



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

EXPRESIÓN DE INTERLEUCINA 17 (IL-17) EN
CEREBRO DE RATAS WISTAR EXPUESTAS A DOSIS
ELEVADAS DE FLÚOR.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

C I R U J A N A D E N T I S T A

P R E S E N T A:

MARÍA DE LOS ÁNGELES DOMÍNGUEZ GÓMEZ

TUTOR: Dra. LIA ALIOTH HOZ RODRÍGUEZ

ASESOR: Dra. CLAUDIA PATRICIA PEDRAZA ZAMORA



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.

AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados de la DEPeI, FO, UNAM, y al Dr. Higinio Arzate por el apoyo en la realización de este proyecto.

A la Dra. Claudia, por el apoyo y todo el conocimiento que incondicionalmente me brindo para realizar esta investigación.

A la Dra. Sonia López Letayf, por su apoyo en la toma, análisis y descripción de las imágenes de esta investigación.

A Marco Elías Gudiño Zayas, por su conocimiento y apoyo en el análisis digital de las imágenes.

Al Sr. Juanito, por el incondicional apoyo, dedicación y conocimiento que me brindo desde el Bioterio de la Facultad de Odontología.

DEDICATORIAS

A Angela, tu fortaleza, bondad y ayuda me alentaron a continuar y ser valiente ante cualquier situación.

A Jaime y Gaby, por ser mi mayor ejemplo en la vida, gracias por ser los mejores hermanos y los mejores amigos.

A Regina, Renata, Paula y Fer, verlas me hace querer ser mejor.

A Irán, tus palabras de apoyo y los momentos que pasamos juntas me ayudaron a nunca rendirme.

A Diego, Toño y Saide, por todos los momentos que hicieron que mi paso por la Facultad fuera más divertido y emocionante.

A Sandy, porque tu corta estancia en la Tierra y en mi vida dejó una marca inmensa que me permite seguir creciendo por la dos.

A Sonia, el Dr. Enrique y todas las personas del Laboratorio de Biología Periodontal, gracias por resolver mis dudas y por el aprendizaje incondicional.

A la Dra. Lia, por haberme aventurado a este mundo, por cuidarme y guiarme con tanto cariño, por enseñarme el amor a la ciencia y la pasión con que se debe realizar. Gracias por confiar en mí y dejarme aprender de usted.

A mi mamá, por ser mi pilar y fortaleza, por apoyarme a cada paso, eres el ejemplo de que todo lo puedo, tus palabras son vida para mí, gracias por cuidarme, amarme y consolarme, eres lo más bonito de mi vida.

A mi papá, por enseñarme a nunca rendirme, a trabajar duro por lo que quiero y nunca perder de vista mi objetivo, por estar incondicionalmente a mi lado y hacer de mí una mujer fuerte.

A Dios, porque sin él nada de esto sería posible, todo lo puedo en Ti que me fortaleces.

ÍNDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	4
ANTECEDENTES	5
Flúor.....	5
Toxicidad a causa de la ingesta de flúor.....	6
Fluorosis dental.....	7
Fluorosis esquelética.....	9
Efectos de flúor sobre el Sistema Nervioso.....	12
Situación de la fluorosis dental y esquelética en México.....	13
Factores proinflamatorios asociados a la exposición a flúor.....	15
Interleucina 17 (IL-17)	16
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
JUSTIFICACIÓN	19
HIPÓTESIS	20
OBJETIVOS	20
Objetivo general.....	20
Objetivos específicos.....	20
TIPO DE ESTUDIO	20
VARIABLES	20
Independiente.....	20
Dependiente.....	20
METODOLOGÍA	21
Diseño experimental.....	21
Técnica de inmunohistoquímica con método de peroxidasa.....	22
Técnica de hematoxilina y eosina.....	24
Análisis de fotomicrografías.....	24
Análisis estadístico.....	25
RESULTADOS	26
Fotografías descriptivas de los dientes.....	26
<i>Controles</i>	26
<i>Experimentales</i>	27

Fotografías descriptivas de las estructuras del sistema nervioso.....	30
Controles.....	30
Experimentales.....	31
Fotomicrografías de cortes de cerebelo con tinción de hematoxilina y eosina grupo control.....	32
Fotomicrografías de cortes de cerebelo con inmunohistoquímica con método de peroxidasa grupo experimental.....	33
Fotomicrografías de cortes de cerebelo con tinción de hematoxilina y eosina grupo experimental.....	35
Fotomicrografías de cortes de cerebelo con inmunohistoquímica con método de peroxidasa grupo experimental.....	36
Análisis estadístico.....	38
<i>T de Student no pareada</i>	38
<i>Expresión de IL-17</i>	39
DISCUSIÓN	40
CONCLUSIÓN	44
ANEXOS	45
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

RESUMEN

La fluorosis es un trastorno del desarrollo causado por la ingesta de altas concentraciones de flúor (F), que afecta principalmente a los órganos dentales, ocasionando hipomineralización y manchas blancas-pardas. Se ha reportado que la intoxicación del organismo por F tiene repercusiones a nivel de sistema nervioso, así como afectaciones cognitivas, que desencadenan eventos proinflamatorios en los que participan citocinas como interleucina 17 (IL-17), implicada en el desarrollo de enfermedades inflamatorias y autoinmunes.

El objetivo de este estudio fue evaluar la expresión de IL-17 en el cerebro de ratas Wistar, en un modelo *in vivo* de fluorosis.

Los animales de estudio se dividieron en grupo control y experimental; el grupo experimental consumió agua con 10 ppm de NaF, mientras que el grupo control ingirió agua embotellada, durante 6 meses. Se realizó tinción HyE e Inmunohistoquímica para identificar la expresión IL-17 y se obtuvieron fotomicrografías que fueron analizadas por el software Fiji (Image J). Los resultados mostraron una expresión significativa de IL-17 en el cerebelo del grupo experimental; asimismo, los dientes del mismo grupo, tuvieron un cambio de tonalidad, manchas y fisuras respecto al grupo control.

Se concluyó que consumo de altas concentraciones de flúor por periodos prolongados está directamente relacionado a la expresión significativa de IL-17 en cerebelo de ratas y cambio de coloración de los dientes.

ABSTRACT

Fluorosis is a developmental disorder caused by the ingestion of high concentrations of fluoride (F), which mainly affects dental organs, causing hypomineralization and brownish-white stains. It has been reported that F intoxication of the organism has repercussions at the nervous system level, as well as cognitive impairment, triggering proinflammatory events involving cytokines such as interleukin 17 (IL-17), involved in the development of inflammatory and autoimmune diseases.

The aim of this study was to evaluate the expression of IL-17 in the brain of Wistar rats in an *in vivo* model of fluorosis.

Animals of this study were divided into control and experimental groups; the experimental group consumed water with 10 ppm NaF, while the control group ingested bottled water for 6 months. HyE staining and Immunohistochemistry were performed to identify IL-17 expression and photomicrographs were obtained and analyzed by Fiji software (Image J). The results showed a significant expression of IL-17 in the cerebellum of the experimental group; likewise, the teeth of the same group had a change in tonality, staining and fissures with respect to the control group.

It was concluded that consumption of high concentrations of fluoride for prolonged periods of time is directly related to the significant expression of IL-17 in the cerebellum of rats and a change in the coloration of the teeth.

INTRODUCCIÓN

El flúor (F) es un elemento altamente electronegativo encontrado en la naturaleza en agua de mar y pozos, en forma de mineral y en alimentos como verduras, carnes, jugos y bebidas alcohólicas; es considerado un oligoelemento y tiene gran repercusión en la formación de huesos y dientes.^{1,2}

Permite que los tejidos mineralizados formen estructuras más resistentes debido a la interacción que tiene con el calcio y fosfato, lo que ayuda a mantener en buen estado las mismas; todo esto cuando es consumido en cantidades adecuadas que van desde 0.5ppm (partes por millón) hasta 1.5ppm, según lo estipulado por la OMS (Organización Mundial de la Salud). Cuando se superan estas cantidades el flúor comienza a repercutir de forma negativa en el organismo.⁴

La fluorosis dental y esquelética son signos inequívocos de intoxicación del organismo con flúor, generalmente ocurre por la incorporación por vía sistémica a través de la ingesta de agua. Son considerados trastornos del desarrollo de las estructuras a las cuales afecta, en el caso de los dientes esta afectación ocurre durante el periodo de formación de los órganos dentarios, que resulta en la formación de manchas que van de los tonos blancos a pardos, de forma bilateral. En cuanto a la afectación de la estructura ósea, ésta ocurre cuando el consumo de flúor en cantidades elevadas es por periodos prolongados, durante años y sus consecuencias van desde aumentos de masa ósea, dolores musculares y articulares, osteoporosis, calcificación de ligamentos y puede llegar hasta deformaciones invalidantes que repercuten en la calidad de vida de las personas. Finalmente, también se ha reportado que existen afectaciones neurológicas y cognitivas asociadas a la ingesta de flúor.^{5,9}

ANTECEDENTES

FLÚOR

El flúor es un elemento químico de grupo de los halógenos, con una masa atómica de 18.9 UMAs, es corrosivo, presenta una electronegatividad elevada, no se encuentra libre en la naturaleza, su símbolo es F y se halla como ion F⁻ o como un compuesto binario.¹

Es un oligoelemento que repercute en la formación y fortalecimiento de dientes y huesos debido a su afinidad a calcio; se encuentra en diversos sitios como rocas volcánicas, agua de mar (siendo su concentración de 1.3 ppm (partes por millón)) y en la atmósfera (cuya concentración oscila en 0.5n/m³). En su forma mineral lo podemos hallar como fluorita, criolita y fluorapatita, en los alimentos es común que se presente en verduras, hortalizas, pescados, carnes, leche, queso, refrescos y bebidas alcohólicas (principalmente los vinos).^{2, 3}

Este elemento químico ingresa al organismo por dos vías:^{2, 4, 5}

Vía Sistémica: es la principal vía de incorporación del F al organismo, a través del agua potable, de pozos o envasada, sal de mesa fluorada y productos para el cuidado oral como gotas o tabletas fluoradas. Se absorbe en estómago e intestino en un 95% y posteriormente entra al torrente sanguíneo que lo lleva a los tejidos por un fenómeno de difusión.

Vía tópica o local: es una vía exclusiva para llevar el F a las superficies dentales cuando estos están en proceso de erupción o totalmente erupcionados, se utilizan geles, pastas, colutorios y barnices. Cuando estos productos son ingeridos puede tornarse a una vía sistémica debido a las concentraciones a las que se encuentra.

La eliminación del flúor del organismo se da principalmente a través de la orina y en mínima cantidad por sudor, saliva y otros fluidos corporales.⁶

El flúor es un elemento que promueve la salud ya que debido a la interacción que presenta con el calcio y fosfato permite que los tejidos mineralizados como hueso, esmalte, dentina y cemento (compuestos principalmente por hidroxiapatita) formen cristales de fluorapatita, que son más grandes y menos solubles, lo que contribuye a mantener en buen estado dichas estructuras. Uno de los efectos más notorios derivados de este proceso es la reversión de la caries incipiente, además, interfiere con la actividad bacteriana, al inhibir a la enzima enolasa, que evita que las bacterias puedan llegar a formar colonias en la superficie del diente. Para que el proceso antes mencionado se lleve a cabo debe ser consumido en cantidades que van desde 0.5 ppm a los 1.5 mg/L al día, dosis recomendada por Organización Mundial de la Salud (OMS), sin embargo, cuando su ingesta es elevada o excesiva y por periodos de tiempo prolongados puede causar efectos nocivos al organismo.^{4, 5, 7}

TOXICIDAD A CAUSA DE LA INGESTA DE FLÚOR

La toxicidad ocasionada por la ingesta flúor puede ser aguda o crónica:

Aguda: a causa del consumo de 64 mg/kg (64 ppm) de peso de la persona en un periodo de tiempo muy corto (horas o minutos), es decir, un adulto regular tendría que consumir de 2 a 4 gramos. Los signos y síntomas derivados del consumo en estas cantidades son: erupciones cutáneas, vómito, diarreas, náuseas, mareos y en dosis superiores a la antes mencionada puede causar convulsiones, afecciones cardíacas, pérdida de consciencia e incluso la muerte.⁵

Crónica: es causada por la ingesta en pequeñas cantidades, superiores a 1.5 ppm al día, durante un tiempo prolongado, la literatura señala que el consumo de cantidades superiores a ésta durante periodos de más de 5 años causa afecciones al organismo. Tanto dientes como huesos son los principales afectados cuando se da este tipo de exposición, mientras que los dientes son afectados en un tiempo específico, de acuerdo con la edad de la persona, durante el periodo de formación de los órganos dentales; en los huesos se extiende por el resto de la vida de la persona, en tanto esté expuesto.⁸

Puede ser evaluado en el organismo a través de fluidos y tejidos como: saliva, plasma, hueso, dientes, orina, cabello y uñas por medio del método de Potenciometría mediante el Electrodo de ion Selectivo de flúor, otros métodos para evaluar la presencia de flúor son: espectrometría de masas, cromatografía y espectroscopía Raman.⁶

FLUOROSIS DENTAL

La fluorosis dental es un trastorno del desarrollo de los tejidos duros del diente y de su mineralización, ocurre en el periodo de formación del órgano dentario, en específico durante la fase de mineralización del esmalte debido a la sobre exposición a flúor. En la fase de mineralización las proteínas de la matriz del esmalte son reabsorbidas por enzimas proteolíticas y reemplazadas por calcio y fosfato conformándose así los cristales de hidroxiapatita, dando lugar a un esmalte altamente mineralizado, que será de alta calidad y sano.⁸

Sin embargo, cuando el flúor se incorpora por vía sistémica y llega a través de torrente sanguíneo a la pulpa dental e interfiere con el metabolismo del ameloblasto lo que inhibe el proceso de mineralización, es decir, cuando las proteínas de la matriz de esmalte no son reabsorbidas el esmalte es más poroso, menos resistente y es más susceptible a fracturas y procesos cariosos. También se pueden observar manchas en las superficies dentales que van desde tonos blanquecinos o grisáceos hasta tonos pardos, estas tonalidades dependen de la dosis a la que se haya estado expuesto durante el proceso de mineralización; entre mayor sea la dosis más oscura será la mancha, así mismo, es una condición que se presenta de manera bilateral.^{5, 8}

Aunque es un problema que afecta comúnmente la dentición secundaria, la dentición primaria se puede ver afectada, durante el desarrollo dentro del útero, esto se debe a que dicho ion puede concentrarse hasta en un 75% en el cordón umbilical de esta forma llega al organismo del producto, lo que afecta a los órganos dentarios durante su fase de desarrollo intrauterino.⁵

De acuerdo con su grado de afectación, la fluorosis dental, se clasifica en: ^{5,7}

Muy leve: manchas blanquecinas muy tenues y difusas que no afecta más del 25% de la superficie de los dientes dañados.

