



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Identificación de anormalidades nucleares de las células epiteliales bucales en pacientes con ortodoncia, mediante el uso de la tinción de Feulgen

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

P R E S E N T A :

GUTIÉRREZ MIRANDA GABRIELA LUCÍA

ASESORA:

DRA. MARITERE DOMÍNGUEZ ROJAS

CO-ASESORA:

MYR. C.D. LUCÍA ÁNGELES ESTRADA

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2023



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 ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE



VOTO APROBATORIO

ATN: DRA. MARIA DEL CARMEN VALDERRAMA BRAVO
UNAM CUAUTITLÁN
Jefa del Departamento de Titulación
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis y Examen Profesional**

Identificación de anomalías nucleares de las células epiteliales bucales en pacientes con ortodoncia, mediante el uso de la tinción de Feulgen.

Que presenta la pasante: **Gabriela Lucía Gutiérrez Miranda**

Con número de cuenta: **314286802** para obtener el título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica.**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 23 de noviembre de 2022.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Q.F.B. Nydia Berenice González Angeles	
VOCAL	Dra. Maritere Domínguez Rojas	
SECRETARIO	Dra. Dolores Molina Jasso	
1er. SUPLENTE	M. en C. María Llasbeth Hernández Calderón	
2do. SUPLENTE	M. en E. Rosa María de los Angeles López Cabrera	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Citogenética L521 de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, bajo la dirección de la Dra. Maritere Domínguez Rojas.

AGRADECIMIENTOS

El realizar el presente escrito, tan solo comprende una parte de mi vida como estudiante y marca el comienzo de una vida dedicada a la ciencia.

Exalto y agradezco en gran manera a Dios por darme el privilegio de comprender y conocer las profundidades y principios de su creación.

“porque fuera de Él nada deseo en la tierra”.

Agradezco el impresionante esfuerzo de mis padres por brindarme su tiempo y apoyo en mi vida académica y secular, así como del amor que me han brindado todos estos años; doy gracias al esfuerzo de mi padre al despertar todas las madrugadas para traer consigo lo útil para sostener mis estudios, así como a mi madre por dormir hasta altas horas de la noche cuando aún debía estudiar.

A mis hermanas por ser parte de mi vida, siento testigos de cada logro y tropiezo, a las cuales admiro su entusiasmo al realizar y lograr grandes proyectos y el tiempo que brindan a estos.

En agradecimiento a la UNAM, por ser una Institución que influyó fuertemente en mi avance académico y visión, así como a cada profesor que compartió sus conocimientos, experiencias y profesionalismo.

En especial agrado a mi asesora de tesis, la Doctora Maritere Domínguez Rojas, por dejarme ver siempre su entusiasmo al impartir su materia y al brindarme su ayuda y confianza cuando lo necesite, así como siempre presentar fijamente atención e interés en el avance de mi proyecto.

Finalmente quiero agradecer a todos mis amigos, que sin duda fueron una pieza fundamental en mi vida universitaria y una agradable experiencia todos estos años.

DEDICATORIAS

Dedico este proyecto a mi padre y a mi madre, que sin duda son el perfecto ejemplo de amor a su hija, ustedes con esfuerzo y cariño han concluido a mi lado uno de mis logros más preciados, en el que con amor externo que este título no solo pertenece a mí, sino también a ustedes.

Así mismo, dedico este proyecto a mi abuelita Ma. Guadalupe, que durante el tiempo que destine en concluirlo, terminó su momento con nosotros, siempre llevaré su amor, dulzura y atención conmigo, Te amo.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
ÍNDICE DE TABLAS.....	7
RESUMEN.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
Capítulo 1. Materiales de ortodoncia, uso estético y efecto en la salud humana	9
1.1 Ortodoncia y su importancia (uso estético).....	9
1.2 Definición y tipos de brackets.....	9
1.3 Biocompatibilidad.....	10
1.4 Aparatología ortodóncica	12
Capítulo 2. Estabilidad de los metales en aparatología ortodóncica fija	13
2.1 Corrosión	13
2.2 Liberación de iones metálicos	14
2.3 Bioacumulación de metales en tejidos de la cavidad oral	15
Capítulo 3. Ensayo de micronúcleos	16
3.1 Antecedentes de la prueba de micronúcleos.....	16
3.2 Definición y mecanismo de formación de micronúcleos.....	17
3.3 Células de la mucosa oral en ensayo de micronúcleos.....	20
3.4 Fundamento de la tinción de Feulgen.....	22
JUSTIFICACIÓN.....	27
OBJETIVOS.....	28
MATERIALES Y MÉTODOS	29
RESULTADOS.....	31
CONCLUSIONES.....	39
REFERENCIAS.....	40
ANEXOS.....	45

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

Ag: Plata

Al: Aluminio

AM: Aleaciones metálicas

AO: Aparatología ortodóncica

Au: Oro

Bc: Biocompatibilidad

Be: Berilio

Bm: Biomaterial

C: Carbono

Co: Cobalto

Cr: Cromo

Cu: Cobre

DM: Double minute

EPA: Environmental Protection Agency

Fe: Hierro

HUMN: Human Micronucleus Project

IM: Iones metálicos

In: Indio

IPCS: Programa Internacional de Seguridad Química

MN: Micronúcleos

Mn: Manganeseo

Ni: Níquel

Os: Osmio

P: Fósforo

Pd: Paladio

Pt: Platino

S: Azufre

Si: Silicio

Sn: Estaño

Ti: Titanio

TMA: Titanio Molibdeno

Zn: Zinc

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Formación de MN causados por factores aneugénicos y clastogénicos.....	18
FIGURA 2. Representación esquemática de una sección transversal de la mucosa bucal..	20
FIGURA 3. Tiempo que transcurre en la migración celular desde la capa basal hasta la cavidad oral.....	21
FIGURA 4. Hidrólisis de una base pirimídica.....	23
FIGURA 5. Estructura molecular de la Pararosanilina.....	24
FIGURA 6. Reacción en la síntesis de ácido sulfuroso.....	25
FIGURA 7. Formación del derivado incoloro del colorante.....	25
FIGURA 8. Derivados del ácido aquilsulfónico de la pararosanilina.....	26
FIGURA 9. Células de la mucosa oral con tinción de Feulgen observadas con microscopio óptico compuesto a 40x.....	31

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Resultados del conteo de 2000 células por cada uno de los 41 pacientes.....32

TABLA 2. Estadística descriptiva de los resultados obtenidos32

TABLA 3. Presencia de MN en el sexo femenino y masculino en diferentes tiempos de tratamiento con su desviación estándar33

RESUMEN

Los aparatos fijos de ortodoncia que comúnmente consisten de brackets, bandas y alambres, están elaborados regularmente de aleaciones metálicas (AM) que contienen metales como Cr, Ni, Co, Cu, y Fe, que ante las condiciones presentes en la cavidad bucal, se favorece la corrosión de metales, e incluso la liberación de iones metálicos (IM) y su bioacumulación en la cavidad bucal, por esta razón se ha relacionado con eventos de hipersensibilidad, dermatitis de contacto, asma, citotoxicidad y genotoxicidad en la cavidad bucal. Para estudiar su efecto en el material genético, es fundamental contar con un biomarcador confiable y mínimamente invasivo como es el ensayo de micronúcleos (MN) (*Martínez, J., 2015*).

En el presente trabajo se analizaron células epiteliales de la mucosa bucal de pacientes que fueron expuestos a aparatología ortodóncica fija (brackets) por un tiempo limitado de 12 meses (tomando como control el tiempo 0, antes de colocar la aparatología), analizando las células con el ensayo de MN, por tinción de Feulgen, con el fin de identificar si existe daño al ADN por un aumento en la frecuencia de MN. Los resultados revelan que no hubo un aumento significativo en la frecuencia de MN. Concluyendo que la aparatología ortodóncica fija no induce un daño genotóxico a los 12 meses de tratamiento en células de mucosa bucal de pacientes sanos.

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1. MATERIALES DE ORTODONCIA, USO ESTÉTICO Y EFECTO EN LA SALUD HUMANA

1.1 ORTODONCIA Y SU IMPORTANCIA (USO ESTÉTICO)

La ortodoncia es una especialidad que surge a partir de la odontología y se dedica al diagnóstico, prevención, intercepción y tratamiento de las malposiciones dentarias y los trastornos maxilofaciales. Su objetivo es mejorar la oclusión al obtener un correcto encaje de los dientes entre sí, haciendo que el paciente logre masticar y tragar correctamente, además de aumentar la resistencia de los dientes ante las caries y a los estragos que puede causar una enfermedad periodontal al estar los dientes demasiado juntos o desalineados (*Press, S., 2018*).

La estética humana ha sido una de las áreas de mayor interés del ser humano en el que ha destinado su tiempo y recursos al desarrollo de una gran cantidad de tratamientos para su mejora. Uno de los elementos que define la estética facial es el área bucal, por lo que, la correcta posición de los dientes en sus maxilares y su relación con los tejidos blandos que los rodean determinarán si existe una mejora en la estética y en su funcionalidad. Incluso, cuando existe un crecimiento y desarrollo anormal de las estructuras de la región bucal se da lugar a anomalías dentomaxilofaciales y es ahí cuando la ortodoncia participa para brindar fines mejorativos (*Pérez, L. & Reytor, E., 2013*).

La ortodoncia se clasifica en diferentes tipos de tratamiento:

- Ortodoncia preventiva.
- Ortodoncia interceptiva
- Ortodoncia correctiva
- Ortodoncia funcional de los maxilares
- Rehabilitación ortodóncica.

(Quirós, O., 2004)

1.2 DEFINICIÓN Y TIPOS DE BRACKETS

Se define por “bracket” a aquel dispositivo metálico o cerámico, capaz de realizar y guiar movimientos ortodóncicos al aplicar fuerza. Los brackets van adheridos al diente y participan

como soporte de los elementos activos, como son el arco principal, elásticos, resortes, etc. (Rodríguez, E., 2019).

A continuación, se enlista la clasificación de los diferentes tipos de brackets según sus características:

- Por su modo de adhesión:
 - Soldables a bandas.
 - Adhesión directa.

- Por su tamaño:
 - Standard
 - Medianos
 - Mini

(Las medidas varían según el fabricante).

- Por su composición:
 - Metálicos.
 - Estéticos:
 1. Cerámicos.
 2. Plásticos.
 3. Híbridos.

- Por su diseño:
 - Estándar Edgewise.
 - Pretorqueados y preangulados (ligables y de autoligado).

- Por su manufactura:
 - Cortados.
 - Fundidos.
 - Híbridos.

