dismutase in the liver and myocardium of rats with vitamin A deficiency. *Bioklimia*; 52(6): 1009-12 1987.
45. Trejo-Vazquez R, Bonilla-Petriciolet A. Exposure to fluorides from drinking water in the city of Aguascalientes (Mexico). *Rev Panam Salud Publica*;10 (2):108-13,2001.
46. Martínez Gomis J, Fernández Soianas A, Viñas M, Gonzalez P, Planas M E, Sánchez S, Effects of topical application of free and liposome-encapsulated lactoferrin and lactoperoxidase on oral microbiota and dental caries in rats. *Arch Oral Biol*; 44: 901-906 1999.
47. Zentella P M, Corona S, Saldaña BY. Papel de los radicales libres en la peroxidación de los lípidos. *BEB*; XVIII (3), 1994.
48. Shivarajashankara YM, Shivashankara AR, S Hanumanth Rao, P Gopalakrishna Bhat, Oxidative stress in children with endemic skeletal fluorosis. *Fluoride*; 34(2):103-107, 2001.

49. Zhonghua K, Qiang Y, Xue Z Z, The roles of oxygen free radicals and superoxide dismutase in the inflammatory injury oral mucosa. School of Stomatology, West China University of Medical Sciences Chengdu, 34(6): 331-3,1999.
50. Weinberg M A, Bral M, Laboratory animal models in periodontology. J Clin Periodontol; 26: 335-340 1999.
51. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AI, Randal RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem; 1(93): 265-75, 1951.
52. Chanse B, Bonnichsen R k, and Theorell H. Methodos of enzymatic analysis. Acta Chem Scand 1, 236 1947.
53. Gabler WL, Absorption of fluoride through the oral mucosa of rats. Arch Oral Biol; 13(6):619-23, Jun1968.
54. Jeng JH. Hsieh CC. Lan WH. Chang MC. Lin SK. Hahn LJ. Kuo MY, Cytotoxicity of sodium fluoride on human oral mucosal fibroblasts and its mechanisms. Cell Biol & Toxicol; 14(6):383-9, 1998.

ABREVIATURAS.

mg – Miligramos.

MDA – Malondialdehido.

NaF – Fluoruro de Sodio.

nmoles – Nanomoles.

ppm – Partes por millón.

prot – Proteína.

RL – Radicales libres.

rpm – Revoluciones por minuto