Leve: estrías o manchas más opacas que no cubren más del 50% de la corona, siendo más difusa.

Moderado: manchas y líneas blancas en más del 50% de la corona clínica, existen zonas de hipomineralización.

Severo: presencia de pequeños cráteres debido a la pérdida de sustancia, hipomineralización extendida o generalizada, presencia de manchas pardas y marrón intenso.

Esta condición afecta a ciertas personas que residen en una misma comunidad, región o zona geográfica, por lo que es considerada una enfermedad endémica; entre los registros que se encuentran de muchas de las personas afectadas por fluorosis dental se ha encontrado que tienden a presentar enfermedades del sistema respiratorio, problemas renales, problemas mentales, sensoriales, del sistema digestivo y alteraciones en el sistema nervioso, tanto en personas adultas como en niños.^{5,9}

Cuando se conoce el diagnóstico de fluorosis dental en el paciente, después de realizar una cuidadosa exploración clínica se da un tratamiento de acuerdo al grado de la fluorosis que presenta; estas opciones van desde el blanqueamiento dental, cuando su forma es la más leve, hasta resinas, carillas y coronas cuando las manchas son más oscuras o existan defectos severos .¹⁰

La forma de prevenirla es mantener un estricto control de la ingesta de flúor, tanto en alimentos sólidos como en bebidas, principalmente a una edad temprana, cuando los dientes están en proceso de formación y son completamente susceptibles y vulnerables. Es importante que se identifique de dónde proviene el exceso en el consumo de flúor de esta forma se podrá detener su ingesta y así se evitará el daño a otras estructuras en el organismo.¹

FLUOROSIS ESQUELÉTICA

La fluorosis esquelética, también llamada fluorosis ósea, ha sido considerada a lo largo de la historia como un problema endémico al igual que la fluorosis dental, y fue descrita por primera vez en 1930 en la India, uno de los países más afectados por dicha enfermedad que ha discapacitado a una parte de su población.¹⁰

El sistema esquelético es de los más afectados cuando se ha estado expuesto a flúor en cantidades por arriba de los límites permitidos y durante periodos de tiempo prolongados (en el caso del ser humano, cuando han pasado años).⁸

El flúor presenta una gran afinidad a los cristales de hidroxiapatita, calcio y fosfato presentes en el tejido óseo, cuando las concentraciones de este elemento son mayores a las normales 500 a 1000 ppm en hueso, comienza a presentarse una osteopatía (alteración de la estructura ósea).⁸

El flúor afecta el recambio óseo, influye en el metabolismo celular: aumenta la actividad osteoblástica e interfiere con la expresión de proteínas involucradas en los procesos iniciales de mineralización como osteocalcina y osteoprotegerina, lo que provoca pérdida de su actividad.¹⁰

Para que el flúor afecte al tejido óseo se necesita una exposición de 5 a 10 veces mayor que la necesaria para provocar fluorosis dental.¹¹

Existe la posibilidad que se desarrolle fluorosis debido a la inhalación de F-, un ejemplo de su forma gaseosa es el diclorofluorometano, usado como refrigerante en aviones y submarinos; también se ha descrito que existe cierta susceptibilidad asociada a factores genéticos, principalmente a la matriz metaloproteinasa (enzima que genera proteólisis, desnaturaliza colágena, regula vías de señalización que controlan crecimiento celular, interviene en procesos de inflamación y angiogénesis), prolactina (hormona polipeptídica involucrada en el desarrollo de la glándula mamaria y en la producción de las proteínas de la leche en el embarazo y en el posparto), vitamina D (nutriente esencial en la absorción

de calcio en huesos), y la mieloperoxidasa (cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno y cloruro a ácido hipocloroso. Este es un potente agente oxidante que contribuye al mecanismo de defensa contra los agentes infecciosos). Cuando estos están disminuidos, para que se desarrolle fluorosis esquelética principalmente en individuos de la misma comunidad aludiendo una vez más al factor endémico.^{10, 11}

Puche y Rigalli en su artículo *Determinación de la concentración de flúor en muestras biológicas*, mencionan que la fluorosis esquelética presenta diversas etapas o fases:^{5, 9, 12}

Etapa preclínica: en la que el flúor en hueso es de 3,500 a 5,500 ppm, indetectable con apenas un ligero aumento en masa ósea:

Etapa clínica I: con 6,000 a 7,000 ppm, se presentan dolores articulares, osteoesclerosis, dolores musculares y lesiones en columna.

Etapa clínica II: 7,500 a 9,000 ppm con signos y síntomas como dolor en articulaciones debido a la calcificación en las mismas, calcificación de ligamentos inflamación en el periostio, espasmos musculares y osteoporosis.

Etapa clínica III: es la más avanzada presenta una concentración de flúor >9,000 ppm, en ella se encuentran deformaciones y alteraciones óseas, fracturas frecuentes debido a la condensación y dureza, dando paso a una fluorosis invalidante.

El diagnóstico de esta condición será principalmente por medio de radiografías convencionales detectando en ella cambios en la masa ósea, alteraciones en la estructura del hueso, así como deformaciones en los mismos, se complementa midiendo los niveles de concentración de flúor en sangre, siendo de 0,5 y 1 ppm la concentración normal, y en orina, siendo de 0.2 - 0.5 ppm en normalidad, otra forma de diagnóstico es el histopatológico previo a una biopsia en hueso, posteriormente se realiza un análisis histomorfométrico que evalúa el trabeculado, la formación de hueso y las descalcificaciones, también se puede realizar un escaneo óseo con difosfonato de metileno marcado con tecnecio. Además, es importante tomar en cuenta que existen diagnósticos diferenciales como la espondilitis anquilosante, metástasis o mielofibrosis.^{11, 14, 15}

No existe un tratamiento bien documentado para esta afección, sin embargo, como en muchas otras enfermedades, retirar el agente causal es lo primero que se toma en cuenta para contrarrestar sus efectos. Se tiene registro de que el uso del fertilizante de harina de huesos, el magnesio y el sistema Dowex (resinas de intercambio catiónico y aniónico usadas en tratamiento de aguas) reducen el contenido de fluoruro en agua. También las sales de calcio, magnesio y aluminio permiten la absorción y excreción de flúor del organismo, otro mineral utilizado es la serpentina, que es químicamente un metasilicato de magnesio tiene una enorme capacidad para absorber fluoruro en un amplio rango de pH, permitiendo la eliminación de F por vía urinaria con bastante éxito. Otro tratamiento en ocasiones considerado es la cirugía, cuando el grado de afectación llega a deformar los huesos, sin embargo, los resultados son poco exitosos para este último. ^{11, 15}

Se han registrado alteraciones neurológicas como neuropatías, acroparestesias, espasticidad, compresiones nerviosas en vértebras y alteraciones en glándulas como la tiroides. ^{5, 9, 13}

EFFECTOS DEL FLÚOR SOBRE EL SISTEMA NERVIOSO.

Cuando los niveles de ingesta de flúor se extienden por arriba de los límites permitidos y durante años en la vida de una persona, tiene una influencia negativa en el sistema nervioso. Diversos registros epidemiológicos enfocados a la forma en que afecta el flúor al sistema nervioso sugieren que los individuos expuestos tienen un rendimiento intelectual menor al del resto de la población.¹⁶

Otros efectos negativos ligados a este elemento y de los cuales se tiene registro son enfocados a incremento de proteínas, entre las cuales se encuentran las que promueven la inflamación como las interleucinas y el TNF- α (presentes en procesos neurodegenerativos). También se ha reportado que produce daño a receptores de células neuronales, influye en la interrupción o disminución de la síntesis de neurotransmisores como la norepinefrina y la 5-hidroxitriptamina, altera así las conexiones neuronales, además, influye directamente en la cantidad de células de Purkinje (neuronas de gran tamaño que constituyen la unidad funcional del cerebelo, transmiten proyecciones inhibitorias a los núcleos del cerebelo y constituyen la única salida para toda la coordinación motriz en la corteza cerebral) lo que afecta la morfología de la corteza del cerebelo.¹⁷

Otro efecto documentado es que el flúor puede conducir a cambios en el flujo de iones (incluido un aumento de la salida del ion cloruro) y en el volumen de células nerviosas que causan trastornos metabólicos afectando el funcionamiento celular y, sobre todo, la transmisión de los impulsos nerviosos.¹⁸

La exposición al flúor produce cambios en las neuronas como la disminución de la expresión de tubulina y cuerpos ribosomales, también afecta procesos de apoptosis, disminuye la captación de glucosa pues hay menos presencia de receptores GLUT 1 (proteína transportadora de glucosa que mantiene la respiración celular por consumo basal de glucosa, una patología relacionada a su deficiencia es epilepsia, su sobreexpresión está relacionada a cáncer).¹⁶

También es asociado a padecimientos tales como ansiedad, trastornos del estado de ánimo, problemas de memoria, capacidad de comprensión y disminución del coeficiente intelectual, este último evaluado mediante los

registros de países como China e India en donde se halló que existía una disminución en la capacidad para desarrollarse en el ámbito intelectual a niños de edad escolar y adolescentes.¹⁹

El flúor tiene la capacidad de atravesar la barrera placentaria, al ocurrir esto llega con gran facilidad al cerebro del feto y puede llevar a deficiencias de comportamiento y cognitivas durante el desarrollo del niño.¹⁷

Otras afecciones asociadas al flúor y que involucra al sistema nervioso es la radiculomielopatía, en la cual se ve afectada la médula espinal, así como las raíces de los nervios espinales, lo que provoca que con el paso del tiempo se tenga dificultad motora debido a que existe una menor presencia de mielina que resulta en una menor conexión interneuronal o menor conducción nerviosa.^{11, 15}

SITUACIÓN DE LA FLUOROSIS DENTAL Y ESQUELETAL EN MÉXICO.

En México la Norma Oficial Mexicana NOM-127 SSA1 1996 establece que el límite de consumo de flúor por día no debe exceder 1.5 ppm esto con la finalidad de evitar daños como los anteriormente señalados en dientes, huesos, sistema nervioso, en órganos reproductores y riñones. Sin embargo, la fluorosis dental es un problema de salud endémico registrado de estados como Zacatecas, Durango, Jalisco, San Luis Potosí, Aguascalientes, Guanajuato y Baja California, algunos de los cuales no son considerados para la distribución de sal fluorada por el Programa Nacional de Fluoración de la sal, el cual dividió al país en tres zonas a las cuales se les proporciona sal fluorada, sal yodada o ambas.^{20, 21, 22}

La prevalencia de fluorosis dental es más alta en Durango, Chihuahua, Aguascalientes, Zacatecas y Jalisco, como se ha mencionado antes, la exposición a este elemento de forma no controlada se ha dado en la población mexicana, específicamente en estos estados, debido al consumo de agua de pozos que tiene una gran cantidad de flúor; diferentes estudios han reportado que existen cantidades de flúor en pozos y agua corriente que contienen desde

2.6 ppm, 4.6 ppm hasta 10 ppm, esto conlleva a un alto riesgo de padecer condiciones asociadas a un alto consumo de flúor y sufrir daños en diversas partes del organismo. Es mayor el riesgo que se corre ya que en algunos estudios realizados en nuestro país se registró que mucha del agua que se usa para cocinar o beber proviene directamente de la llave.^{23, 24}

Estudios realizados en poblaciones infantiles muestran que existen casos frecuentes de niños que presentan fluorosis dental, a la evaluación del agua de consumo se reportó que no excedía más de 1.5 ppm, lo que demuestra que no se está produciendo la fluorosis dental únicamente debido a la ingesta alta en flúor en agua, sino que también se debe a otros productos que contienen este elemento y están siendo consumidos por los niños, por ejemplo, refresco o jugos.²⁵

Aunque hay casos reportados sobre fluorosis esquelética y a pesar de que se conoce que se han dado en estados como Zacatecas, Durango y otros estados al norte, en nuestro país no existe mucha evidencia y registro sobre cómo ha afectado esta condición a nuestra población.

FACTORES PROINFLAMATORIOS ASOCIADO A LA EXPOSICIÓN A FLÚOR.

La inflamación es un mecanismo de respuesta ante diversos estímulos, sean de tipo biológicos, químicos o físicos, que de acuerdo con el nivel, intensidad y tiempo de evolución en que esté afectado el sitio lesionado puede derivar en dos tipos de inflamación: aguda o crónica.²⁶

La inflamación comúnmente se caracteriza por cinco signos cardinales: calor, dolor, rubor, edema y pérdida de la función. La inflamación aguda comienza en minutos u horas a partir del estímulo y se caracteriza por la presencia de células de la inmunidad innata (leucocitos, neutrófilos, mastocitos y algunas citocinas), generalmente al retirar el estímulo la fase aguda de la inflamación suele ser suficiente para resolver el problema y comenzar un proceso de cicatrización y dar pie a la rehabilitación de la zona, sin embargo, si esto no es así se da paso a la inflamación de tipo crónica que ocurre después de semanas, meses o años después de que el estímulo es persistente en la cual, células de la inmunidad adaptativa intervienen (linfocitos T principalmente).²⁷

Durante la respuesta de inflamación existen diversos factores que la median, como las citocinas, involucradas en redes extensas con interacciones sinérgicas, así como antagonistas que pueden llevar tanto a efectos negativos como positivos en varias células diana, otros son los eicosanoides, como los leucotrienos y el ácido araquidónico, así como moléculas de adhesión, también están involucrados los linfocitos B y T.^{28, 29}

La inflamación es un proceso que permite la rehabilitación de la zona afectada y es hasta cierto punto aceptable, sin embargo, cuando es persistente y no se retira el estímulo que la está causando conduce al daño de tejido, pérdidas, enfermedades autoinmunes, cáncer, fibrosis y condiciones de envejecimiento.