(Rodríguez, E., 2019)

1.3 BIOCOMPATIBILIDAD

Se define como biocompatibilidad (Bc) a la cualidad de un biomaterial (Bm) de generar una respuesta biológica aceptada por el organismo tanto química, biológica y mecánicamente sin generar un rechazo o reacciones inmunitarias. Con ello se define Bm como aquel material no biológico que imita las propiedades y funciones de un tejido en su ambiente biológico, debiendo cumplir con los requisitos de Bc, bioestabilidad, esterilidad y factibilidad funcional (Salvatierra, N., et. al., 2019; Galeano Patiño, A. C. & Gutiérrez Palacio, T., 2009).

Son algunos los aspectos que pueden ser evaluados para determinar el grado de Bc que existe entre un organismo vivo con un Bm, como son la citotoxicidad localizada, la alergenicidad, genotoxicidad, la respuesta sistémica y la carcinogenicidad que éste pueda estimular (Martínez, J., 2015).

Dentro de la Odontología, se debe valorar la Bc de todos los materiales y descartar el uso de cualquier producto o componente que pueda ocasionar daño o lesiones, por lo que deben cumplir con los siguientes criterios para ser considerados materiales biocompatibles: no presentar potencial carcinógeno, deben estar libres de agentes que puedan propiciar respuesta alérgica, no causar daño a la pulpa y/o tejidos blandos y la ausencia de sustancias tóxicas que puedan ser liberadas y absorbidas por el sistema circulatorio causando una respuesta tóxica sistémica. Además, la selección de un Bm va más allá de la Bc, puesto que su importancia también radica en el impacto legal, técnico, financiero, en la satisfacción para el odontólogo o personal del laboratorio dental y en la salud del paciente (Martínez, J., 2015; Giraldo, O., 2004).

1.3.1 ISO 10993 - EVALUACIÓN BIOLÓGICA Y PRUEBAS DE BIOCOPATIBILIDAD PARA PRODUCTOS SANITARIOS

Es la norma internacional ISO 10993 la que insta una serie de reglas para la evaluación de la Bc de dispositivos y materiales médicos que entran en contacto de forma directa o indirecta con el paciente, siendo su objetivo principal la protección de los seres humanos de los posibles riesgos biológicos derivados del uso de productos sanitarios. Esta serie de reglas consta de veinte partes diferentes bajo el título “*Evaluación biológica de dispositivos médicos*” (Organización Internacional de Normalización [ISO], 2018).

De acuerdo a la norma, se abordan diferentes métodos para determinar la Bc, como es el estudio del efecto citotóxico y genotóxico que son detalladas en los siguientes apartados: ISO 10993-5: 2009 “*Ensayos de citotoxicidad in vitro*” e ISO 10993-3: 2014 “*Pruebas de genotoxicidad, carcinogenicidad y toxicidad para la reproducción*”.

En la norma ISO 10993-5: 2009 se aborda un detallado esquema que conduce a la selección de la prueba más adecuada para la evaluación de la presencia y el alcance del efecto citotóxico de productos sanitarios, dejando a disposición una batería de pruebas *in vitro*. Mientras que la norma ISO 10993-3: 2014 realza la importancia de la evaluación de mutágenos y cancerígenos, así como especificando estrategias para la selección de pruebas que se interpongan a efectos biológicos irreversibles como son genotoxicidad, carcinogenicidad y toxicidad para la reproducción y el desarrollo, resultado de la exposición de dispositivos médicos. Donde, como parte de la batería de pruebas para evaluar el efecto genotóxico, se sugiere el empleo de las pruebas: Test de Ames, ensayo del nódulo linfático, aberraciones cromosómicas y ensayo de MN (ISO, 2009; ISO, 2014).

1.4 APARATOLOGÍA ORTODÓNICA

La odontología se ha distinguido por utilizar una gran cantidad de materiales dentales como es el caso de los metales, siendo útiles en la fabricación de prótesis dentales fijas y removibles, restauraciones directas e indirectas, implantes de oseointegración, así como de aparatología ortodóncica fija. De acuerdo a esto, a lo largo de los años ha surgido una gran importancia en la Bc que tiene la aparatología ortodóncica (AO) con el organismo humano, al encontrarse relacionada con la liberación de IM al organismo e inducción potencial de efectos biológicos (*Martin, A., 2015a; Yuen, N., 2018*).

La AO se encuentra compuesta por arcos, bancas, muelles, alambres, tornillos, brackets, y otros dispositivos, donde metales como el Au, Cr, Co, Ti, Al, Pd, Fe, Ag, Pt, Cu, Os, In, Zn, Sn, Be y Ni, son de gran utilidad en su fabricación. Por ejemplo, el Ni es un metal que permite la elaboración de excelentes aleaciones con otros metales como el Ti, el Cr e incluso el acero inoxidable, siendo útil en la fabricación de soportes, alambres y bandas de AO fija. Al mezclar varios metales (aleaciones metálicas) se logra una mayor Bc con resistencia a la corrosión, una alta estabilidad y mayor facilidad de fundición (*Yuen, N., 2018; Gómez, V., et. al., 2014; Raap, U., et. al., 2012*).

1.4.1 ALEACIONES METÁLICAS

Las aleaciones metálicas (AM) son la mezcla de dos o más metales o de un solo metal con no metales. Las aleaciones son utilizadas principalmente por su resistencia a la corrosión, la economía y su Bc en Odontología. Es importante considerar que el factor principal para determinar que la aleación es útil biológicamente, es la corrosión, esto se debe a que la toxicidad sistémica, local y la carcinogenicidad por las aleaciones resultan de la liberación de los elementos metálicos en la boca durante la corrosión (*Giraldo, O., 2004*).

Cabe mencionar que las AM ofrecen mayor elasticidad, dureza, memoria de forma y resistencia al estrés en AO, por lo que se le ha asignado un mayor uso dentro de la odontología ortodóncica. Sin embargo, metales como Ni y Cr, son metales que se encuentran relacionados con efectos citotóxicos, mutagénicos, alergénicos y carcinogénicos (*Mikulewicz, M., et. al., 2012*).

1.4.1.1 ACERO INOXIDABLE

Un tipo de AM es el acero inoxidable, en el que su uso en la industria médica y odontológica deriva de su resistencia a la corrosión y sus propiedades higiénicas y estéticas. El acero es una aleación principalmente de Fe y C y pequeñas cantidades de Cu, Mn, S, Si y P, mientras

que el acero inoxidable no solo es la mezcla de Fe y C, si no que se caracteriza por la adición principalmente de Cr y es la adición de dicho metal, el que le brinda al acero la característica de inoxidable (Yuen, N., 2018; Ulbrinox, 2020).

El acero inoxidable presenta la propiedad de mantener su resistencia mecánica y resistir ambientes corrosivos, esto se debe a que metales con aleaciones, presentan gran afinidad al oxígeno y reaccionan con él. Por ejemplo, el Cr que envuelve al acero inoxidable se oxida superficialmente volviéndose óxido de cromo que es extremadamente estable en condiciones ambientales biológicas, formando una capa que protege al acero de la corrosión (Yuen, N., 2018).

CAPÍTULO 2. ESTABILIDAD DE LOS METALES EN APARATOLOGÍA ORTODÓNICA FIJA

2.1 CORROSIÓN

Como definición del término corrosión, Chang y colaboradores en 2017 lo describen como “Término que suele aplicarse al deterioro de los metales por un proceso electroquímico”, siendo necesario que el metal se encuentre en contacto con oxígeno y agua para que éste logre oxidarse; en términos generales, dichos procesos electroquímicos son reacciones de oxidación (Chang, R., et. al., 2017, p.838).

El proceso de corrosión se presenta en una gran cantidad de metales y esto ha llevado a hallar la manera de disminuir dicho evento, por lo que, como se ha mencionado con anterioridad, surge la necesidad de formar aleaciones entre metales, que presentan una disminución considerable del proceso de oxidación, como es el caso del acero inoxidable (Chang, R., et. al., 2017).

Sin embargo, las AM al estar en la cavidad oral, se encuentran en constante exposición a cambios súbitos de temperatura, así como de pH, humedad y de microorganismos (que ocasionan biocorrosión, fenómeno que propicia la mayoría de las bacterias el aumento de un metabolito ácido en la cavidad bucal); incluso la saliva, puede llevar consigo ácidos provenientes de la descomposición y degradación de alimentos y estrés mecánico que propician un ambiente para la degradación de los materiales dentales, así, todos los factores antes mencionados, pueden inducir la liberación de iones metálicos (IM), ocasionando un aumento en los niveles de metales en la saliva (Yuen, N., 2018; Mikulewicz, M., 2012).

Por lo que, las maneras de evadir y prevenir el proceso de corrosión de los metales en la ortodoncia, es cubriendo el metal con materiales impermeables o con Zn, uso de metales nobles, técnica de electroplateado, realizar pulido y terminado adecuado, usando metales resistentes a la corrosión o como ya se ha dicho, la fabricación de AM (Restrepo, D. & Ardila, C., 2010).

2.2 LIBERACIÓN DE IONES METÁLICOS

Diversos estudios han demostrado que puede ocurrir la liberación de IM provenientes de la AO, relacionándolo a procesos de corrosión de las AM, concluyendo la mayoría de estos, que los resultados no alcanzan concentraciones tóxicas, sin embargo, no descartan que incluso cambios biológicos en la mucosa oral pueden ser ocasionadas por concentraciones no tóxicas (Martín, A., *et. al.*, 2015b).

Cabe destacar que existe una gran cantidad de estudios *in vitro* que evalúan la liberación de metales de las aleaciones ortodóncicas, sin embargo, son pocos los estudios *in vivo* que se encargan de evaluar los efectos adversos de la liberación, absorción y toxicidad de metales. (Martín, A., *et. al.*, 2015b).

La liberación de los metales en AO ocurre de una manera gradual y lenta, además, la velocidad de liberación de los IM no es directamente proporcional a su concentración, si no que este factor depende de la resistencia a la corrosión. Así mismo, un factor importante a considerar es el pH, donde incluso un estudio encontró que al ser expuestas coronas de acero-cromo en saliva artificial, en días y diferentes pH, detectaron liberación de iones Ni; siendo de gran importancia el factor pH puesto que en cuanto este incrementaba, la liberación de iones Ni se veía disminuída (Martínez, J., 2015).

Como ejemplo, estudios que han evaluado la liberación de Ni arrojan un aproximado de 4.2 μg por día e incluso otros estudios han reportado valores máximos de Ni en saliva de pacientes con AO aproximadamente de 75 $\mu\text{g/L/día}$ y considerando que se consume valores medios de 200-300 μg por día de Ni, estos se encuentran aún muy por debajo del límite establecido (House, K., *et. al.*, 2008; Martínez, J., 2015).