Se ha reportado la presencia de factores que promueven la inflamación en diversos órganos, cuando se ha estado expuesto a flúor en grandes cantidades

durante tiempos prolongados, principalmente en la fluorosis esquelética, entre estos factores se encuentran: citocinas, péptidos que regulan la comunicación célula a célula, interleucinas como IL-1B, la IL-6 y el TFN- α , todas éstas secretadas por células como linfocitos B, macrófagos, adipocitos, células musculares y microgliales.^{15, 16}

Además, existen reportes de estudios en roedores en los que se describe que, en estado de fluorosis, específicamente cuando el consumo de flúor es mayor al del límite permitido 1.5 ppm y superando incluso los 10 ppm al día, ha influido disminuyendo la expresión de neurotransmisores como norepinefrina.³⁰

INTERLEUCINA 17 (IL-17)

La interleucina 17 o en su forma abreviada IL-17 es una citocina con estructura dimérica que cuenta con un peso molecular de 35 kDa, posee 132 aminoácidos, y su gen se ubica en el cromosoma 6p12. Es producida por células T cooperadoras Th17 que activan a las células T CD4+, CD8+, linfocito T, natural killer, ILC3s, regula la expresión de algunas citocinas, quimiocinas, proteínas relacionadas con apoptosis. Existen reportes que mencionan que están también en neutrófilos y microglía. Otras células que las producen son los linfocitos $\gamma\delta$ y células linfoides innatas, por lo que se puede hallar en epitelios.^{31, 32, 33, 34, 35}

El descubrimiento de la interleucina 17 es reciente, es una familia de seis interleucinas nombradas de la A a la F, IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E, IL-17F, dichas interleucinas se asocian diversos estados de inflamación, así como a padecimiento tales como cáncer.³⁰

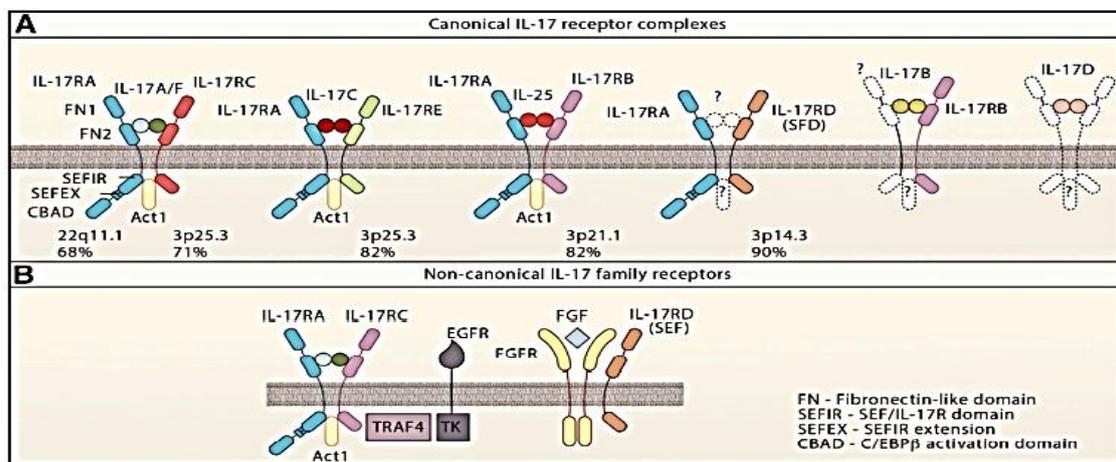


Imagen 1 (31). Complejos receptores de la familia IL-17.

La función principal de ésta en el humano, es intervenir en la defensa ante un patógeno, principalmente contra bacterias y hongos. También promueve el reclutamiento de células de la inmunidad como macrófagos, además, es esencial para mantener la homeostasis del sistema inmune. Otra de las funciones son la adhesión de células inmunes, unión de células fagocíticas, respuesta inflamatoria, migración leucocitaria, conduce a la producción de IL-6 e IL-8 y la molécula de adhesión intercelular en fibroblastos humanos, promueve la respuesta de los fagocitos y está involucrada en la inflamación asociada a la edad y a enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y Parkinson.^{29, 32}

Los objetivos o blanco de la IL-17 incluyen a citocinas proinflamatorias, hematopoyéticas, quimiocinas, péptidos antimicrobianos, células mieloides y células mesenquimales, además, se ha descrito que dicha interleucina provoca principalmente la inflamación del tejido en el que se encuentra.³⁶

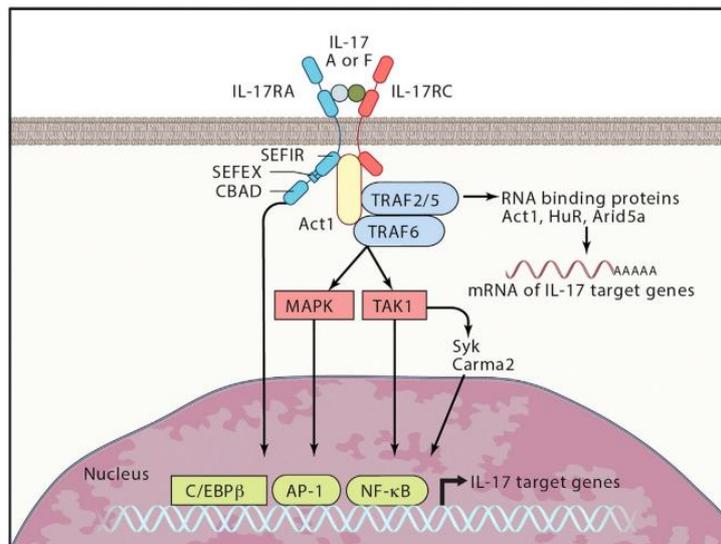


Imagen 2 (31). Vías de señalización de IL-17.

La desregulación de la IL-17 induce a procesos inflamatorios ya que se ha visto involucrada en diversas enfermedades como: lupus eritematoso sistémico, asma, psoriasis, enfermedad intestinal inflamatoria, artritis reumatoide, promueve la actividad del osteoclastica cuando activa a las células TH17 induciendo a la expresión de RANK (receptor activador del factor nuclear kB), provocando pérdida ósea y reabsorción, cabe mencionar que este receptor también es expresada por células dendríticas; otras enfermedades en las que se

ha encontrado la expresión de dicha citocina es la esclerosis múltiple, la enfermedad periodontal, enfermedad de Crohn y Alzheimer.^{30, 37}

Muchas de las pruebas que se han realizado sobre IL-17 cuando se produce en cerebro indican que posee un papel patógeno ya que promueve la inflamación y degeneración neuronal y se asocia a accidente cerebrovascular en roedores. Además, exacerba las enfermedades autoinmunes que atacan al cerebro, su aumento dificulta la recuperación cuando existe isquemia cerebral; en pacientes pediátricos que padecían epilepsia los niveles de IL-17 fue en aumento. Otros estudios en modelos murinos demostraron que la presencia de IL-17 exacerbo síntomas similares a la depresión y fatiga.³¹

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La fluorosis es un problema de salud pública endémica en México, hay registros de la presencia del flúor en el agua que superan los límites permitidos por la OMS (0.5-1.5 ppm). Se conocen alteraciones causadas por altos consumos de F, como fluorosis esquelética y dental. Más aún, existe evidencia de afectaciones al sistema nervioso central asociados a este elemento, es aquí dónde surge la pregunta, si ¿la exposición a altas concentraciones de flúor, semejante a la dosis conocida que ocasiona fluorosis dental en un modelo *in vivo*, puede promover alteraciones inflamatorias en el sistema nervioso central?

JUSTIFICACIÓN

El modelo animal de fluorosis dental no ha sido asociado a la presencia de la inflamación en cerebro u otra estructura del sistema nervioso central, por lo que evaluar la expresión de molécula de interleucina 17 (IL-17) nos podría indicar las posibles alteraciones causadas por las altas concentraciones del ion F.

Ya que la IL-17 es marcador proinflamatorio presente en diversas enfermedades crónico-degenerativas; y considerando que el flúor es un elemento asociado a efectos negativos en el sistema nervioso, pues promueve el deterioro de diversas células y que además produce cambios alterando los impulsos nerviosos. Por lo que, la presencia de esta citocina podría indicar y explicar mecanismos inflamatorios en tejidos no mineralizados y su posible asociación a un futuro proceso neurodegenerativo.

HIPÓTESIS

La exposición de 10 ppm de NaF (fluoruro de sodio) de ratas de la cepa Wistar desde su nacimiento hasta la adultez (6 meses), induce la expresión del marcador proinflamatorio IL-17 en estructuras del sistema nervioso central de la rata.

OBJETIVOS

General:

Evaluar la expresión de la interleucina IL-17 en estructuras del sistema nervioso central de rata de la cepa Wistar, expuestas al fluoruro de sodio durante 6 meses.

Específicos:

Determinar la presencia de alteraciones en esmalte causadas por el flúor a través de la estructura de los órganos dentales de las ratas.

Evaluar si existe alguna diferencia en tamaño o cambio en estructura anatómica en los cerebros de las ratas controles y experimentales.

Determinar la expresión de la IL-17 a través de la técnica inmunohistoquímica en estructuras del sistema nervioso central de rata expuestas a flúor.

TIPO DE ESTUDIO:

Experimental transversal descriptivo observacional:

VARIABLES:

Independientes

Grupo control sin exposición a dosis altas de flúor.

Grupo experimental expuesto a dosis altas de flúor.

Dependientes

Expresión de interleucina 17 en estructuras del sistema nervioso central de rata expuesta a dosis elevadas de flúor.

METODOLOGÍA.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizaron veinte ratas de la cepa Wistar que fueron alojadas en el Bioterio de la Facultad de Odontología; se dividieron en 2 grupos, control y experimental de 10 ratas cada uno, posterior al destete. Cada grupo estuvo dividido en hembras y machos, sin embargo, no se tomó en cuenta este criterio para el análisis de resultados, es decir, fueron todas incluidas en sus respectivos grupos. Todas aquellas ratas que presentaron algún signo o síntoma de enfermedad o infección fueron descartadas.

Tanto el grupo control como el grupo experimental se mantuvieron por un periodo de seis meses, desde su nacimiento hasta la eutanasia, consideradas adultas jóvenes.

Se les proporcionó una dieta *ad libitum* tanto en agua como en comida y tuvieron ciclos de 12 horas (día y noche). No se llevó un registro de la cantidad de agua y comida que consumen ya que se proporcionó a libre demanda.

Se realizó una inducción semejante al modelo *in vivo* de fluorosis dental realizado por Jedeon et al ³⁸ y Błaszczyk et al ³⁹; es por ello que el tipo de agua que se le proporcionó del grupo control fue agua embotellada (Skarch - etiquetado: cada 100 ml contiene: 0 kcal, proteínas 0g, grasas 0g, carbohidratos disponibles: 0g, azúcares 0g, fibra dietética 0g, sodio <1.7mg); mientras que al grupo experimental se le proporcionó la misma agua embotellada a la cual se le agregara 10 mg/L de NaF (Sodium Fluoride, Powder, U.S.P., J.T.Baker™)

Ambos tipos de agua en su respectivo grupo se proporcionó desde el nacimiento por medio de hembra que los crió, cuando se realizó el destete se colocó su propio bebedero a cada grupo. El recambio del agua fue cada 3 días.

Una vez concluido el periodo de 6 meses, se aplicó la eutanasia de todas las ratas mediante cámara de CO₂.

Inmediatamente realizada la eutanasia se tomaron fotografías de los dientes con cámara del microscopio OPMI PICO ZEISS que se encuentra en el bioterio de la Facultad de Odontología.

Se obtuvieron las estructuras del sistema nervioso central, se tomaron fotografías con microscopio OPMI PICO ZEISS y se pesaron, una vez concluido esto, se preservaron en formol al 10%, para su fijación y se mantuvieron durante tres días para su posterior procesamiento histológico.

Se obtuvieron cortes histológicos del sistema nervioso central de ambos grupos a los cuales se les realizó inmunohistoquímica con método de peroxidasa y tinción con hematoxilina y eosina, dichas técnicas se realizaron en Laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados de la División de estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología.

--TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA CON MÉTODO DE PEROXIDASA:

Se desparafinó las laminillas colocándolas en una parrilla a 55-60°C durante 5 minutos, posteriormente pasar las laminillas por Xilol, Xilol-OH y alcohol al 96%, 80%, 70% y agua bidestilada, durante 20 minutos cada uno.

Se realizaron 2 lavados con Tris-HCl (6.1g de Tris Hydrochloride + 500 ml de H₂O destilada + .337 ml de HCl 1M, aforar a 1000 ml y llevar a pH 7.6) por 5 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.

Posteriormente con solución bloqueadora de peroxidasa endógena con metanol-peróxido al 3% (9 ml de metanol + 1 ml H₂O₂ al 30% marca Baker) se bloqueó durante 10 minutos. Lavar con Tris-HCl (pH 7.6) por 5 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente, dos veces.

Se delimitó los tejidos con plumón hidrofóbico.

Se bloqueó las proteínas inespecíficas con Tris-HCl BSA al 1% y tritón (10 ml de buffer de tris HCl 0.5 M + 0.1g de albúmina sérica bovina + 1 ul de tritón x100 (0.01%)) durante 60 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente, posterior a esto se decanta el líquido.

Posteriormente se inició la incubación del anticuerpo primario IL-17 (G4) HRP cat: SC-374218 (Santa Cruz Biotechnology, USA) 1:100 monoclonal, durante 24 horas a 4°C en cámara húmeda.

Una vez incubado durante un día el anticuerpo primario, se realizaron 3 lavados con Tris-HCl por 5 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda.

Se incubó el anticuerpo secundario biotinilado diluido en Tris BSA al 1%, durante 60 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces con Tris-HCl durante 5 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.

Se colocó HRP diluido con Tris BSA al 1%.

Se lavó 3 veces con Tris-HCl durante 5 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.

Posteriormente el revelado se realizó con diaminobencidina (DAB) (1:10), monitorear el revelado con el microscopio durante 1 minuto y medio.

Se lavó con agua bidestilada dos veces y contrateñir con hematoxilina de Harris por 1 minuto y 30 segundos.

Se lavó con agua corriente hasta aclarar la laminilla y se pasó sobre la laminilla agua amoniacal por 10 segundos y luego agua bidestilada.

Por último, se deshidrataron las muestras con alcohol al 70%, 80%, 96%, alcohol-xilol y xilol, durante 5 minutos cada una y se colocó resina en la laminilla y un cubreobjetos para proteger.

-TÉCNICA DE HEMATOXILINA Y EOSINA⁴⁰:

Se desparafinó las muestras colocándolas en una parrilla a 55-60°C durante 5 minutos, para hidratar las muestras se pasaron las laminillas por Xilol, Xilol-OH y alcohol al 96%, 80%, 70% y agua bidestilada, durante 5 minutos.

Se procedió a la tinción con hematoxilina: incubando en una solución de hemalumbre por 10 minutos.

Se lavó con agua corriente para eliminar el exceso de tinción.

Se sumergió las laminillas en una solución alcohol-ácido por 20 segundos y se lavó con agua corriente.

Posteriormente se realizó la tinción con eosina: sumergiendo en eosina durante 2 minutos y se lavó con agua corriente para retirar restos.

Se deshidrataron las muestras con alcohol al 70%, 80%, 96%, alcohol-xilol y xilol, durante 5 minutos cada una.

Se colocó un sellador, en este caso resina y un cubreobjetos para proteger.

ANÁLISIS DE FOTOMICROGRAFÍAS:

Se obtuvieron las fotomicrografías de los cortes de las estructuras del sistema nervioso con ayuda del microscopio óptico Axioskop 2, cámara AxioCam MRc 5 y el software ZEN de la marca Carl Zeiss, a un objetivo de 5X, 10X, 20X, 40X de las laminillas tratadas con ambas técnicas, con la misma intensidad de luz, 3 en un rango del 1 al 10, un diafragma de iris a la misma apertura (3/4), con un tiempo de exposición de 2.75 y con resolución en pixeles de 2584 x 1936. Este procedimiento se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados de la División de estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología.

Las fotomicrografías tratadas con ambas técnicas fueron analizadas y descritas por un patólogo certificado.

A las imágenes obtenidas a un objetivo de 20x que fueron tratadas con inmunohistoquímica se realizó el análisis digital con el software Fiji (ImageJ), se midió la densidad óptica (DO) que arroja el color café de la tinción por DAB. Se eliminó el fondo sobrante de la imagen con el objetivo de acercarlo al blanco.

Posteriormente se hizo una deconvolución de colores, es decir, se separó la imagen en tres colores (azul, café y verde), se seleccionó la imagen en tonos cafés. Se convirtió la fotomicrografía a una imagen de 8 bits, que corresponde a tener 264 tonos de grises en la imagen, posteriormente, se delimitó la intensidad de color mediante un cromado que utiliza un histograma, esto con la finalidad de descartar la tinción inespecífica que se pudiera encontrar en la fotomicrografía. Por último, en la imagen resultante, el programa delimitó las zonas que resulten positivas a la tinción, siendo esta delimitación la que nos dará como resultado un área en píxeles, un promedio, un máximo y un mínimo de color. El procedimiento fue realizado en el Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga" en el Laboratorio en Inmunoparasitología.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Una vez obtenidos los resultados con software Fiji (ImageJ) se realizó la prueba T de Student no pareada con el objetivo de encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos, siendo un valor p menor a 0.05 considerado significativo.

RESULTADOS.

Fotografías descriptivas de los dientes, grupo control:

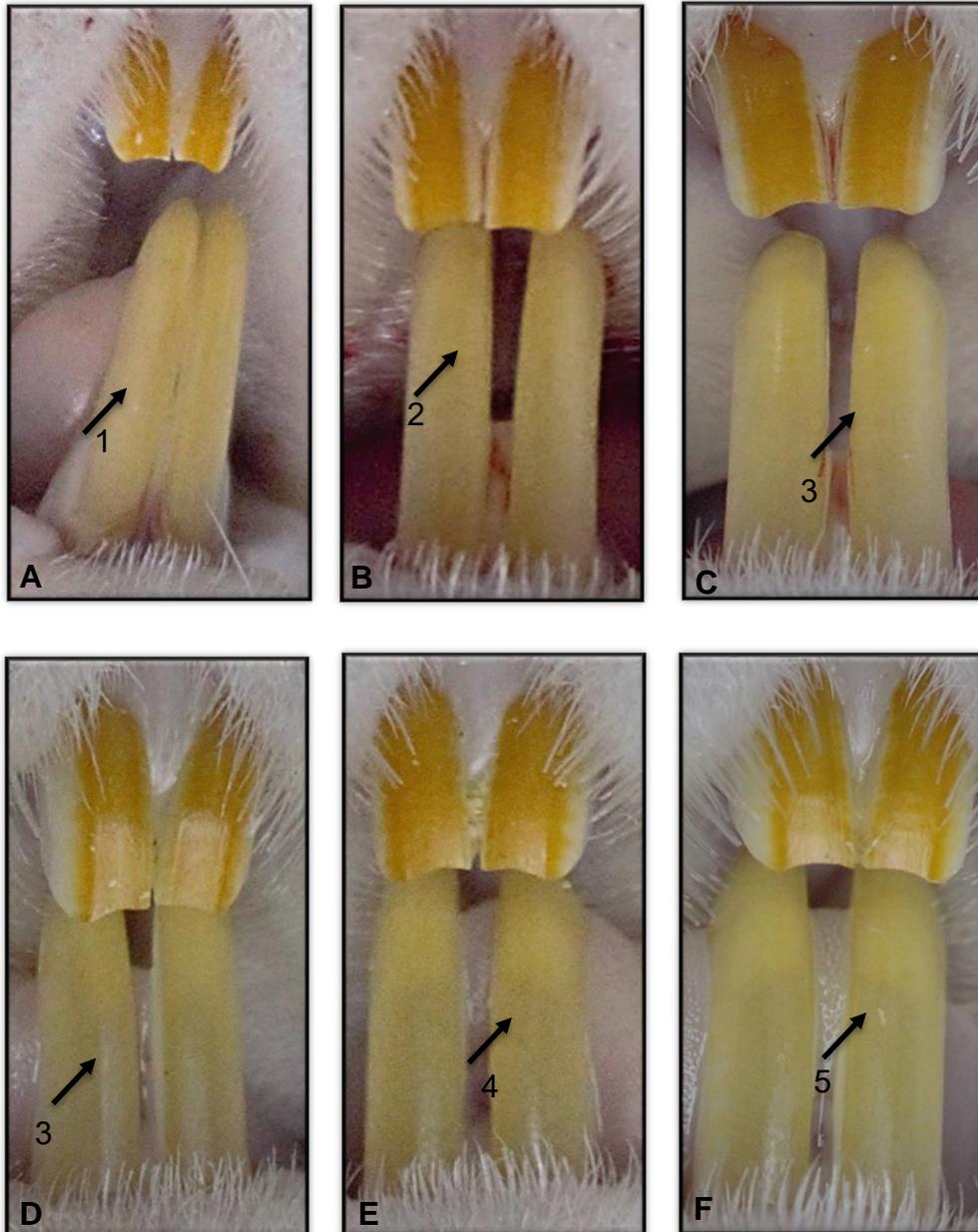


Figura 1. Dientes incisivos centrales de ratas controles (A, B, C, D, E, F).

Las fotografías del grupo control, fueron tomadas posterior a la eutanasia, se observa una tonalidad amarillo uniforme a lo largo de los incisivos de las ratas (1,2,3,4,5).

No se registraron fracturas y fisuras ni otras alteraciones anatómicas.

Fotografías descriptivas de los dientes, grupo experimental:

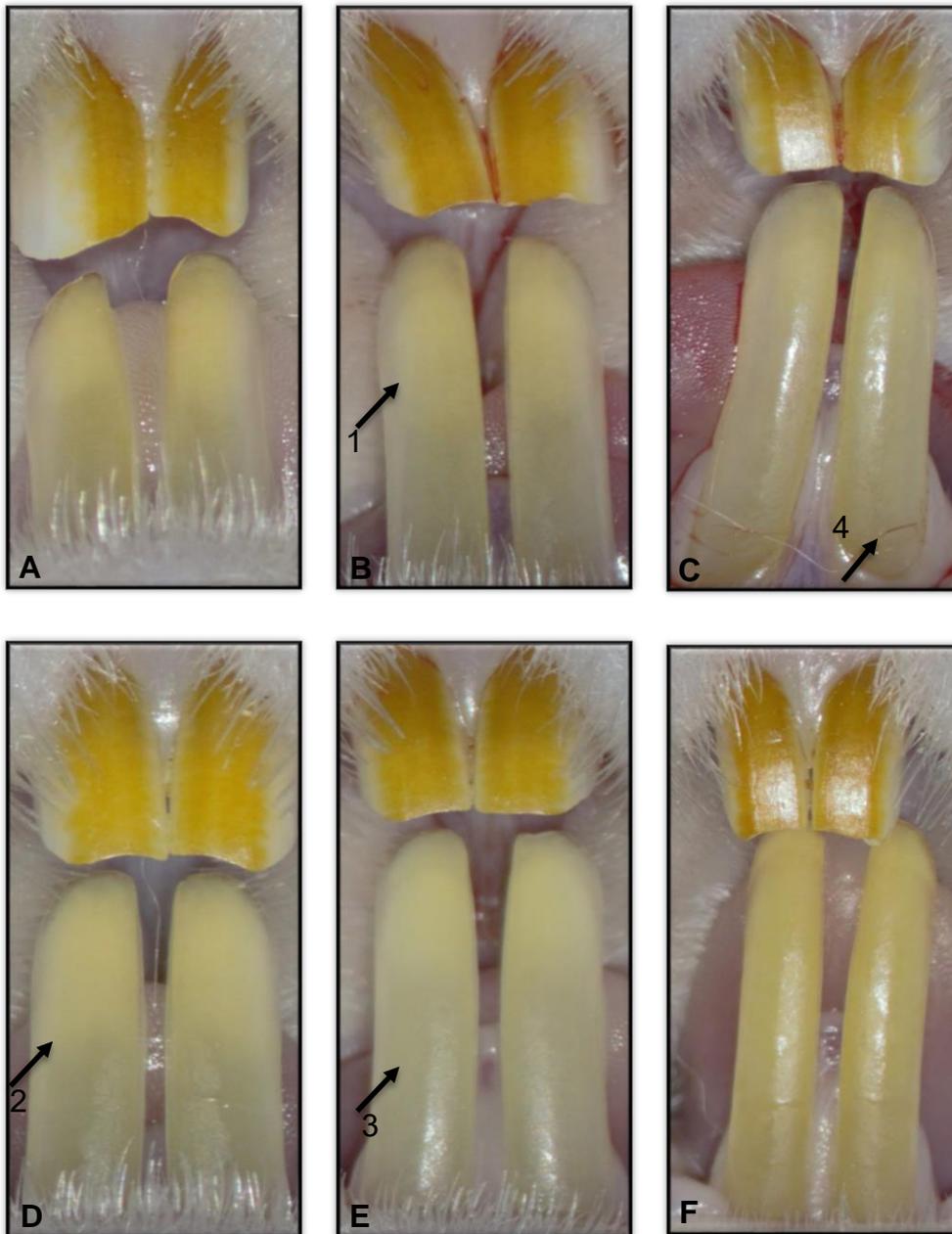


Figura 2. Dientes incisivos centrales de ratas experimentales (A, B, C, D, E, F).

Los incisivos fueron registrados después de la eutanasia, se observa una tonalidad más baja, beige o blanquecina **(1,2,3)**, que en los dientes de las ratas del grupo control, de acuerdo con lo reportado en el artículo de Jedeon *et al*⁸⁸, existen signos de hipomineralización y de fluorosis propia en ratas. También fue registrado fisuras y fracturas **(4)** en los incisivos.