Otras investigaciones, igualmente basadas en la liberación de IM, cuantificaron la concentración de Fe y Ni en la saliva de pacientes con AO, donde demostraron que durante los primeros 5-10 minutos después de haber sido colocada la AO, hubo una elevada liberación de IM debido a la manipulación de las bandas, aditamentos de ortodoncia y a los alambres, ocasionado por una abrasión en la superficie metálica, que fue disminuyendo con el paso del tiempo, concluyendo además, que los niveles de liberación de ambos metales, fueron bajas (Martínez, J., 2015).

Así mismo, otro estudio sobre la liberación de Cr y Ni en la cavidad bucal de pacientes con AO fija, una vez colocada la AO fija, presentaron un aumento de dichos IM a los tres días, pero no hallando a los tres meses. Esto puede ser relacionado a otro estudio donde concluyeron que la mayor cantidad de IM liberados ocurrió durante los primeros días, consecutivo a esto, muy probablemente ocurrió la pasivación, presentando una liberación de IM menos intensa (Martínez, J., 2015; Shruthi, D., *et. al.*, 2020).

Además, es importante que la calidad de la superficie de los materiales dentales cuenten con el soporte ante tensiones mecánicas, térmicas y químicas, porque incluso factores como el

uso de enjuague bucal fluorado, puede perjudicar la resistencia a la corrosión de algunos alambres como el NiTi y TMA (Yuen, N., 2018).

Por el contrario y en relación a lo antes mencionado, Shruthi y colaboradores en 2020 llevaron a cabo una evaluación *in vitro* acerca de la liberación de IM propiciado por el uso de enjuague bucal, este consistía en incubar por 45 días, brackets premolares de acero inoxidable en tres diferentes tipos de enjuague bucal junto con el grupo control y una vez cumplido el tiempo, analizar las muestras en un espectrómetro de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente, para reconocer la liberación de IM libres. Dicho estudio fue impulsado por el hecho de que diferentes estudios han demostrado que un ambiente ácido, como la presencia de iones fluoruro (en tres tipos de enjuagues bucales de fluoruro), deterioran la resistencia a la corrosión de los metales. Obteniendo como resultado una mayor liberación de IM en el agua desionizada (grupo control) que en los enjuagues bucales, pero estableciéndose los cuatro grupos, dentro del límite permisible, muy por debajo del nivel tóxico, tanto de Ni como de Cr (Shruthi, D., et. al., 2020).

Otros estudios han demostrado, que la liberación de IM (como Co, Cr y Ni) ocurre durante los primeros 4 o 5 meses del tratamiento ortodóncico, además de evidenciar la absorción de metales por distribución sistémica, donde la cantidad medible del metal en muestras de saliva o sangre se encuentra significativamente por debajo del promedio de la ingesta dietética, no alcanzando concentraciones tóxicas. Con lo antes mencionado, no se descarta que incluso concentraciones no tóxicas podrían propiciar eventos importantes en células de la mucosa oral. Esto se relaciona, a que el Ni se encuentra vinculado a cáncer de pulmón y nasal y que el Co o los compuestos de este, posiblemente a efectos cancerígenos, sin embargo, incluso se relacionan con que presentan un potencial genotóxico, los mecanismos subyacentes a este problema son un tanto desconocidos, proponiendo que posiblemente lo que ocurre es la interacción de metales con ADN (enlaces cruzados), daño oxidativo en el ADN o daño en la replicación y reparación de ADN (Fiorenza, F., et. al., 2003).

2.3 BIOACUMULACIÓN DE METALES EN TEJIDOS DE LA CAVIDAD ORAL

Los aparatos fijos de ortodoncia son empleados durante procedimientos restauradores donde no solo se ha adscrito una liberación de IM por parte de éstos, sino que se ha demostrado la bioacumulación de dichos metales en diferentes tejidos de la cavidad bucal. Mediante un estudio se evidenció la acumulación de iones Ni por medio de espectrofotometría de absorción atómica en encía, saliva y hueso alveolar en una paciente que se encontraba bajo tratamiento ortodóncico, en el cual se obtuvieron como resultados: 986.4 ng/ml de Ni en saliva, 779.5 ng/ml en hueso y 620.5 ng/ml en encías. Concluyendo así, que la exposición a aparatos de ortodoncia con Ni genera acumulación de iones Ni en tejido gingival, saliva y hueso alveolar, así como cambios estructurales celulares. Si bien, los metales se dividen en esenciales (necesarios para el organismo que a concentraciones elevadas pueden ocasionar reacciones tóxicas) y en metales no esenciales

(que ocasionan reacciones adversas a bajas concentraciones), donde el Ni al ser considerado como un metal no esencial, se ha asociado a un descenso en la viabilidad celular y daño en el ADN (Gómez, V., et. al., 2015; Restrepo, D., et. al., 2010).

Además, se conoce que los IM pueden ser absorbidos por medio de la dentina y la pulpa del diente (Martínez, J., 2015).

Cabe destacar que la presencia de Ni en saliva ha sido evaluado en diferentes estudios, Ousehal y colaboradores en 2012 evaluaron los niveles de Ni en muestras de saliva de 16 pacientes justo antes y después de la inserción del arco de alambre de Ni-Ti, donde si bien, sólo se tuvo significancia estadística justo después de la inserción del aparato de ortodoncia, éste dato revela un aumento significativo en los niveles de Ni. No hay que descartar que la saliva tiene como propiedad la lubricación de la cavidad oral, esto involucra el evidente contacto con las células epiteliales que conforman a la mucosa bucal, células que son analizadas en la investigación y que se encuentran de igual manera expuestas al daño que causa el Ni acumulado en la saliva (Ousehal, L. & Lazrak, L., 2012; Zaragoza, T. & Velasco, J., 2018).

CAPÍTULO 3. ENSAYO DE MICRONÚCLEOS

3.1 ANTECEDENTES DE LA PRUEBA DE MICRONÚCLEOS

El término genotoxicidad se entiende como un proceso en el cual agentes químicos, físicos o biológicos interactúan y dañan al ADN así como al aparato celular que se encarga de regular la eficiencia y la precisión necesaria en los procesos de replicación y reparación del ADN. Ante tal problema y el largo alcance que se tiene a las generaciones futuras, comenzaron a surgir pruebas *in vivo* e *in vitro*, destinadas a evaluar el daño cromosómico numérico o estructural, mutaciones o el daño o la reparación del ADN (Graziano, M. & Jacobson-Kram, D., 2015).

Dado lo anterior, el campo de la salud humana tuvo como objetivo el desarrollo, validación y uso de biomarcadores que brinden información confiable de factores de riesgo asociados a la exposición de diversos agentes, esto ha sido de gran apoyo al ser útil en diferentes áreas de estudio como la toxicología, salud ocupacional y carcinogénesis (Arango, S., 2012).

El término biomarcador se adjudica a la respuesta ante la interacción entre un sistema biológico y agentes químicos, físicos o biológicos, donde la respuesta ocurre a nivel molecular o celular y podría estar asociado al desarrollo de una enfermedad. Por lo tanto, en la Odontología las pruebas encargadas de evaluar el daño cromosómico prefieren la identificación de biomarcadores que nos permitan una detección temprana ante la exposición de aparatos de ortodoncia como es la frecuencia de MN (Arango, S., 2012).

La primera descripción de MN se remonta a finales del siglo XIX cuando dos investigadores, Howell y Jolly encontraron en sangre extraída de gatos y ratas, pequeñas inclusiones a las que se les reconocería como MN. Estas pequeñas inclusiones fueron observadas más tarde en sangre periférica de pacientes con anemia grave, a las que se les denomina cuerpos de Howell-Jolly. Fue con dicho acontecimiento que surge la primera descripción de MN (Hayashi, M., 2016).

En el año 1983, el comité de MN del Programa Gen Tox de la EPA de los Estados Unidos publicó un resumen donde se incluía una base de datos que almacena los resultados de sustancias químicas analizadas por el ensayo de MN. Ese mismo año el IPCS dio inicio a un programa de colaboración internacional en el que fueron evaluados productos carcinógenos y no carcinógenos mediante una batería de pruebas *in vivo*, siendo la prueba de MN la que brindó mejores resultados para estimar el potencial carcinógeno de diversas sustancias químicas. Así es como en la década de 1980, el ensayo de MN lo incluyen dentro de la batería de pruebas de genotoxicidad (Hayashi, M., 2016).

Así mismo, surge el proyecto de colaboración internacional sobre frecuencia de MN en poblaciones humanas (HUMN), encargado de recopilar una gran cantidad de información sobre frecuencia de MN, incluidos los protocolos detallados de las pruebas, la descripción de la población estudiada y los resultados obtenidos (Fenech, M., et. al., 1999).

Es así como el ensayo de MN se ha convertido en la técnica citogenética mejor validada para lograr evaluar el daño genómico y la inestabilidad cromosómica en humanos.

3.2 DEFINICIÓN Y MECANISMO DE FORMACIÓN DE MICRONÚCLEOS

Un MN es un cuerpo citoplasmático de menor tamaño que el núcleo primario, que corresponde a material genético excluido que no ha logrado incorporarse al núcleo de la célula hija en la división celular, llevando a una pérdida cromosómica y un reparto no equitativo del material genético (Zalacain, M., et. al., 2005; Cruz, F., 2011).

Son encontrados en células en división que presentarán consigo roturas cromosómicas que carecen de centrómeros (fragmento acéntrico) y/o cromosomas completos que les es imposible viajar a los polos del huso durante la mitosis. Es durante la telofase, cuando se lleva a cabo la formación de la envoltura nuclear envolviendo a los cromosomas y fragmentos rezagados de cromosomas, donde estos últimos asumirán gradualmente la morfología de un núcleo con la excepción de que son más pequeñas que el núcleo principal (Ver Fig. 1), de ahí el término MN. Es así como los MN han logrado ser utilizados como un indicador de daño cromosómico al proporcionar una medida de rotura y pérdida cromosómica, además de considerarse indicadores de aneuploidía e inestabilidad genómica (Fenech, M., 2005; Fenech, M., et. al., 1999; Caltzontzin, K., 2020).

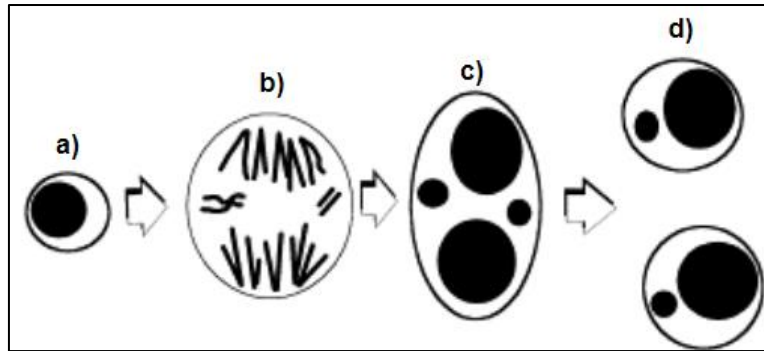


Figura 1. Formación de MN causados por factores aneugénicos y clastogénicos. a) Célula en interfase. b) Célula en anafase con rezago de un cromosoma completo causado por un agente aneugénico y el fragmento de un cromosoma causado por un agente clastogénico. c) Célula en telofase con dos MN formados. d) Dos células hijas micronucleadas (Fenech, M., et al., 1999).

La formación de MN se atribuye principalmente a dos factores: aneugenos o clastógenos. Respecto a los efectos derivados de clastógenos, se le atribuye la ruptura de la doble hebra del ADN, o si bien, de una sola hebra que puede convertirse en ruptura de doble hebra una vez que ocurre la replicación del ADN o por la inhibición de la síntesis de ADN, llevando a la formación de MN que contendrán cromosomas acéntricos o fragmentos de cromatina y que por lo tanto serán rezagados del núcleo. Para esta clase de MN en específico, su origen se puede atribuir a una simple fragmentación cromosómica en la telofase o cuando existe una sobrecarga de daño al ADN que supera la capacidad de reparación de éste, por ejemplo la reparación por escisión (al no completarse el paso de llenado de espacios) y la recombinación homóloga; incluso, la aparición de esta clase de MN se ve inducida cuando existen errores en genes involucrados en la transcripción de enzimas como ATM, BRCA1, BRCA2 y RAD51 que participan en las vías de reparación (Cervantes, E., et al., 2014; Cheong, H., et al., 2013; Brugada, A. & Ortiz, A., 2017; Chavarría, I., 2017).

Por otro lado, los MN pueden ser originados por efectos aneugénicos resultantes de cromosomas completos rezagados que se forman por deficiencias en la segregación cromosómica durante la anafase, que es causado por fallas de unión del huso mitótico, defectos en centrómero y/o cinetócoro (remoción de cinetócoro, centrómero inactivado, daños al centriolo) alteraciones y fallo en genes “check point” en la anafase, la amplificación anormal del centrosoma y la hipometilación de la citosina en secuencias repetidas centroméricas y pericentroméricas, por ejemplo en repeticiones satélites en regiones pericentroméricas y ADN satélite en la regiones centroméricas (Cervantes, E., et al., 2014; Cheong, H., et al., 2013; Ruiz, A., 2017; Fenech, M., et al., 2011).

Cabe mencionar, que diversos estudios han señalado que los cromosomas dicéntricos así mismo, pueden estar involucrados en eventos de segregación errónea durante la anafase, presentándose cuando los centrómeros del cromosoma dicéntrico son empujados hacia los

polos opuestos con la fuerza suficiente para separar al cromosoma del huso. (Fenech, M., et. al., 2011).

De igual manera, los MN pueden formarse a partir de elementos extracromosómicos, como son MN de tipo “double minute” (DM). Un DM es un elemento extracromosómico, específicamente ADN circular, de gran tamaño que consta de genes que se presentan comúnmente en células de cáncer y no en células normales; siendo eventualmente considerados los agregados de DM como MN de tipo DM, que son creados por el retraso de estos en la mitosis o por su eliminación por gemación nuclear. Incluso la fragmentación de un puente nucleoplasmático durante el paso de la anafase a la citocinesis pueden formar MN (Cheong, H., et. al., 2013; Shimizu, N., 2011).

Para concluir, Shimizu Noriaki en 2011 describe los pocos conocimientos que se tienen respecto a la eliminación del contenido micronuclear, añadiendo que ningún mecanismo ha sido aclarado con precisión. Una de las posibilidades es que los MN se degradan *in situ*, aunque no se ha logrado detectar tal evento. El segundo posible mecanismo, radica en que el contenido de los MN se disgrega durante la división si éste no se replica. Otro mecanismo propone la eliminación de los MN del interior al exterior de la célula, donde incluso un estudio halló MN de tipo DM en un medio de cultivo celular (Shimizu, N., 2011).

A continuación, se presenta un resumen de los mecanismos que pueden propiciar la formación de MN:

Cromosoma acéntrico rezagado o fragmento de cromátida en la anafase.

- Reparación incorrecta de roturas de ADN.
- Roturas de ADN no reparadas.

Cromosomas completos rezagados en la anafase.

- Hipometilación de secuencias repetidas en ADN centromérico y pericentromérico.
- Defectos en las proteínas del cinetocoro o en su ensamblaje.
- Huso disfuncional.
- Genes defectuosos del punto de control de la anafase.
- Intermedios de estrés de replicación no resueltos.

3.2.1 CRITERIOS PARA IDENTIFICAR MICRONÚCLEOS

Los MN deben cumplir con las siguientes características:

- Los MN presentan una forma redonda u ovalada.
- En los linfocitos humanos, el diámetro de los MN está entre 1/16 y 1/3 del diámetro del núcleo principal.
- Los MN no son refringentes.

- Los MN no deben estar traslapados o unidos al núcleo principal.
- Los MN deben tener el mismo color e intensidad de tinción que el núcleo.

(Arredondo, G., 2011).

3.3 CÉLULAS DE LA MUCOSA ORAL EN ENSAYO DE MICRONÚCLEOS

La cavidad bucal se encuentra recubierta por una mucosa oral, constituida por el corion (tejido conectivo) y un epitelio escamoso estratificado que consta de cuatro capas distintas: el estrato córneo (o capa de células queratinizadas, que recubren la cavidad bucal y se desprenden constantemente por desgaste del tejido superficial), el estrato granuloso y el estrato espinoso y debajo de este, una capa de células basales y células basales madre en división activa, que mantienen la estructura y la integridad de la mucosa bucal (Ver Fig. 2) (Thomas, P., et. al., 2009).

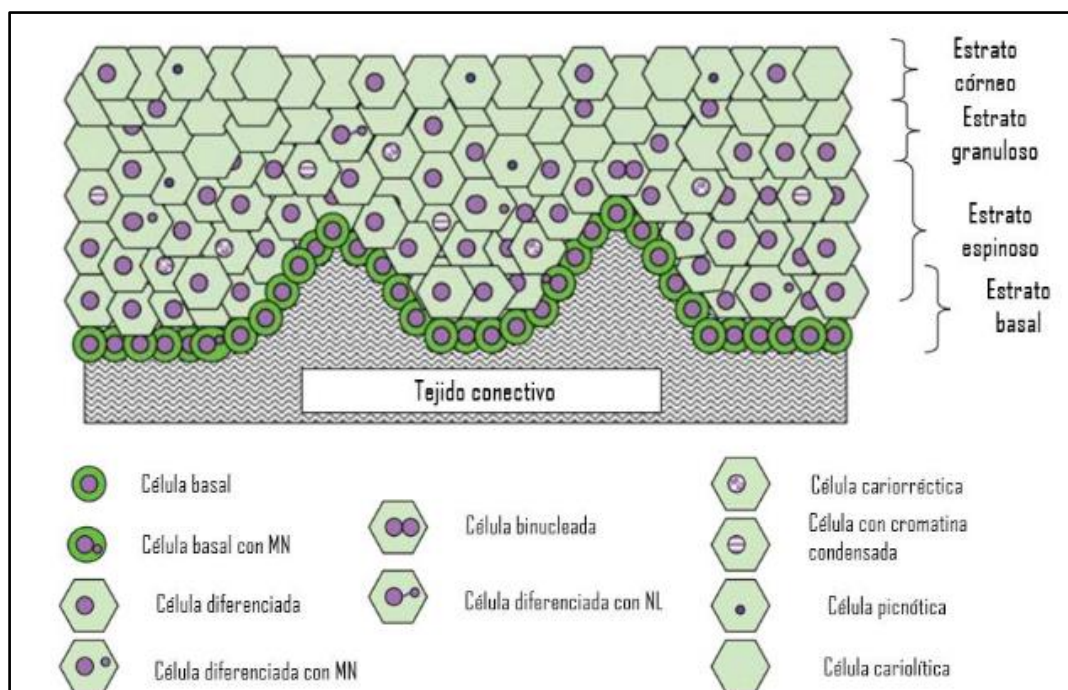


Figura 2. Representación esquemática de una sección transversal de la mucosa bucal. Se muestran las posibles relaciones espaciales de los diferentes tipos de células pertenecientes al tejido de la mucosa bucal de individuos sanos, así como los diversos tipos de células anormales que se podrían presentar (NL: Núcleo lobulado) (Thomas, P., et. al., 2009).

Se tiene certeza que el ensayo de MN en células exfoliadas bucales, es una de las técnicas más utilizadas para medir el daño genético en la población humana, debido a lo sencilla que

es su metodología, puesto que involucra poca invasividad en la toma de muestra celular, un fácil almacenamiento y fácil preparación de portaobjetos. Además se tiene evidencia de que el ensayo de MN con linfocitos concuerda con el mecanismo de formación de MN en células exfoliadas bucales, implicando que los efectos genotóxicos en el torrente sanguíneo pueden afectar y ser detectables también en células bucales. Esto se convierte en un hecho de gran importancia, ya que se sabe que la frecuencia de MN en linfocitos periféricos de pacientes sanos se ha relacionado con el riesgo de cáncer, trastornos neurodegenerativos y enfermedades cardiovasculares (Bonassi, S., et. al., 2011).

Otra cualidad de la evaluación de MN en células exfoliadas, es que ya no se tiene la necesidad de una etapa de replicación *ex vivo*, puesto que el tejido de la mucosa bucal se divide rápidamente, tomando en cuenta que, una vez que ocurre la exposición al agente genotóxico, debe cumplirse de 2 a 3 semanas para detectar MN en las células exfoliadas, esto le brinda la característica de poder evaluar solo el efecto de exposiciones agudas o crónicas recientes (Ver Fig. 3) (Bonassi, S., et. al., 2011).