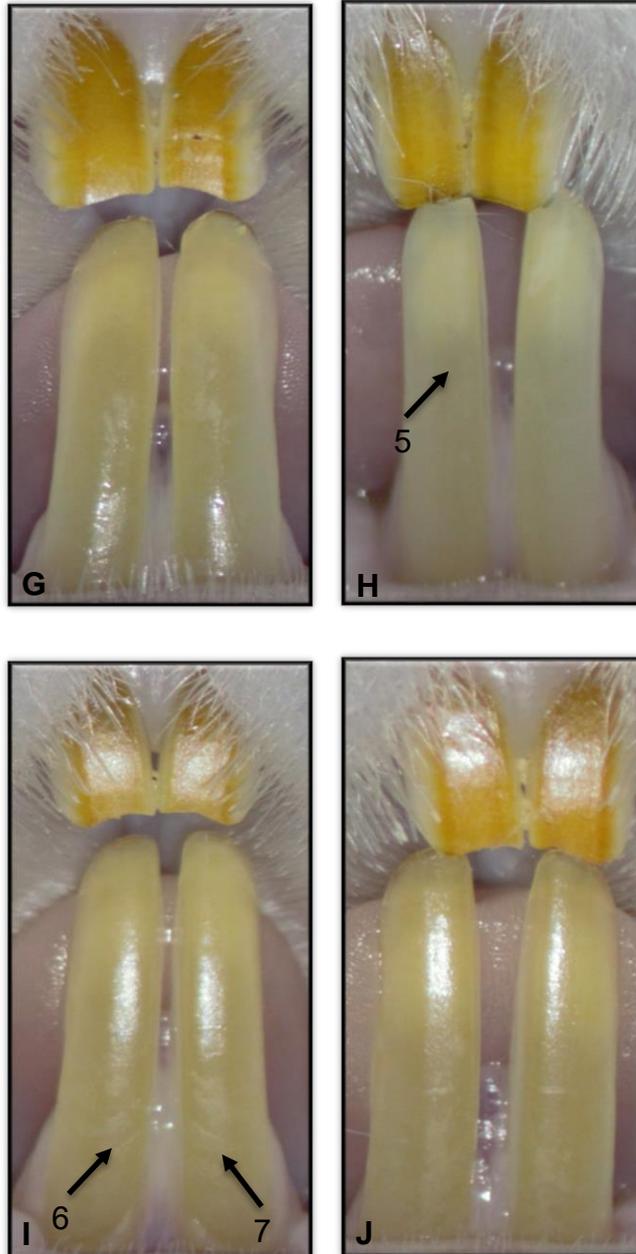


Figura 3. Dientes incisivos centrales de ratas experimentales (G, H, I, J).

Los incisivos fueron registrados después de la eutanasia, se observa una tonalidad blanquecina y más opaca (5), además se pueden ver ligeras bandas en tonos diferentes, blancos y amarillos (6, 7) signos de hipomineralización y de fluorosis dental en ratas reportados en el artículo de Jedeon *et al*⁸.

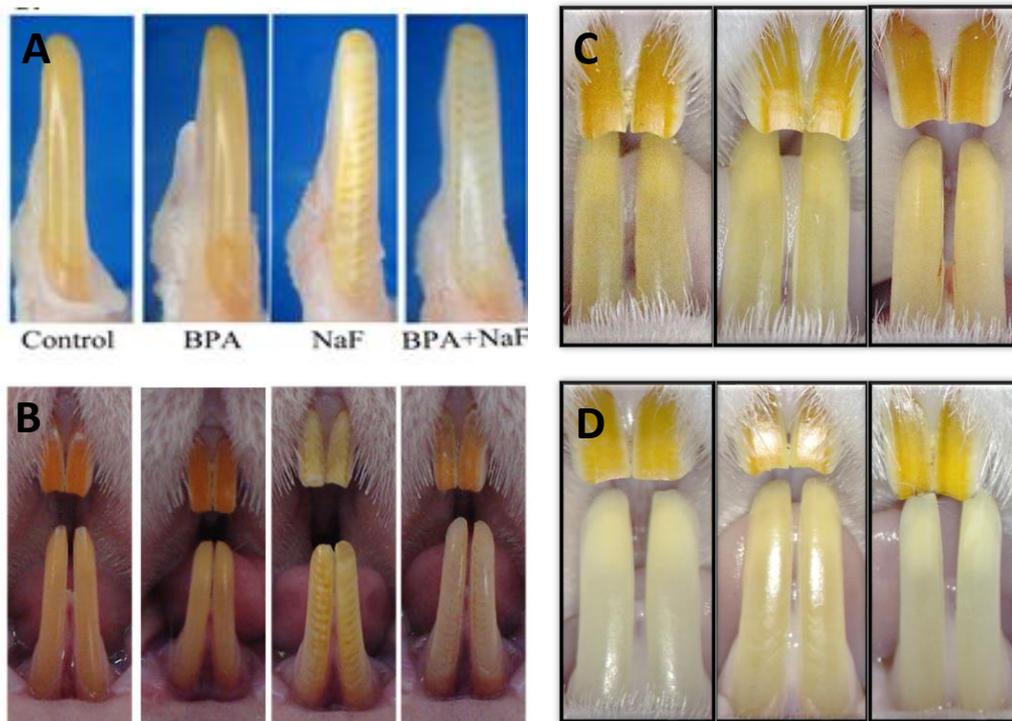


Figura 4. Modelo animal de fluorosis dental de Jedeon *et al*³⁸ (A, B) comparados con los grupos controles (C) y experimentales (D) de nuestro experimento.

Fotografías descriptivas de las estructuras del sistema nervioso, grupo control:

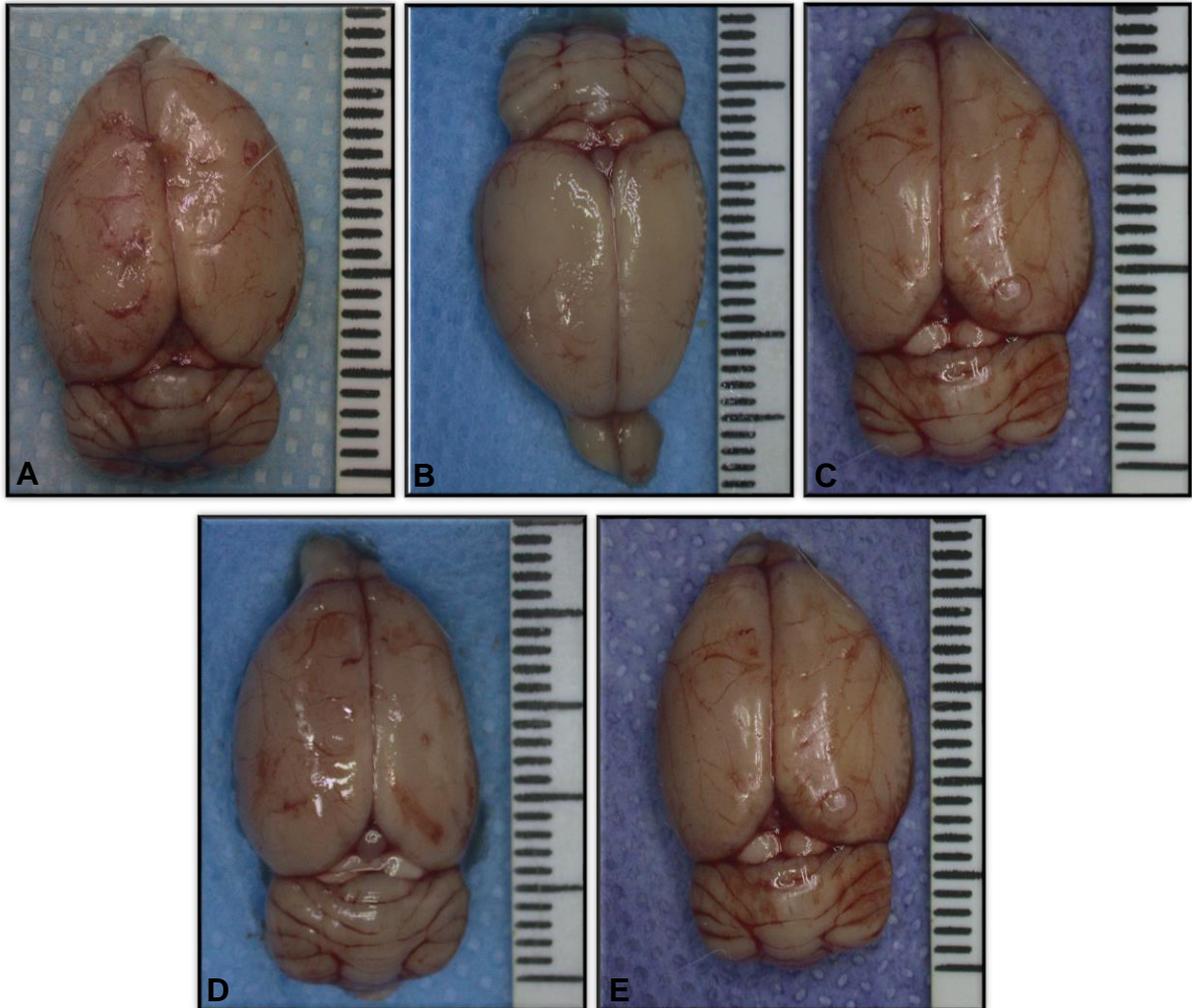


Figura 5. Estructuras del sistema nervioso central de ratas control (A, B, C, D, E).

Las estructuras fueron extraídas al momento de la eutanasia de las ratas, se presentaron con una consistencia gelatinosa blanda, con uno color rosa pálido a grisáceo, con buena hidratación; se pesaron y se midieron desde el borde frontal al borde occipital y de los hemisferios derecho e izquierdo en sus porciones más anchas obteniendo los siguientes resultados: **A)** 2 grs. medidas: 2.2x1.6 cm. **B)** 2 grs medidas: 2.3x1.5 cm. **C)** 2 grs. medidas: 2.2x1.6 cm. : **D)** 2 grs. medidas: 2.3x1.5 cm. **E)** 2 grs. medidas: 2.2x1.6 cm.

Fotografías descriptivas de las estructuras del sistema nervioso, grupo experimental:

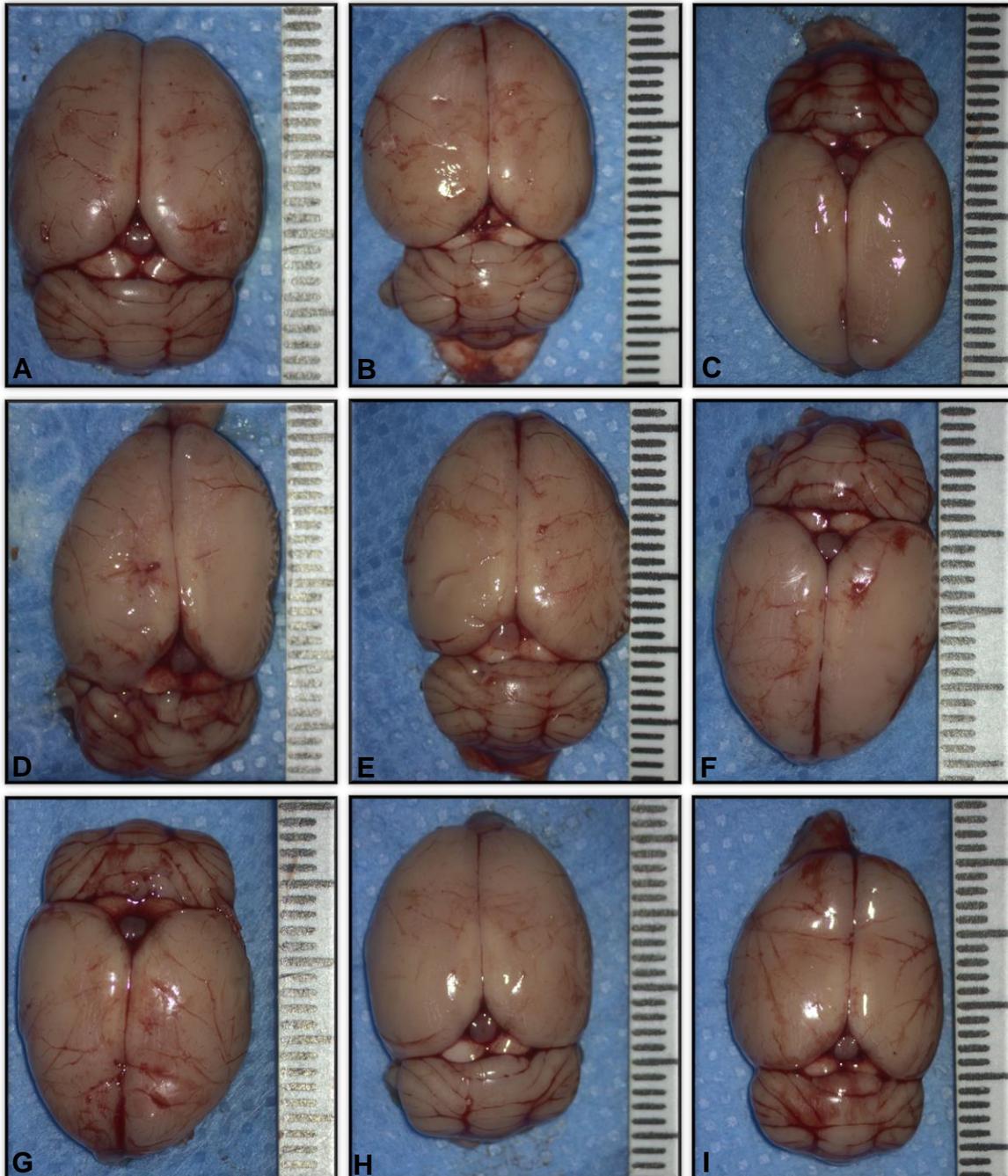


Figura 6. Cerebros de ratas experimentales (A, B, C, D, E, F, G, H, I).

Una vez realizada la eutanasia se procedió a la extracción de las estructuras, presentaron con una consistencia gelatinosa más firme (respecto al grupo control), con un color rosa brillante, con buena hidratación; se pesaron y se midieron desde el borde frontal al borde occipital y de los hemisferios derecho e izquierdo en sus porciones más anchas obteniendo los siguientes resultados: **A)** 3 grs. medidas: 2.2x1.6 cm. **B)** 3 grs medidas: 2.3x1.7 cm. **C)** 3 grs. medidas: 2.4x1.6 cm. **D)** 3 grs. medidas: 2.5x1.7 cm. **E)** 3 grs. 2.5x1.5 cm. **F)** 3 grs. medidas: 2.2x1.6 cm. **G)** 3 grs. medidas: 2.2x1.6 cm. **H)** 3 grs. 2.2x1.5 cm. **I)** 3 ars. medidas: 2.2x1.7 cm.