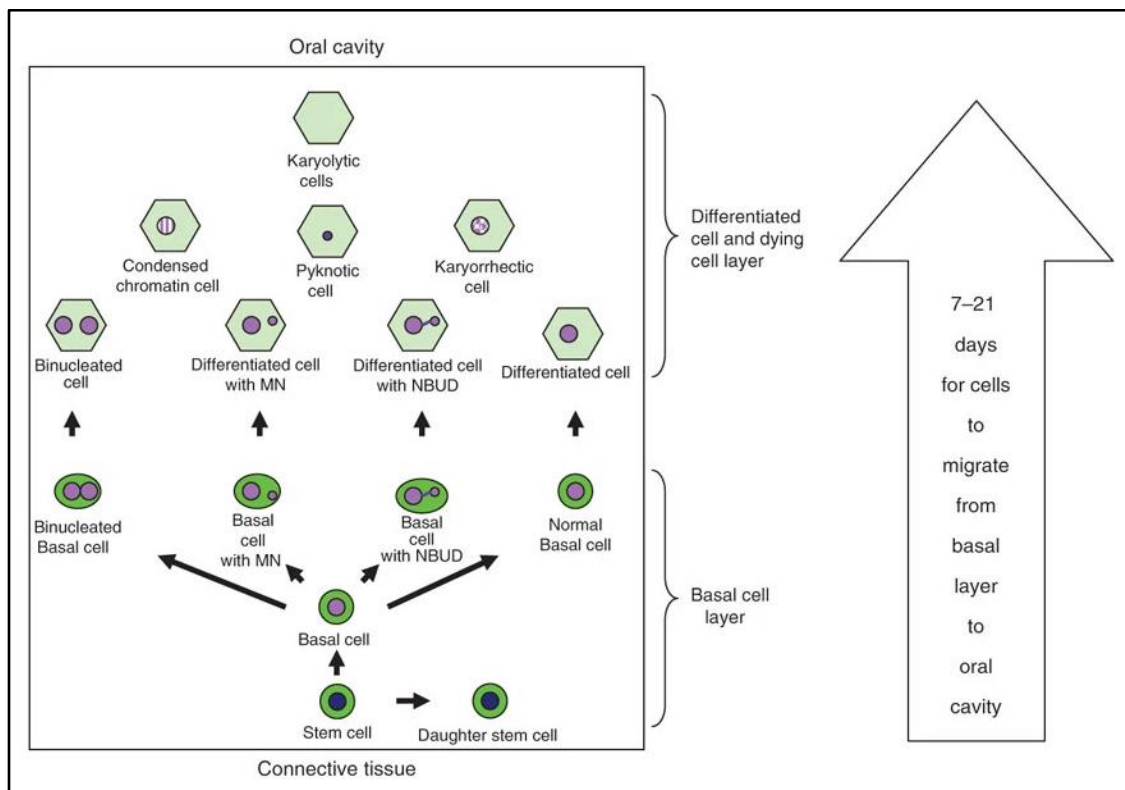


Figura 3. Tiempo que transcurre en la migración celular desde la capa basal hasta la cavidad oral. Representación del tiempo que lleva cada evento de una célula madre en su diferenciación y muerte celular y los diferentes tipos de daño genético que pueden ocurrir (Thomas, P., et. al., 2009).

La importancia del uso de células exfoliadas en ensayo de MN no solo radica en la idea antes externada, si no que al ser los tejidos epiteliales la primer barrera ante agentes genotóxicos

inhalados o ingeridos, se asocia a que más del 90% de los diferentes tipos de cáncer emergen de tejido epitelial (*Fenech, M., et. al., 1999*).

Al ser demostrada la presencia de MN y otras anomalías nucleares a estas células, con no solo el cáncer sino con envejecimiento acelerado y algunas enfermedades degenerativas, el programa colaborativo HUMAN MicroNucleus (HUMN) lanzó una iniciativa conocida como proyecto HUMN (XL) ('XL' que designa a la célula exfoliada), donde una gran cantidad de laboratorios publican información y resultados sobre el ensayo de MN en células bucales, esto con el fin de recopilar información metodológica sobre el desempeño del ensayo y contar con una descripción general para la recolección de las células bucales y su preparación, preparación de portaobjetos, tinción, datos epidemiológicos y criterios de puntuación; promoviendo una mejora en la estandarización de los métodos (*Bonassi, S., 2009*).

Parte del procedimiento estándar para el conteo de MN en células exfoliadas, es el uso de un depresor de lengua o un citocepillo cuando se recolecta de mucosa oral o nasal, mientras que las células uroteliales de una muestra de orina se aíslan por centrifugación y dejando caer unas gotas de la muestra sobre el portaobjetos se procede a fijar las células y teñirlas con tinción de Giemsa, Feulgen (específico de cromatina) o tintes fluorescentes como yoduro de propidio o Hoechst 33258. Cabe mencionar, que los diferentes métodos en la recolección, fijación y tinción de las células han sido estandarizados permitiendo que cada laboratorio designe el método que mejor le convenga. Concluyendo así, que el ensayo de MN en células exfoliadas es un biomarcador específico para la exposición de toxinas genéticas y agentes causantes de cáncer (*Fenech, M., et. al., 1999*).

3.4 FUNDAMENTO DE LA TINCIÓN DE FEULGEN

La reacción de Feulgen es un método citoquímico propuesto en 1924 por Robert Feulgen y Heinrich Rossenbeck que ha permitido revelar el ADN, mostrando las muestras positivas con un color magenta (rojo-púrpura) (*Mello, M. & Campos B., 2017*).

Presenta ventajas, como su alta reproducibilidad, almacenamiento a largo plazo del material biológico, la determinación de cantidades muy pequeñas de ADN y la aplicabilidad a células individuales, esto lo convierte en un método útil en la evaluación de la frecuencia de MN, anomalías cromosómicas, cocientes apoptóticos, cocientes de alteraciones mitóticas, así como la evaluación de índices mitóticos, lo que abre camino a su uso dentro del diagnóstico (*Mello, M. & Campos B., 2017*).

Este método ha sido determinado como una tinción altamente específica para el ADN, puesto que aún si el tejido presentara grupos aldehídos libres, este no podrá dar como resultado un falso positivo, ya que la hidrólisis ácida evita que esto ocurra (*Kiernan, J., 2015*).

El fundamento de la tinción de Feulgen consta de dos pasos, el primero involucra una hidrólisis ácida, y el segundo, el tratamiento con un leucoderivado de fucsina básica, conocido como reactivo de Schiff (*Mello, M. & Campos B., 2017*).

1. Hidrólisis ácida:

Involucra la desnaturalización del ADN y depurinación de este mismo, es decir, ocurre la separación de las bases de purina y pirimidina del azúcar desoxirribosa dejando intacta la estructura del ADN y exponiendo los grupos aldehídos (Ver Fig. 4), dicho evento se eleva gradualmente en cuanto va aumentando el tiempo de hidrólisis, hasta que éste alcanza su máximo; sin embargo, en cuanto más avanza la hidrólisis, el filamento de ADN puede romperse, lo que conlleva una pérdida de fragmentos de ADN perturbando la estequiometría de la reacción, por lo que el tiempo estimado para la hidrólisis en cuanto a la metodología debe ser cumplido (*Mello, M., et. al., 2017; Chieco, P. & Derenzini, M. 1999*).

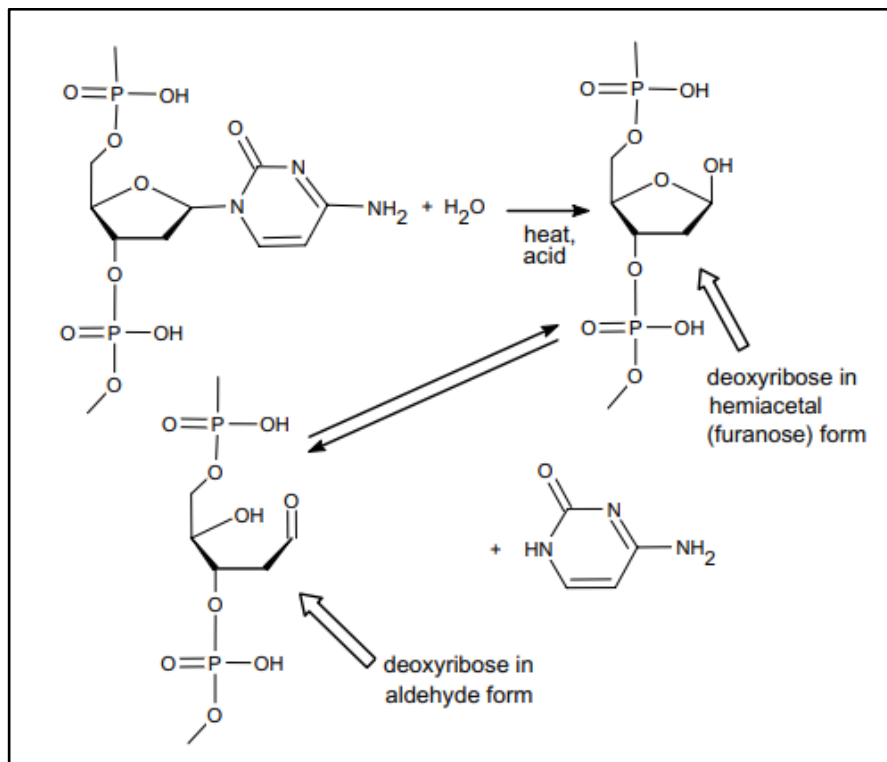


Figura 4. Hidrólisis de una base pirimídica. La cadena de ADN en presencia de HCl más H₂O, se hidroliza parcialmente, llevando a la pérdida de la citosina y permaneciendo la desoxirribosa en su posición original y en su forma aldehído (*J. A. Kiernan, 2015*).

2. Tratamiento con reactivo de Schiff:

Seguido del paso hidrolítico, los sitios celulares con grupos aldehídos reaccionan con el reactivo de Schiff, dando como resultado un color magenta (*Chieco, P., et. al., 1999*).

El reactivo de Schiff se logra obtener a partir de la fucsina básica compuesta principalmente por el colorante de pararosnilina, en presencia de H_2SO_3 y agua. Por lo que antes de abordar el mecanismo de acción del reactivo de Schiff con los grupos aldehídos, se abordará algunos datos sobre la química de la pararosnilina.

La fucsina básica es una mezcla de tintes con estructuras trifenilmetano, de los cuales casi en su totalidad se encuentra compuesta de pararosnilina o fucsina nueva (Kiernan, J., 2015).

A continuación se muestra la estructura de la Pararosnilina en sus dos posibles estructuras de resonancia (Ver Fig. 5).