Fotomicrografías de cortes de cerebelo, tinción hematoxilina y eosina (HyE). Grupo control:

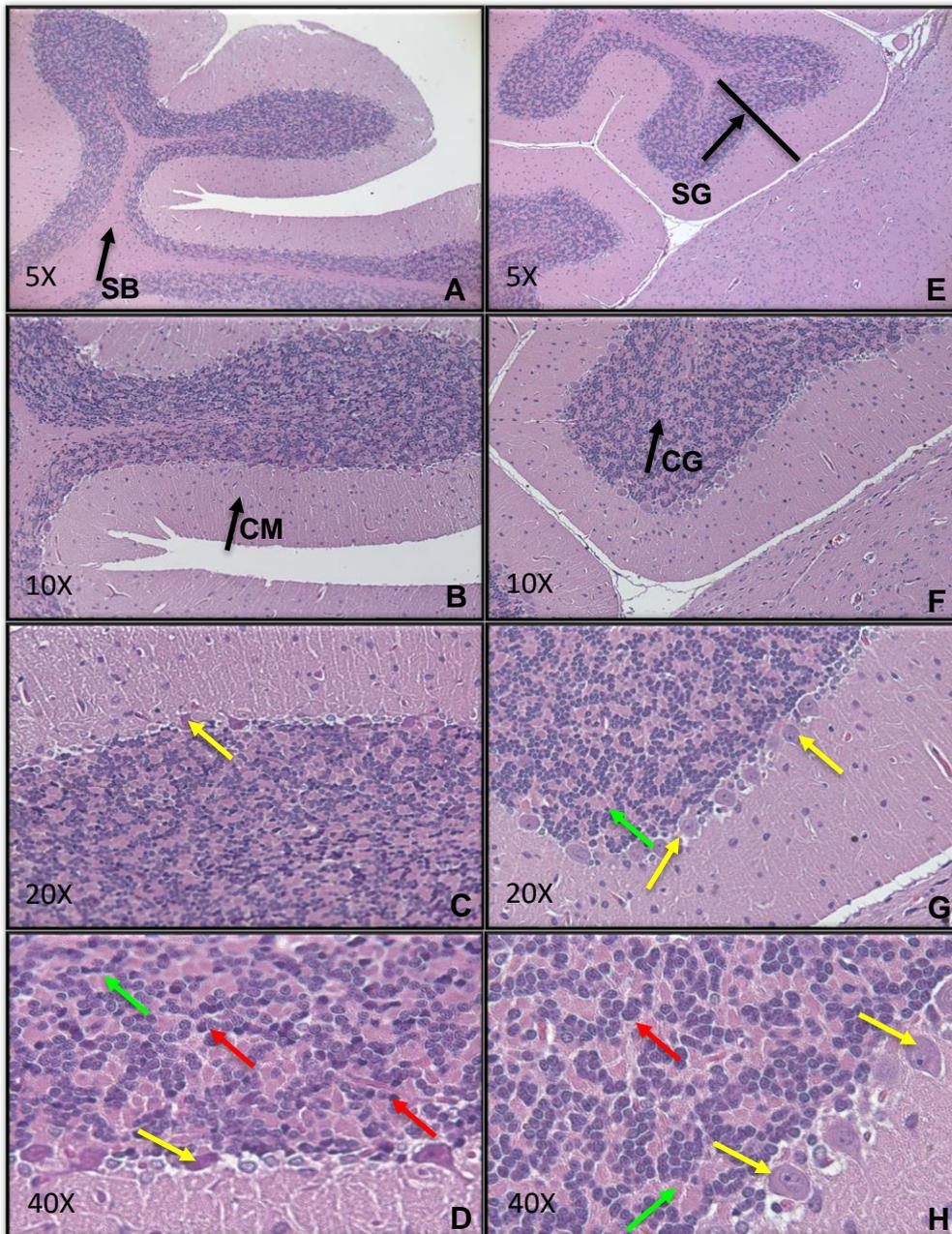


Figura 7. Fotomicrografías de cortes de cerebelo controles tinción HyE (A, B, C, D, E, F, G, H).

Se obtuvieron cortes de cerebelo, los cuales se tiñeron con hematoxilina y eosina, en las fotomicrografías se observa la sustancia blanca (SB) y la sustancia gris (SG) en la cual la capa molecular (CM), la capa granulosa (CG) se encuentra bien definidas y rodeadas por las células de Purkinje (flechas amarillas). En particular en la capa granulosa se observan un conjunto de células basófilas (flechas rojas) bien delimitadas por un estroma eosinófilo (flechas verdes).

Fotomicrografías de cortes de cerebelo, inmunohistoquímica con técnica de peroxidasa. Grupo control:

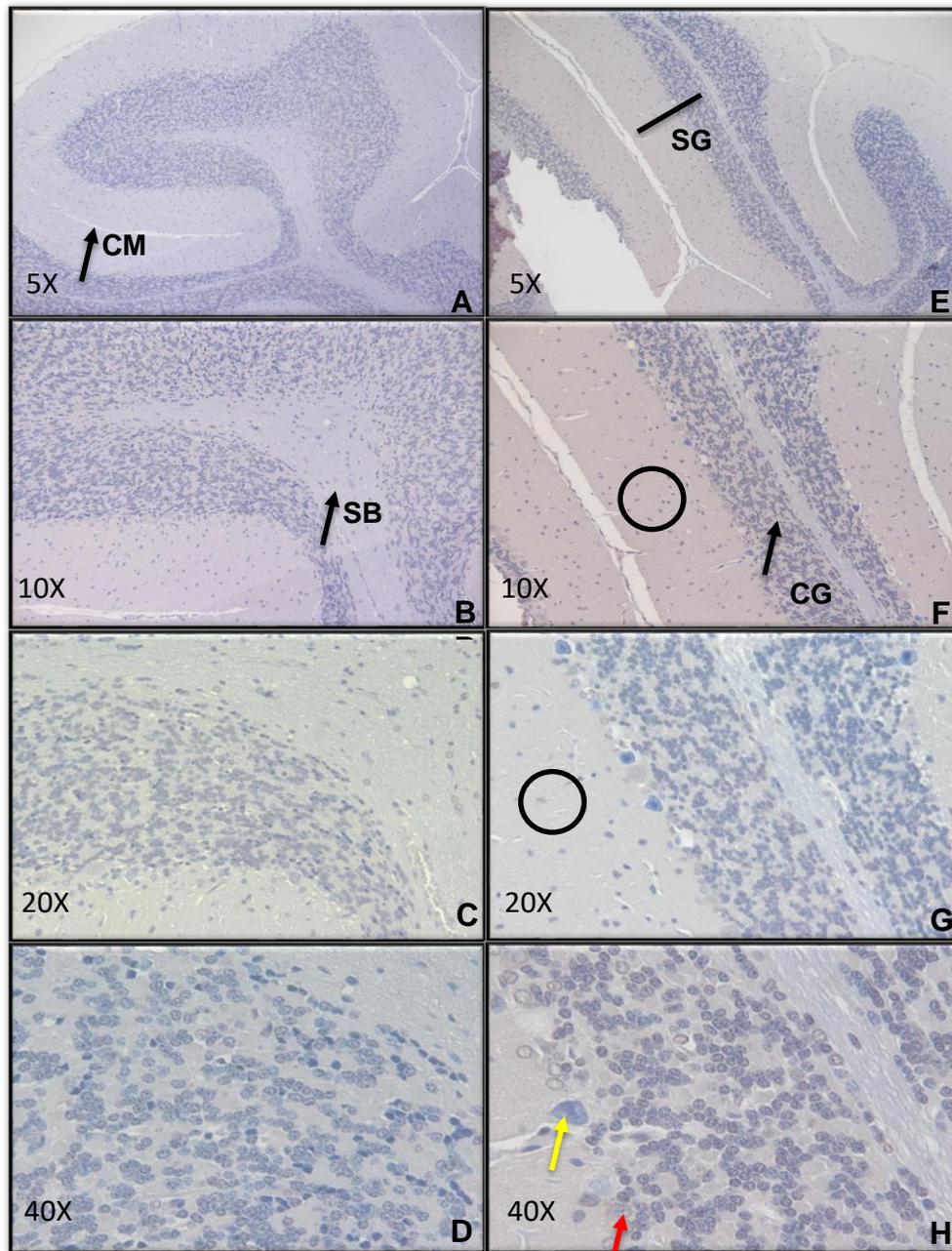


Figura 8. Fotomicrografías de cortes de cerebelo controles con inmunohistoquímica (A, B, C, D, E, F, G, H).

Se obtuvieron cortes de cerebelo a los cuales se le realizó inmunohistoquímica con técnica de peroxidasa, en las fotomicrografías se observa la sustancia blanca (**SB**) y la sustancia gris (**SG**), durante el análisis se observó que en la primera columna la capa molecular (**CM**), la de Purkinje (**CP**), la granulosa (**CG**) y la sustancia blanca son negativas (color más azul o morado) para IL-17.

El análisis realizado a la segunda columna muestra **(A-D)** a la capa granular negativa a IL-17, a la sustancia blanca negativa, se encontraron zonas en matriz extracelular de CP positivas **(circulo)**, algunas células de Purkinje son negativas a IL-17 **(flecha amarilla)**, sin embargo, se detectaron algunas de éstas positivas a IL-17 **(flecha roja)**, siendo más cafés las células.

Fotomicrografías de cortes de cerebelo, tinción de hematoxilina y eosina.

Grupo experimental:

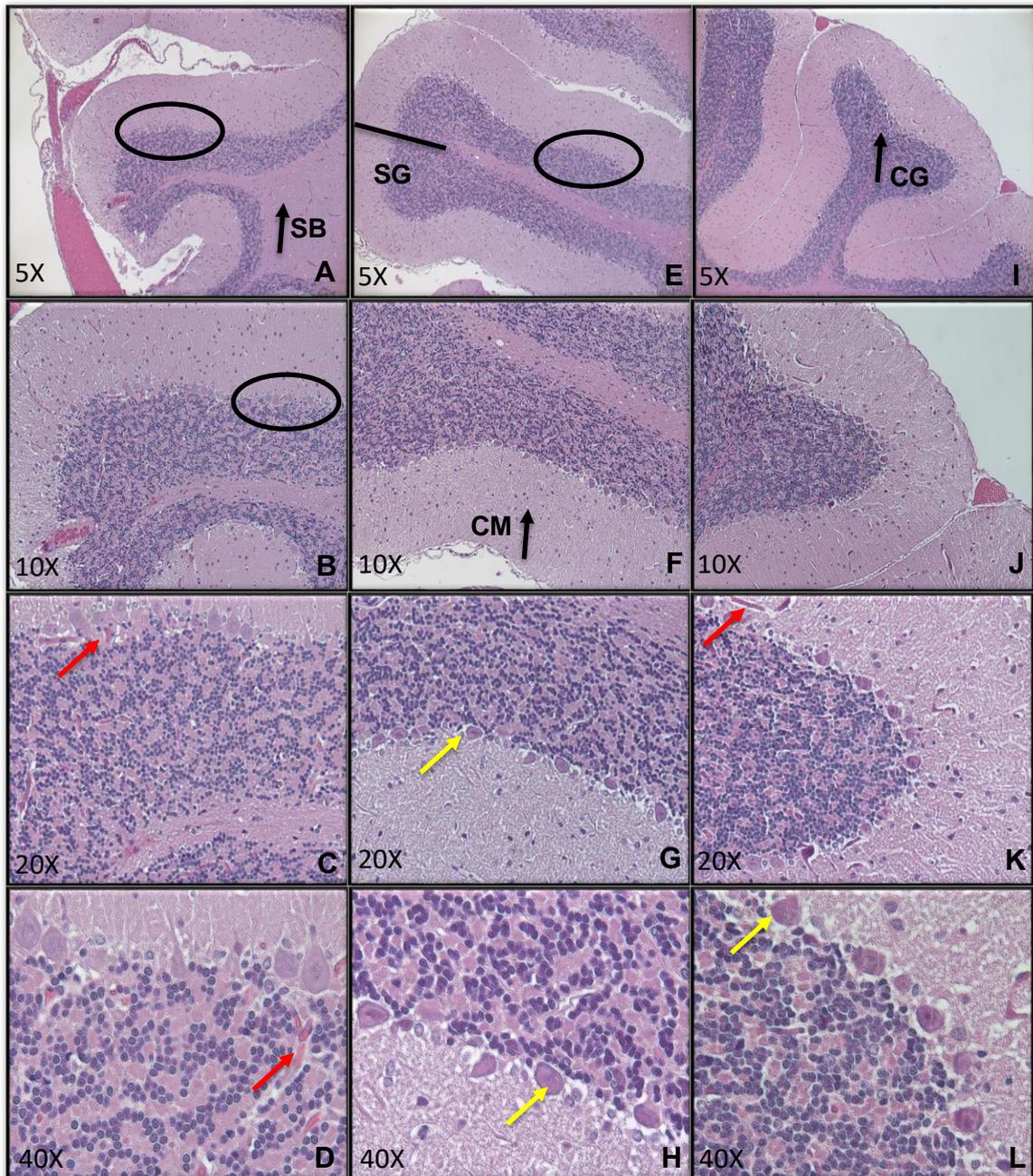


Figura 9. Fotomicrografías de cortes de cerebelo experimentales tinción HyE (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L).

Se obtuvieron cortes de cerebelo, los cuales se tiñeron con hematoxilina y eosina, al igual que en el grupo control, en las fotomicrografías se observa la sustancia blanca (SB) y la sustancia gris (SG), a diferencia del grupo control presenta zonas con mayor vascularización (flechas rojas), la capa granulosa (CP) se observa difusa con las células entremezcladas con las de la de matriz extracelular de la CM (círculos) y las células de Purkinje son de apariencia normal (flechas amarillas).