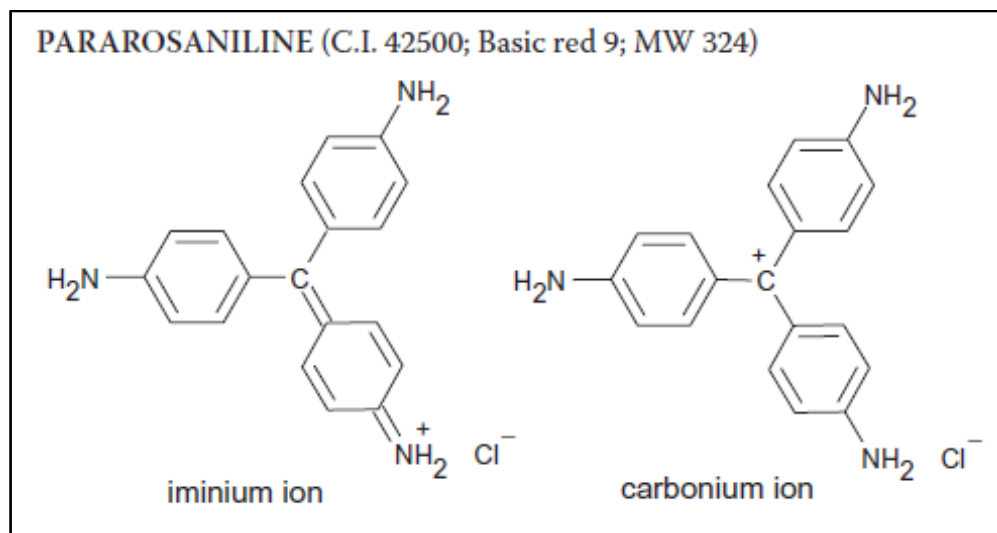


Figura 5. Estructura molecular de la Pararosnilina. Se muestran dos moléculas de Pararosnilina en sus dos posibles estructuras de resonancia en la que se puede presentar. Uno de los anillos se encuentra en su forma quinonoide en la primer estructura molecular a la izquierda y en su forma aromática en la siguiente estructura molecular a la derecha (J. A. Kiernan, 2015).

En cualquiera de los tres anillos se puede presentar una configuración quinonoide o aromática. Además, puede presentarse la carga positiva en cualquiera de los átomos de nitrógeno o en el carbono central.

Para obtener la decoloración de la pararosnilina para la obtención del reactivo de Schiff, se logra a partir de diferentes métodos, una de estas implica el tratamiento con ácido sulfuroso, tratamiento que se detalla más adelante (Kiernan, J., 2015).

Se han propuesto dos teorías respecto al mecanismo de acción entre el reactivo de Schiff y los grupos aldehídos, sin embargo, una ellas es más aceptada por su respaldo en ensayos en cromatografía y electroforesis de productos de reacción que derivan del reactivo de Schiff. De acuerdo a lo anterior, la teoría mayormente aceptada determina que el reactivo de Schiff está compuesto por pararosnilina blanqueada y SO_2 en exceso, formando este último en solución acuosa, ácido alquilsulfónico al reaccionar con los grupos aldehídos del ácido apurínico, que prosigue con la unión de N de la amina aromática primaria del leucoderivado

de pararosanilina, con el átomo de carbono del ácido alquilsulfónico (Mello, M. & Campos B., 2017).

La elaboración del reactivo de Schiff se lleva a cabo mediante el tratamiento de una solución de fucsina básica y ácido sulfuroso que se forma cuando el dióxido de azufre se combina con agua (Ver Fig. 6).

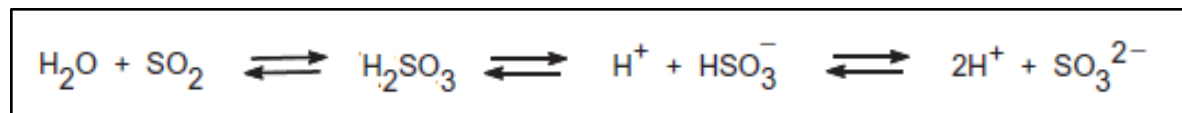


Figura 6. Reacción en la síntesis de ácido sulfuroso. Al reaccionar dióxido de azufre con agua, se forma ácido sulfuroso, compuesto que reaccionará posteriormente con la pararosanilina (J. A. Kiernan, 2015).

El ácido sulfuroso que contiene dióxido de azufre libre, se forma durante la preparación del reactivo de Schiff, a partir de la reacción de un bisulfito, que generalmente es metabisulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) con un ácido mineral (como es el HCl), o a partir de cloruro de tionilo con agua, o burbujeando dióxido de azufre gaseoso a través de una solución acuosa del tinte.

La reacción con ácido sulfuroso añade ácido sulfónico al carbono central del trifenilmetano (Ver Fig. 7).

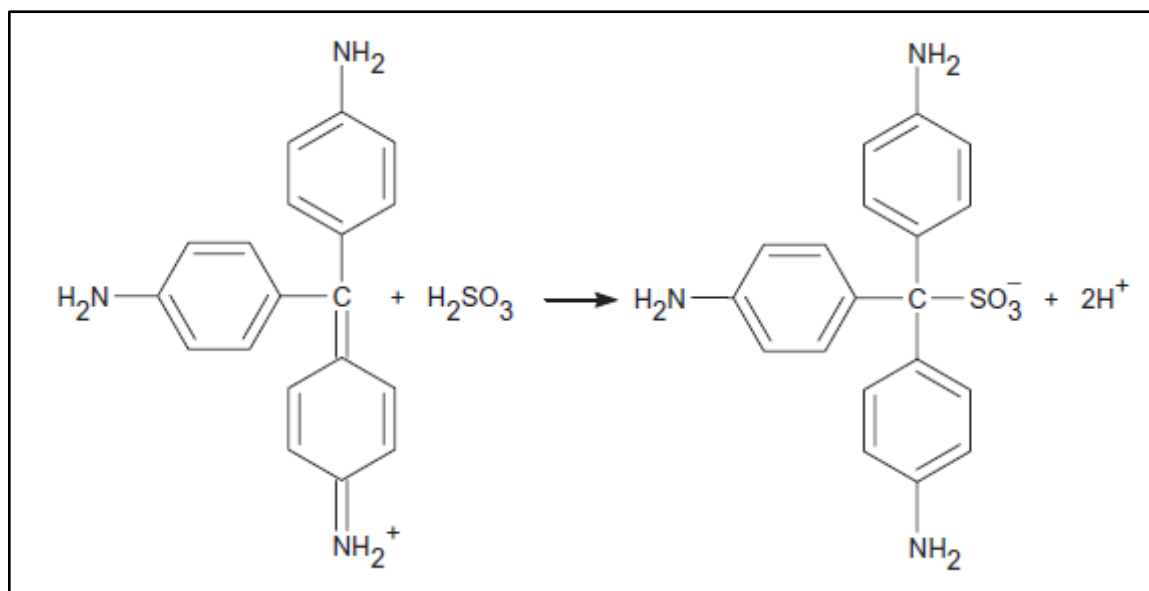


Imagen 7. Formación del derivado incoloro del colorante. Adición de ácido sulfónico a la pararosanilina (J. A. Kiernan, 2015).

Por lo tanto, el reactivo de Schiff consiste en una solución de este compuesto incoloro que ha derivado del colorante en agua con ácido sulfuroso en exceso.

El reactivo de Schiff prosigue a reaccionar con aldehídos, pero no con cetonas, sabiendo además, que el tinte no se vuelve a colorear, si no que al unirse los aldehídos con el leucoderivado, se restablece la estructura del colorante (Ver Fig. 8), obteniendo así un color magenta (Mello, M., et. al., 2017; Kiernan, J., 2015).

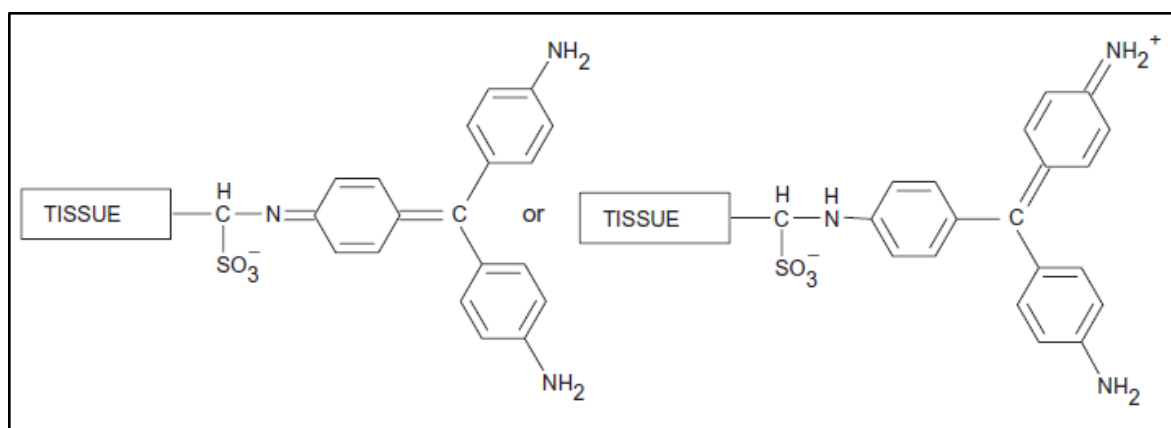


Imagen 8. Derivados del ácido aquilsulfónico de la pararosanilina (J. A. Kiernan, 2015).

Diferentes investigaciones han coincidido en atribuir la estructura anterior al principal compuesto coloreado que se forma cuando el reactivo de Schiff reacciona con grupos aldehídos que se encuentran unidos a los tejidos. Ambos compuestos son derivados de ácido alquilsulfónico de pararosanilina, y se esperaría que las dos estructuras existieran en equilibrio tautomérico.

Kiernan J. A. en 2015 menciona que aún existe cierta incertidumbre sobre si el grupo aldehído reacciona primero con el ácido sulfuroso para formar un compuesto bisulfito, que luego se condensa con un grupo amino del reactivo de Schiff, o si el grupo amino del reactivo de Schiff reacciona en primer lugar con el aldehído para formar una imina y posteriormente se sulfona. Sin embargo, se sabe por el artículo “*The Feulgen reaction: A brief review and new perspectives*” de Mello y colaboradores en 2017, que la primera opción podría ser la más certera.

La segunda etapa de cualquiera de los dos esquemas, se elimina el grupo ácido sulfónico de la molécula de colorante y se restablece el cromóforo de trifenilmetano (Kiernan, J., 2015).

JUSTIFICACIÓN

La ortodoncia ha tenido como objetivo lograr la corrección de malposiciones dentarias y de trastornos maxilofaciales, encaminándolo al desarrollo e implemento de diversos tratamientos que permiten una mejora en la oclusión dentaria, resistencia a las caries e incluso mejoras ante enfermedades periodontales, uno de los tratamientos comúnmente utilizados en la ortodoncia, es el uso de aparatología ortodóncica fija, que son elaborados en su mayoría por metales. Según estudios, algunos metales pueden acumularse en la cavidad oral debido a las propiedades enzimáticas, microbiológicas y térmicas que son ideales para la biodegradación de metales. El interés en los datos sobre su biocompatibilidad al ocasionar eventos genotóxicos lo vuelve un tema de gran relevancia.

OBJETIVOS

GENERAL

Analizar células epiteliales de la mucosa bucal de pacientes con aparatología ortodóncica fija por ensayo de MN, con la finalidad de realizar un biomonitoreo del daño al ADN y determinar si el material del que está elaborado el aparato de ortodoncia es capaz de inducir un efecto genotóxico.

PARTICULARES

- Obtener muestras de células epiteliales de la cavidad bucal por raspado bucal en los carrillos de pacientes que estén en tratamiento con aparatología ortodóncica fija y antes del tratamiento.
- Realizar la tinción de Feulgen en las muestras obtenidas para evidenciar la presencia de MN.
- Realizar el conteo de 2000 células por paciente y de células micronucleadas (antes del tratamiento y a los 12 meses).
- Interpretar los resultados a través de su análisis estadístico y determinar si el uso de aparatología ortodóncica fija es capaz de inducir daño genotóxico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Grupo al que se insertó el aparato de ortodoncia

Se realizó la toma de muestra a una población constituida por 41 pacientes al cumplir 12 meses con el equipo de ortodoncia fija, de los cuales se tuvo su previo consentimiento (Ver Anexo I) y cumplieron con los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

- **Criterios de inclusión**
 - ✓ Pacientes con 12 meses de tratamiento con aparatología ortodóncica fija
 - ✓ Pacientes en un rango de edad de 12 a 26 años
 - ✓ Pacientes que no tengan restauraciones dentales metálicas
 - ✓ Que la participación sea voluntaria
 - ✓ Que firmen la carta de Consentimiento Informado

- **Criterios de exclusión**
 - ✓ Pacientes con tratamiento previo de ortodoncia
 - ✓ Pacientes con antecedentes de tabaquismo

Grupo control

La población control la conforman los mismos 41 pacientes antes de colocarles el aparato de ortodoncia, de los cuales se tuvo un previo consentimiento momentos antes de realizar la toma de muestra.

- **Criterios de inclusión**
 - ✓ Pacientes con 12 meses de tratamiento con aparatología ortodóncica fija
 - ✓ Pacientes en un rango de edad de 12 a 26 años
 - ✓ Pacientes que no tengan restauraciones dentales metálicas
 - ✓ Que la participación sea voluntaria
 - ✓ Que firmen la carta de Consentimiento Informado

- **Criterios de exclusión**
 - ✓ Pacientes con tratamiento previo de ortodoncia
 - ✓ Pacientes con antecedentes de tabaquismo

Toma de muestra

La toma de muestra se realizó en la Unidad de Especialidades Odontológicas, Av. Industria Militar, Ciudad de México, México. Puesto que la toma de muestra es poco invasiva y no es necesario seguir una dieta u algún otro protocolo a la toma, los pacientes asistieron a la Unidad de Odontología y previo al raspado bucal, realizaron un suave enjuague bucal con agua potable para remover residuos de alimentos u otros artificios que puedan interferir en el

análisis, posteriormente se realizó el raspado en ambos carrillos internos de la boca con un cepillo durante un tiempo de 30 segundos, consecuente a esto, se realizó un frotis en un portaobjetos limpio, libres de polvo y grasa. Se volvió a hacer el mismo procedimiento una vez más por cada paciente, ya que un frotis se mantendrá de respaldo por si la primera se llegara a dañar o el material a analizar es insuficiente.

Tinción de laminillas

Las laminillas fueron conservadas dentro de tubos Falcon hasta su tinción. Las laminillas se fijaron en metanol absoluto por 10 minutos hasta el momento de la tinción. Se continuó con la tinción de Feulgen realizando los siguientes pasos:

1. Sumergir las laminillas en un vaso Coplin con solución de HCl 5M a 25°C por 15 minutos.
2. Enjuagar las laminillas en un vaso Coplin con agua destilada por 3 minutos.
3. Sumergir las laminillas en un vaso Coplin con reactivo de Schiff a 25°C por 30 minutos.
4. Enjuagar las laminillas en un vaso Coplin con agua destilada por 10 minutos.

Análisis citogenético

El estudio citogenético se realizó por ensayo de MN, en el que se analizó la cantidad de MN encontrados en cada tiempo de tratamiento. Para la identificación de MN se realizó un conteo celular de 2000 células por paciente en cada tiempo de tratamiento, T0 y T12 (antes de colocar la AO fija y a los 12 meses de tratamiento), es decir, tomando en cuenta la cantidad de pacientes se realizó el conteo celular de 82 laminillas con ayuda del microscopio óptico compuesto a un aumento de 40x.

Análisis estadístico

Se realizó una estadística descriptiva de ambos grupos, donde fueron incluidos la media, desviación estándar y valores mínimos y máximos. Además, se obtuvo la media \pm desviación estándar de los resultados que se obtuvieron en ambos sexos (femenino y masculino) en los diferentes tiempos de tratamiento. Fue realizada una estadística descriptiva y no un método estadístico más complejo dado que no hubo presencia de MN.

RESULTADOS

La Figura 9 muestra las fotografías que fueron capturadas durante el conteo de células epiteliales de la mucosa bucal a partir de la técnica de MN. En estas fotografías se pueden apreciar los núcleos de cada célula así como los MN (estructuras en color fucsia), parámetro que se tomó en cuenta para el conteo.

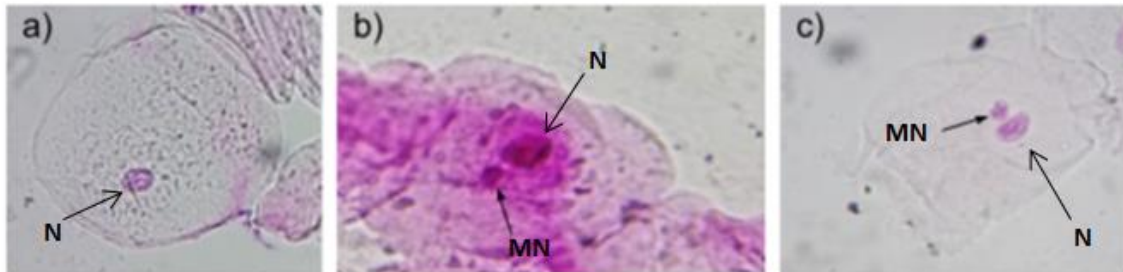


Figura 9. Células de la mucosa oral con tinción de Feulgen observadas con microscopio óptico compuesto a 40x. a) Célula con núcleo (N), b) y c) Célula micronucleada. Fuente: Creación propia.

La población está constituida por 41 pacientes, a los cuales se les tomó la muestra antes de colocar la aparatología ortodóncica y al cumplir 12 meses con la aparatología ortodóncica fija, donde se evaluó la frecuencia de MN, realizando un conteo celular de 2000 células por paciente y en cada tiempo.

Por lo que los datos se clasificaron en dos grupos en función del tiempo transcurrido del tratamiento, como se muestra en la Tabla 1.

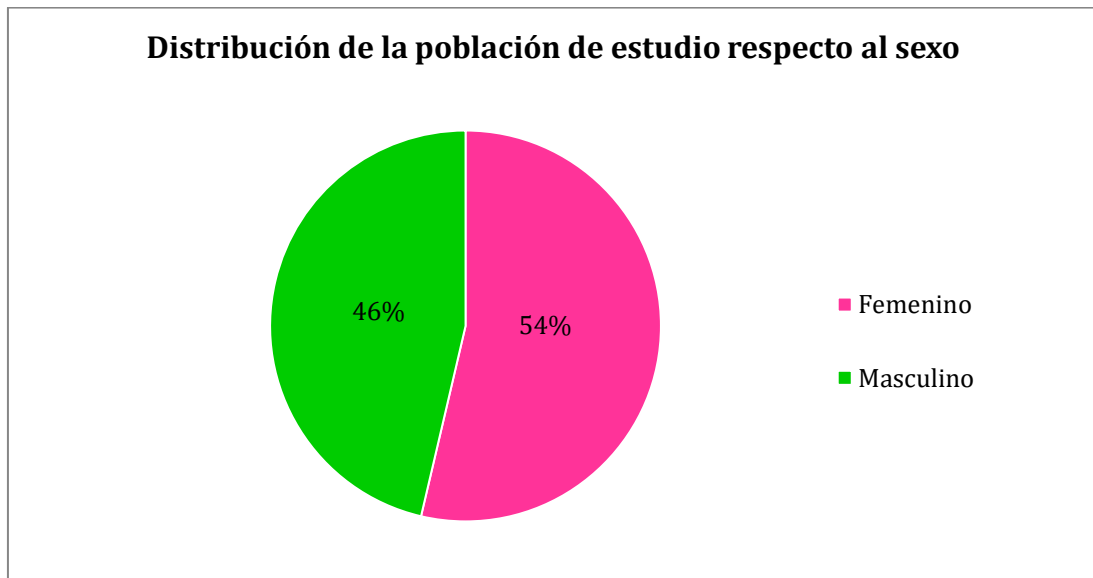
Tabla 1. Número de MN encontrados en el conteo de 2000 células de cada paciente.

Micronúcleos					Micronúcleos				
Código	Edad	Sexo	T0 (0 meses)	T12 (12 meses)	Código	Edad	Sexo	T0 (0 meses)	T12 (12 meses)
1	12	F	0	1	21	15	F	0	0
2	15	F	0	1	22	13	M	0	0
3	26	M	0	0	23	19	F	0	0
4	13	F	0	1	24	13	F	0	0
5	22	F	0	1	25	13	M	0	0
6	14	M	0	0	26	23	F	0	0
7	13	M	0	0	27	12	M	0	0
8	17	M	1	2	28	13	F	0	1
9	13	F	0	1	29	13	M	0	0
10	20	M	0	0	30	14	M	0	0
11	13	M	0	0	31	13	F	0	0
12	13	F	0	1	32	13	M	0	0
13	15	F	0	0	33	12	F	0	0
14	16	M	0	0	34	13	F	0	0
15	14	F	0	0	35	24	M	0	0
16	18	M	0	0	36	14	F	0	0
17	12	F	0	0	37	14	M	0	0
18	13	F	0	0	38	13	M	0	0
19	14	F	0	0	39	13	M	0	0
20	16	F	0	0	40	24	M	0	0
					41	25	F	0	0

Tabla 2. Estadística descriptiva de los resultados obtenidos

<i>T0</i>		<i>T12</i>		<i>Edad</i>	
Media	0.0243	Media	0.219	Media	15.48
Desviación estándar	0.156	Desviación estándar	0.474	Desviación estándar	4.02
Mínimo	0	Mínimo	0	Mínimo	12
Máximo	1	Máximo	2	Máximo	26

A continuación, se muestra la distribución de la población respecto al sexo.