Fotomicrografías de cortes de cerebro, inmunohistoquímica con técnica de peroxidasa. Grupo experimental:

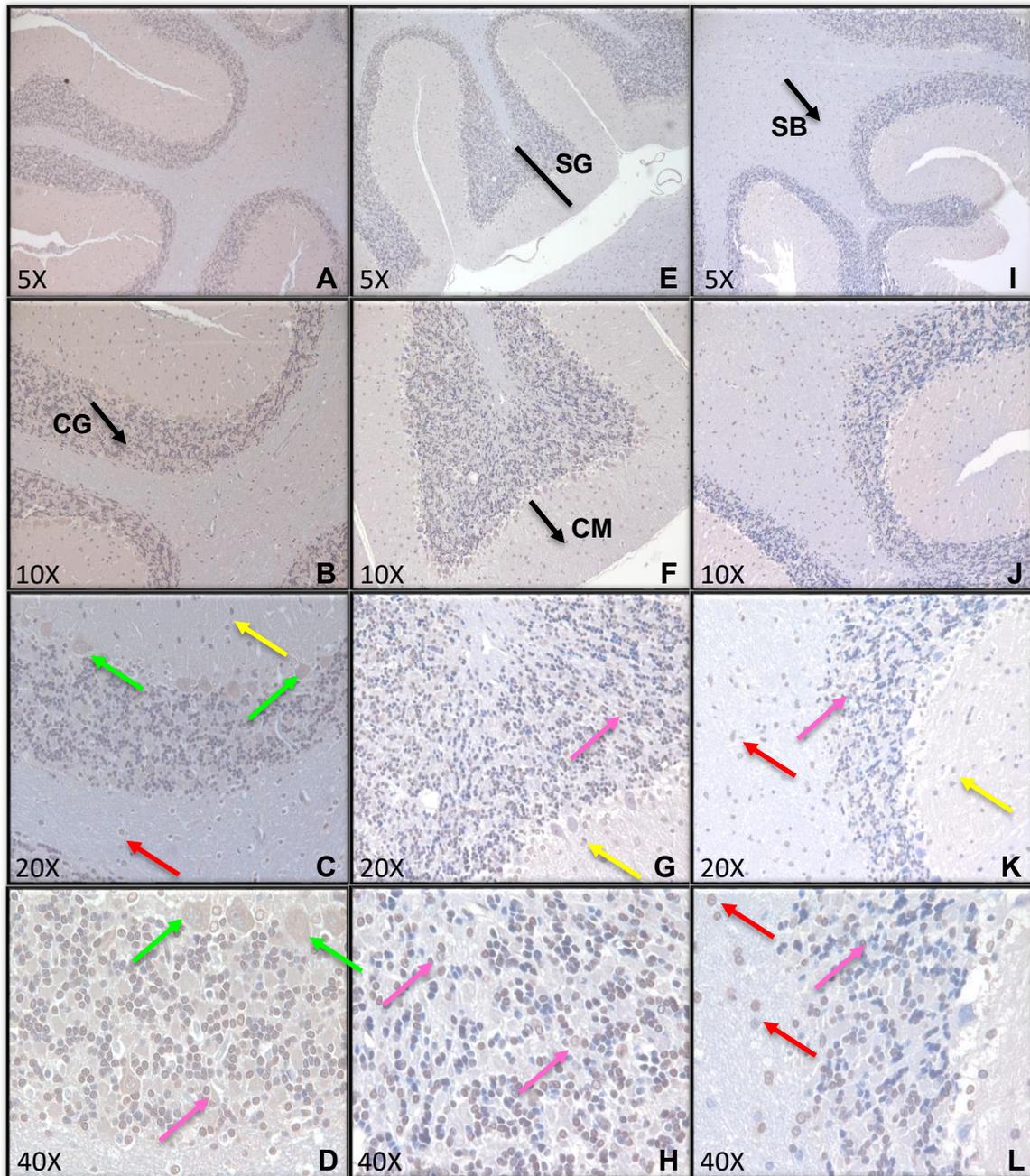


Figura 10. Fotomicrografías de cortes de cerebelo experimentales con inmunohistoquímica (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L).

Se obtuvieron cortes de cerebelo a los cuales se le realizó inmunohistoquímica con técnica de peroxidasa, en las fotomicrografías se observa la sustancia blanca (**SB**) y la sustancia gris (**SG**), durante el análisis se observó que dentro de la sustancia blanca se encuentran zonas con núcleos y citoplasmas positivos a IL-17 (**flechas rojas**).

Así también, existe positividad en la matriz extracelular de la capa molecular **(CM)** **(flechas amarillas)**; la capa de células de Purkinje es positiva a IL-17**(flechas verdes)**; la capa granulosa **(CG)** es positiva de forma difusa y en algunas zonas se presente dispuesta en parches **(flechas rosas)**.

Análisis digital de fotomicrografías y análisis estadístico.

Análisis Estadístico: T de Student no pareada.

Es una prueba estadística por medio de la cual se pueden comparar dos grupos de muestras aleatorias, es decir, es aplicado al análisis de la varianza de dos grupos; también puede ser utilizado al análisis de varios grupos, pero siempre por parejas.⁴¹

Para calcular la proporción de T deben ser conocidos dos factores:

- Diferencia de las medias de las muestras
- Error estándar (EE) de esta diferencia.

$$T = \frac{\text{Diferencia de la media de las muestras}}{\text{EE de la diferencia en la media de las muestras}}$$

Los datos obtenidos del análisis de fotomicrografías y tomadas aleatoriamente del grupo control y del grupo experimental (**Anexo 1**), fueron analizados mediante el programa Prism 6 (GraphPad software, San Diego, CA, EUA) y se muestran a continuación:

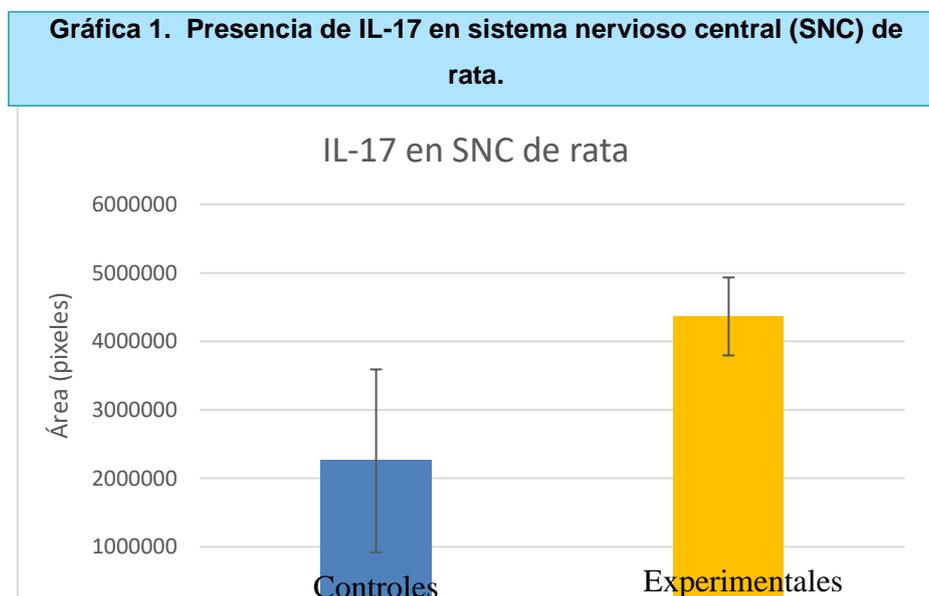
Tabla 1. Análisis estadístico de IL-17	
Tabla analizada	Prueba de datos no pareados de IL-17
Columna B Vs Columna A	Experimentales Vs Controles
Prueba t no pareada	
Valor p	< 0.0001
Sumatoria de valor p	****
Diferencia significativa (P <0.5)	Si
Valor p de una o dos columnas	Dos columnas
t, df	t=5.624 df=28
¿Qué tan grande es la diferencia?	
Promedio ± SEM de la columna A	2.256e+006 ± 344867 N=15
Promedio ± SEM de la columna B	4.365e+006 ± 147104 N=15
Diferencia entre promedios	2.109e+006 ± 374931
95% intervalo de confianza	1.341e+006 a 2.877e+006
R cuadrada	0.5305

Expresión de IL-17

El porcentaje en que se expresa la IL-17 en las estructuras del sistema nervioso central de las ratas de grupo control fue de 45%, mientras que en las de las ratas del grupo experimental fue de 87.2% (tabla 2); se muestra una diferencia significativa ($p < 0.0001$) entre ambos grupos (tabla 1).

Tabla 2. Expresión de IL-17		
Grupo	Promedio del área en pixeles	Porcentaje
Grupo control	2255903	45
Desviación estándar	1335665	26.6
Error estándar	344867	6.8
Grupo experimental	4364598	87.2
Desviación estándar	569733	11.3
Error estándar	147104	2.9

Tabla 2. Se presentan los promedios y porcentajes de expresión de IL-17 en grupos controles y experimentales*100 = 5 002 624 pixeles



Gráfica 1. Muestra la comparación entre el área afectada de los grupos control y experimental por IL-17. El eje y representa el área en pixeles, que resultado de procesamiento de las fotomicrografías, de la expresión de IL-17 evaluado en los tejidos (cerebro de rata). El valor $p \leq 0.05$ se considera estadísticamente significativo ($****p \leq 0.0001$) al comparar el grupo sano con el grupo inflamado, por lo que podemos decir que existe diferencia significativa entre ambos grupos en relación a la IL-17.

DISCUSIÓN

El flúor es un elemento químico considerado un nutriente esencial en la formación de estructuras mineralizadas como lo son dientes y huesos gracias a la gran afinidad que tiene hacia el calcio y fosfato, para el ser humano su obtención es fácil ya que se encuentra en diversos alimentos, que están al alcance de la población, como verduras, carnes, pescados, jugos refrescos y bebidas alcohólicas.²

Cuando las cantidades recomendadas por la OMS son sobrepasadas y de acuerdo al periodo de vida y el tiempo al que se esté expuesto puede causar afecciones tales como fluorosis dental y fluorosis esquelética; también se conoce que causa alteraciones en el sistema nervioso como disminución en síntesis de neurotransmisores, promueve el incremento de factores proinflamatorios y procesos degenerativos, esto último ha sido poco vinculado y reportado en la fluorosis dental.^{8, 10, 17}

En México, la fluorosis es un problema de salud endémico de estados como San Luis Potosí, Durango, Zacatecas, entre otros, a pesar de que este elemento se encuentra regulado por la Norma Oficial Mexicana NOM-127 SSA1 1996. En la población mexicana, principalmente en estos estados se consume agua proveniente de pozos con cantidades por arriba del límite establecido, las cuales incluso alcanzan 10 ppm o llegan a ser superiores. Uno de nuestros fundamentos para colocar la cantidad de 10ppm en el agua de consumo de las ratas experimentales fueron estas cantidades que se consumen los individuos expuestos en nuestro país y que son reportadas por diversos.^{21, 23}

En nuestro estudio observamos y analizamos las fotografías tomadas de los órganos dentales de las ratas, encontramos que nuestros resultados en el grupo control presentaron un tono amarillo uniforme, sin alteraciones visibles como fisuras, fracturas u opacidades o cambios de coloración. Por otro lado, en los resultados del grupo experimental se encontró que presentan una tonalidad más blanquecina o beige, ligeras líneas blancas intercaladas y algunas ratas

presentaron fisuras, todas estas características son clave en la fluorosis dental en el modelo animal de rata Wistar que demuestran una fluorosis dental que va de ligera a moderada, se obtuvieron así resultados similares a los que reporta el artículo de Jedeon *et al*³⁸ en donde las ratas expuestas a NaF presentan fenotípicamente en los dientes incisivos inferiores, opacidades, bandas combinadas de color blanco y ligeramente naranja, así como una marcada disminución de color.

McPherson en su artículo ¹⁸ describió los daños potencialmente neurotóxicos a los que conduce el flúor, entre los cuales se encuentra el incremento de factores proinflamatorios como citocinas, TNF- α , entre otros. Si bien la inflamación es un proceso biológico que da paso a la rehabilitación de la zona afectada, cuando es persistente y las células y factores que la causan se encuentran durante mucho tiempo puede conducir a procesos de degeneración y pérdida de la función de la zona. La interleucina-17 (IL-17) es un factor proinflamatorio presente en enfermedades neurovegetativas como el Alzheimer, así también se ha reportado la presencia de esta citocina en la enfermedad de Parkinson⁴⁵, al estar descrita de esta forma, buscamos en la presente investigación su expresión como una molécula inicial presente en el proceso de inflamación y posible degeneración estructuras del sistema nervioso central causadas por la alta exposición al flúor.

Los cortes de las estructuras del sistema nervioso central analizados después de ser tratados con las tinciones mostraron una positividad significativa a interleucina 17 en la porción del cerebelo, por lo cual nos enfocamos en la descripción de esta zona. Las muestras de los grupos controles fueron estables ya que mostraban las capas de la porción cerebelosa bien definidas, si bien se encontró expresión basal positiva para IL-17 en la matriz extracelular cuando se realizó el análisis microscópico, no fue algo particularmente significativo; por otro lado en las muestras experimentales se observó abundante vascularización, así como zonas difusas entre la capa granulosa y la matriz extracelular y una gran positividad a IL-17 en núcleos y de forma difusa en citoplasmas de las células de las distintas capas que conforma el cerebelo, Qingli Bie *et al*⁴², mencionan que los receptores para IL-17 incrementan cuando las ratas están expuestas a estímulos que provocan inflamación, por lo que la IL-17 se liga directamente a

enfermedades inflamatorias, con lo anterior mencionado y al comparar nuestros resultados reforzamos nuestra hipótesis de que la presencia en esta zona de IL-17 puede provocar un estado de inflamación y neurodegeneración en el cerebro, incluida la porción del cerebelo.⁴⁵

Al observar el comportamiento de los grupos de ratas, se observó que las ratas expuestas a NaF tuvieron cambios de comportamiento que incluían: movimientos involuntarios, bradicinesia y cursaban por periodos de agresividad. Una de las principales enfermedades neurodegenerativas es la enfermedad de Parkinson, caracterizada por afectar distintas zonas del encéfalo que provoca movimientos en estado de reposo, postura inestable, y enlentecimiento. Aunque los estudios sobre esta se centran en otras zonas del cerebro, en la actualidad existe cada vez mayor sustento fisiopatológico de que el cerebelo contribuye de forma importante en desarrollo de la enfermedad, dado que se ha reportado que la falla en la conexión de esta estructura, determinada en un inicio por las células de Purkinje, con los ganglios basales del cerebro, resulta en afectaciones motoras y cognitivas. Así mismo, se ha reportado que la inflamación crónica conduce a la degeneración progresiva de neuronas en esta enfermedad, lo anterior sustenta lo reportado en los trabajos de investigación de Pavón⁴³ y Carrillo⁴⁴, que si se compara con nuestros resultados nos muestran que la sobreexposición de flúor induce la respuesta inflamatoria, gracias a la presencia y expresión de IL-17 en el cerebelo. Comprobando que las células de Purkinje fueron las que mostraron expresión mayor (IL-17) y aunado al comportamiento antes mencionado en las ratas, nos abre un mundo de posibilidades a cerca de la afectación neuronal, motora y cognoscitiva que tiene la sobre exposición de flúor en tejidos no mineralizados.

Por otro lado, se registró una variación fenotípica en cuanto a características en las estructuras encefálicas obtenidas de ambos grupos, siendo la principal diferencia que los experimentales tenían un peso mayor. Los resultados del peso de dichas estructuras, obtenidos durante la eutanasia, mostró un incremento del 33% de peso en el grupo experimental comparado con el grupo control, se piensa que el estímulo nocivo causado por la alta concentración de flúor aumentó el volumen y peso de los cerebros debido a la extravasación y posible inflamación,

comparado con las ratas estimuladas con alcohol en el estudio realizado por Zahr Natalie *et al*⁴⁶ las cuales mostraron un volumen ventricular mayor cuando fueron estimuladas en cantidades nocivas a alcohol con respecto a las que no se les proporciono dicho estímulo. Es probable que la cantidad de flúor que se les dio a las ratas experimentales en nuestra investigación esté directamente ligada a la variación estructural entre ambos grupos.

Una vez realizado el estudio estadístico, se comprobó que existe expresión significativa para IL-17 (87.2%) en las muestras de las ratas expuestas a dosis elevadas de NaF en agua, en comparación a las que se les proporcionó agua embotellada (45%).

Estos resultados coinciden con diversos autores que han reportado cambios en y afectaciones del sistema nervioso cuando un organismo se ha expuesto de manera prolongada a concentraciones por arriba de los límites permitidos de flúor, una de estas podría ser la activación de sistema inmune, atrayendo así moléculas ligadas a la inflamación como forma de regular la presencia de dicho elemento en estas estructuras.^{16, 17, 19}

CONCLUSIÓN

La sobreexposición al flúor desde el nacimiento hasta la eutanasia de las ratas Wistar tiene gran repercusión en el organismo de éstas, pues provoca fluorosis dental de leve a moderada lo que resulta en cambios de color y daños estructurales en los incisivos centrales de las ratas.

Así mismo, las ratas expuestas a altas concentraciones de flúor tuvieron repercusiones a nivel de sistema nervioso central, desde el aumento del peso, hasta posibles estadios iniciales de inflamación debido a que se encontró una diferencia significativa de IL-17 entre el grupo control y experimental. Sin embargo, aún se requieren muchas pruebas más para poder determinar si esta sobre exposición podría desencadenar en algún proceso que pueda llevar a la degeneración de las estructuras en las que se encontró la IL-17.

Perspectivas a futuro:

La información que obtuvimos durante esta investigación podría ser un acercamiento para desarrollar más investigaciones a futuro así como tener un control más estricto de las variables con las que nos encontramos a durante el desarrollo de la misma; algunas de estos son: la búsqueda de más proteínas involucradas en el proceso de inflamación, realizar tinciones específicas para cerebro para poder identificar con mayor precisión las células que lo componen, verificar la cantidad de flúor presente en el dientes, huesos y sangre de las ratas de los dos grupos, así también, tener control sobre la cantidad consumida y excretada de flúor por rata.

ANEXOS

1. Resultados del análisis de fotomicrografías

Resultados obtenidos del análisis de fotomicrografías del grupo control.				
Muestra	Área	Promedio	Min de color	Max de color
Muestra 1	2541902	222.848	195	226
	2855451	222.707	193	226
	4343239	220.596	181	226
	2351514	223.489	195	226
	4347967	221.184	189	226
Muestra 2	3771780	221.252	188	226
	1923110	222.957	192	226
	895230	224.147	194	226
	123639	223.939	203	226
	117506	224.391	203	226
Muestra 3	2541902	222.848	195	226
	2855451	222.707	193	226
	2351514	223.489	195	226
	1923110	222.957	192	226
	895230	224.147	194	226

Resultados obtenidos del análisis de fotomicrografías del grupo experimental.				
Muestra	Área	Promedio	Min de color	Max de color
Muestra 1	3476412	220.507	175	226
	4729554	212.922	171	226
	4730701	212.937	171	226
	3310753	218.537	181	226
	3624350	219.653	175	226
Muestra 2	3636761	219.957	175	226
	4636866	217.024	175	226
	4629746	217.085	173	226
	4775576	216.323	169	226
	4686515	213.097	169	226
Muestra 3	4946682	208.011	171	226
	4974579	212.424	180	226
	4582844	216.944	167	226
	4613253	217.262	176	226
	4114377	220.482	162	226

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Silva Rojas OB, Antonio Sotomayor N. Fortificación de la sal con yodo flúor por vía seca [Ingeniero]. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua; 2016.
2. Galindo Hernández HM. Cuantificación del ion flúor en sal de uso y consumo humano por medio potenciométrico utilizando un electrodo combinado de ion selectivo [Q.F.B.]. Universidad Nacional Autónoma de México; 2017.
3. J. Fawell, K. Bailey, J. Chilton, E. Dahi, L. Fewtrell and Y. Magara. Fluoride in Drinking-water World Health Organization (WHO). IWA Publishing, London, UK. 2006.
4. Galicia Coronado MT. Barniz de flúor en la prevención de caries en escolares de 7 a 9 años de la primaria "El Amo Torres" durante el ciclo escolar 2015-2016 [Cirujano Dentista]. Universidad Nacional Autónoma de México; 2017.
5. López Larquin N. Efectos de la ingestión prolongada de altas concentraciones de fluoruros. 16 de abril. 2015;(54):83–94.
6. Rango T. Biomarkers of chronic fluoride exposure in groundwater in a highly exposed population. *Science of the Total Environment*. 2017; (596):1–11.
7. Ten Cate JM, Buzalaf MAR. Fluoride Mode of Action: Once There Was an Observant Dentist. *JDR*. 2019; (98):725–730.
8. Cury JA. Systemic Effects (Risks) Of Water Fluoridation. *BDR*. 2019; 30(5):421–428.
9. Hidalgo-Gato Fuentes I. Fluorosis dental: no solo un problema estético. Facultad de Ciencias Médicas de Matanzas. 2007: 1–12.
10. DenBesten P, Li W. Chronic Fluoride Toxicity: Dental Fluorosis. *Monogr Oral Sci*. 2011; (22):81–96
11. Sellami M. Skeletal fluorosis: don't miss the diagnosis! *Skeletal Radiology*. 2020;(49):345–357.
12. Godebo T. Bone quality in fluoride-exposed populations: A novel application of the ultrasonic method. *Bone Reports* 12. 2020; (100235):1–11.
13. Puche RC, Rigalli A. Fluorosis esquelética Actualiz *Osteol*. 2007; (3):50–52.
14. Rigalli A, Puche R. Determinación de la concentración de flúor en muestras biológicas. Actualiz *Osteol*. 2007; (3):27–34.
15. Reddy R. Neurology of endemic skeletal fluorosis. *Neurology India*. 2009; (1):7–12.

16. Dec K. The Influence of Fluorine on the Disturbances of Homeostasis in the Central Nervous System. *Biol Trace Elem Res.* 2017; (177):224–234.
17. Valdez L. Efectos del flúor sobre el sistema nervioso central. *Neurología.* 2011;(26):297–300.
18. McPherson C. An Evaluation of Neurotoxicity Following Fluoride Exposure from Gestational Through Adult Ages in Long-Evans Hooded Rats. *Neurotoxicity Research.* 2018; (34):781–798.
19. Saeed M. Fluorosis and cognitive development among children (6–14 years of age) in the endemic areas of the world: a review and critical analysis. *Environ Sci Pollut Res [Internet].* 2019 [citado 12 febrero 2020]1–14. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06938-6>
20. Hernández Gómez SJ. Análisis de la descomposición de dientes con fluorosis dental por espectroscopía raman [Cirujano Dentista]. Universidad Nacional Autónoma de México; 2016.
21. Jarquín-Yyezé L. Dental fluorosis and a polymorphism in the COL1A2 gene in Mexican children. *Archives of Oral Biology .* 2018;(96):21–25.
22. Orellana-Centeno JE. Fluorosis dental: ¿Un Problema Estético o Sistémico? *Salud y Administración.* 2019;(6):71–75.
23. Betancourt-Lineares A. Prevalencia de fluorosis dental en localidades mexicanas ubicadas en 27 estados y el D.F. a seis años de la publicación de la Norma Oficial Mexicana para la fluoruración de la sal. *RIC.* 2013;(65):237–247.
24. Soto-Rojas A. *et al.* A review of the prevalence of dental fluorosis in Mexico. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health* 2004;(15)1:9-18.
25. Jiménez-Farfán MD. Fluorosis dental en niños radicados en el suroeste de la Ciudad de México. *Rev Mex Pediatr.* 2001;(68):52–55.
26. Germolec DR, Shipkowski KA, Frawley RP, Evans E. Markers of Inflammation. *Methods Mol Biol.* 2018;(1803)57-79.
27. González-Costa M, Padrón González AA. La inflamación desde una perspectiva inmunológica: desafío a la Medicina en el siglo XXI. *Rev haban cienc méd [Internet].* 2018 [citado: mayo/2021]; 18(1):30-44. Disponible en: <http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/2445>
28. A. García de Lorenzo y Mateos *et al.* Respuesta inflamatoria sistémica: fisiopatología y mediadores. *Med Intensiva.* 2000; (24): 353-360.

29. Oliveira CM, Sakata RK *et al.* Citocinas y dolor. *Rev Bras Anesthesiol* 2011; (61): 2: 137-142
30. Bie Q. IL-17B: A new area of study in the IL-17 family. *Molecular Immunology*. 2017;(90):50–56.
31. McGeachy M. The IL-17 Family of Cytokines in Health and Disease. *Immunity*. 2019; *Immunity* 50, April 16, 2019. Elsevier Inc. (50) 893-906.
32. Shahrokhi VM. IL-17A and IL-23: plausible risk factors to induce age-associated inflammation in Alzheimer's disease. *Immunological Investigations*. 2018; (47):812–822.
33. Li T. Involvement of IL-17 in Secondary Brain Injury After a Traumatic Brain Injury in Rats. *Neuromol Med*. 2017; (10):541–554.
34. Kawanokuchi J. Production and functions of IL-17 in microglia. *Journal of Neuroimmunology*. 2008;(1-2):54–61.
35. Ramírez LC, Velásquez MM. IL-17 en la inmunopatogénesis de la psoriasis. *Rev Asoc Colomb Dermatol*. 2015; 23: 1 (Enero-Marzo), 61-68.
36. Flores-García Y, Talamás-Rohanna P. Interleucina 17, funciones biológicas y su receptor. Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular. *CINVESTAV. REB* 2012; 31(1):3-9.
37. Sisto M. Interleukin-17 and Interleukin-22 synergy linking inflammation and EMT- dependent fibrosis in Sjögren's syndrome. Manuscrito no publicado. Department of Basic Medical Sciences, Neurosciences and Sensory Organs, section of Human Anatomy and Histology, University of Bari. 2019.
38. Jedeon K, *et al.* Chronic Exposure to Bisphenol A Exacerbates Dental Fluorosis in Growing Rats. *Journal of Bone and Mineral Research* 2016; (31-11): 1955–1966.
39. Błaszczuk I. *et al* Influence of Methionine and Vitamin E on Fluoride Concentration in Bones and Teeth of Rats Exposed to Sodium Fluoride in Drinking Water *Biol Trace Elem Res*. 2012; (146):335–339.
40. Santos Vidal S. Tinción hematoxilina-eosina. [Tesis de máster] Madrid: Universidad Nacional de Educación a Distancia, Facultad de Ciencias, Departamento de Química Orgánica y Bio-orgánica; 2017.
41. Glantz SA. *Bioestadística*. Editorial McGraw Hill. Sexta edición. 2002. México. 73-99.

42. Qingli Bie *et al.* IL-17B: A new area of study in the IL-17 family. *Molecular Immunology* 90 (2017) 50–56.
43. Pavón Fuentes N, Lorigados Pedre L. Neuroinflamación y Enfermedad de Parkinson. *Rev Panorama. Cuba y Salud.* 2019; 14(3):44-49.
44. Carrillo García, F. Estudio del papel del cerebelo en la enfermedad de Parkinson mediante estimulación magnética transcraneal [Doctoral] Universidad de Sevilla. Facultad de Medicina. 2014.
45. Storelli E, *et al.* Do Th17 Lymphocytes and IL-17 Contribute to Parkinson's Disease? A Systematic Review of Available Evidence. *Front. Neurol.* January 2019; 10(13)
46. Zahr M Natalie *et al.* Rat strain differences in brain structure and neurochemistry in response to binge alcohol. *Psychopharmacology* (2014) 231:429–44.