Gráfica 1. Distribución de la población referente al sexo. En la gráfica se muestra que el mayor porcentaje de la población se concentra en el sexo femenino y un menor porcentaje en el sexo masculino.

Así mismo, en la Tabla 3 se muestra la comparación de la media y desviación estándar de MN en el sexo femenino y masculino respecto a cada grupo (T0 y T12).

Tabla 3. Presencia de MN en el sexo femenino y masculino en diferentes tiempos de tratamiento con su desviación estándar

<i>Grupo</i>	<i>Sexo</i>	
	<i>F</i>	<i>M</i>
<i>T0</i>	0	0.053±0.053
<i>T12</i>	0.318±0.102	0.105±0.105

F: Femenino; M: Masculino

DISCUSIÓN

El desgaste de las AM de la AO fija en la cavidad bucal, provoca la liberación de iones metálicos, como Cr, Ni, Co, Cu, y Fe, algunos de ellos potencialmente genotóxicos (Martínez, J., 2015). Ante ello, han surgido métodos confiables para la evaluación de genotoxicidad como es la prueba de MN. Los MN son biomarcadores presentes en etapas tempranas de enfermedades crónicas como es el cáncer, es por ello que la identificación de un aumento en su frecuencia puede ser de ayuda al predecir un desarrollo neoplásico; radicando ahí su importancia y su uso en el presente proyecto (Ferré et al., 2018).

Para la evaluación y análisis de los resultados obtenidos, se desarrolló una estadística descriptiva de los datos y no una estadística con mayor complejidad ya que como se aprecia en la Tabla 1, antes y a los 12 meses del tratamiento hubo muy baja presencia de MN. Por lo que, respecto al tiempo de tratamiento establecido (0 y 12 meses), la cantidad de población evaluada (41 pacientes), el número establecido de células epiteliales bucales leídas y el método utilizado para la biomonitorización de genotoxicidad y por supuesto la ausencia de MN, se determina que la AO fija bajo estas condiciones, no es un factor genotóxico.

A lo largo de los años y en busca de una respuesta contundente de los efectos genotóxicos que la AO podría ocasionar, se han desarrollado varias investigaciones y estudios enfocados en métodos que evidencien si los materiales de los que son elaborados los brackets son capaces de inducir un daño genotóxico.

Por ejemplo, en el año 2013 se realizó una evaluación a 25 pacientes de edades entre 12 y 20 años, con brackets de acero inoxidable y arcos de alambre de Ni-Ti o acero inoxidable, de los cuales fueron recolectadas las muestras de células de la mucosa bucal justo antes de la colocación del aparato de ortodoncia y a los 9 meses después de su aplicación y fueron analizadas las muestras con la prueba de MN. Con el resultado obtenido, concluyeron que la AO fija no expone a pacientes sanos a un mayor riesgo de daño en el ADN en las células de la cavidad oral (Heravi, F., et. al., 2013).

Otra de las evidencias halladas, fue un estudio en el que realizaron una evaluación a 23 adultos sanos con un promedio de edad de 18.5 ± 7 años, antes, durante y después del tratamiento; el objetivo fue evaluar el daño en el ADN (MN) y la muerte celular (pícnosis, cariólisis y cariorrexis), hallando que la terapia con AO fija no es un factor que induzca daño al ADN, ni es capaz que provocar citotoxicidad. Además, el autor expone la importancia de esta clase de evaluaciones, puesto que el daño en el ADN y la muerte celular son eventos importantes cuando ocurren procesos cancerígenos, primordialmente en las primeras fases (Angelier, F., et. al., 2009).

Cabe destacar, que uno de los autores toma como referencia estudios previos en los que se encontraron niveles significativos de daño en el ADN causado por la AO fija (evidencias que profundizaremos más adelante), sin embargo, estos estudios fueron realizados en períodos cortos de tiempo, por lo que el autor para su análisis, amplía el tiempo de tratamiento en cada paciente. En este estudio se evaluaron a 74 pacientes con tratamiento (utilizando brackets y

alambres de acero inoxidable) y 21 pacientes controles, entre 11 y 35 años, los cuales fueron agrupados en 4 grupos diferentes respecto al tiempo de tratamiento (de 1 mes a 12 meses; de 3 a 24 meses; de 25 a 48 meses; y mayores de 48 meses) y se evaluaron las células epiteliales de cada paciente con la prueba de MN y como resultado no se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa en ninguna de las anormalidades genotóxicas (células micronucleadas, mononucleadas, binucleadas, trinucleadas, picnosis, yemas nucleares y broken eggs) excepto para la cariólisis, puesto que hubo niveles aumentados en el grupo de control en comparación con el grupo con mayor tiempo de tratamiento. Demostrando así, que la AO fija incluso después de largos períodos de tiempo no demuestra evidencias de que genere un efecto genotóxico (*Flores, M., et. al., 2019*).

Así como las evidencias halladas en toda esta serie de estudios e investigaciones, el presente proyecto muestra una vez más que la AO fija no es un factor genotóxico. A pesar de que es posible que ocurra la liberación y exposición de IM durante el tratamiento con AO fija, esta no es clínicamente lo suficientemente significativa como para causar daño al paciente. Esto puede deberse a la adaptabilidad en los individuos durante el tratamiento de ortodoncia, la capacidad de reparación, así como la reversión de los efectos nocivos que ocurren después de extraer el dispositivo. Sin excluir, que incluso la ausencia de efectos genotóxicos es debido a la rápida división celular y capacidad de las células epiteliales para renovarse y regenerarse en un corto período de tiempo, de 7 a 14 días (*Flores, M., et. al., 2019*).

Otras fuentes pueden variar un poco, algunas indican que la tasa de renovación de las células epiteliales bucales humanas (que ocurre en la capa basal del epitelio) varía de 7 a 21 días y algunos autores estiman 14 días en promedio. Por lo que la presencia de MN en las células epiteliales exfoliadas estaría reflejando el daño cromosómico que se ha producido en las células de la capa basal 1-3 semanas antes (*Heravi, F., et. al., 2013*).

Sin embargo, existe información relevante en el que las AM generan daños al ADN al propiciar un daño oxidativo o por interferencia en su replicación, incluso los IM logran inhibir la reparación del ADN en tejidos orales (*Díaz, A., 2015*). Otras referencias respaldan que la liberación de cationes provenientes de la AO fija puede ocasionar cambios importantes, como alteraciones en la síntesis de ADN y alteraciones en la actividad que desempeña la fosfatasa alcalina, ambos eventos a concentraciones no citotóxicas, por lo que no se puede excluir que incluso las concentraciones no tóxicas pueden propiciar cambios biológicos importantes como estos (*Martín, A., et. al., 2015b*).

Una de las fuentes encontradas que revelan la capacidad de renovación y adaptabilidad que pueden tener las células epiteliales de la cavidad bucal es desarrollada por Natarajan y cols. en 2011, que se encargaron de evaluar la presencia de MN, tomando una muestra de células epiteliales de la cavidad bucal de 20 pacientes que habían sido tratados con AO fija durante un mínimo de 18 meses y 30 días después de retirarlos, llevando a cabo la misma evaluación en un grupo control de 20 pacientes y concluyendo que las aleaciones de Ni y Cr de los aparatos de ortodoncia liberan la cantidad suficiente de IM para inducir un efecto genotóxico localizado, mismo que se revierte al remover la aparatología (*Natarajan, M., et. al., 2011*).

Otro dato importante es la descarga de IM que puede ocurrir al inicio del tratamiento y su variación a lo largo de este. Por ejemplo, en uno de los estudios cuantificaron la concentración de Ni y Cr en pacientes con AO fija, y hallaron un aumento de IM a los tres días de su colocación, pero no encontrando a los tres meses. Otro estudio demostró que después de 5-10 minutos después de haber sido colocado la AO fija, hubo una liberación elevada de IM que fue disminuyendo con el tiempo y que el incremento de iones, fue ocasionado por la manipulación de las bandas, alambres y aditamentos de ortodoncia, debido a la abrasión de la superficie metálica (*Martínez, J., 2015*).

Además de que la liberación de iones disminuye y/o posteriormente ya no hay liberación, se ha reportado que la liberación de los componentes provenientes de los materiales dentales es gradual y lenta, así como también se ha evidenciado que la velocidad de liberación de IM no es proporcional a su concentración, ya que esto depende principalmente a la resistencia a la corrosión en la cavidad bucal, así como de la calidad y cantidad de aleaciones, su manipulación al ser colocadas, el factor nutricional, el flujo y pH salival y la higiene bucal (*Martínez, J., 2015*). Lo que deja observar, que el tiempo no es la única variable importante a considerar cuando se aborda el tema de Bc con brackets.

Otro de los puntos importantes a destacar en el proyecto, es la elección de la tinción de Feulgen que fue estandarizada en los laboratorios de FES Cuautitlán Campo 1, elección que fue tomada por ser una tinción con una alta especificidad al ADN, además de permitir la observación de un citoplasma claro y transparente que brinda una identificación más exacta y sencilla (*Metgud, R. & Neelesh, B., 2018*). Además, permite almacenar a largo plazo las laminillas fijadas, puesto que las muestras fueron teñidas en los laboratorios de FES Cuautitlán Campo 1 y algunas de ellas fueron evaluadas 8 meses después en el microscopio óptico compuesto (*Mello, M. & Campos B., 2017*).

Si bien, aunque no fue posible determinar con exactitud los metales y sus concentraciones que conforman a los brackets que se les colocó a cada paciente por el tiempo y los recursos que representaría llevarlo a acabo, se tiene reporte de que los metales que con mayor frecuencia se encuentran en la aparatología ortodoncia son Co, Cr, Fe, Ni y Ti, no descartando que pueden encontrarse otros metales dependiendo su fabricación (*Martín, A., et. al., 2015a*).

De acuerdo a lo antes mencionado, varios estudios en saliva han reportado que los niveles de Ni y Cr deben ser monitoreados debido a su toxicidad, en el que Cr y especialmente Ni se han investigado por sus propiedades alergénicas, efectos mutagénicos, citotóxicos y cancerígenos, lo que hace preludio a lo que se expondrá a continuación (*Martín, A., et. al., 2015a*).

En el caso de Ni su evidente interés se debe a su propiedad carcinogénica ocasionada por algunos compuestos del metal clasificados como compuestos carcinógenos del grupo 1 para humanos por parte de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC); si bien, aunque se desconocen los mecanismos exactos de carcinogénesis, es probable que los compuestos de Ni participen en rutas epigenéticas y genéticas (*Martín, A., et. al., 2015a*).

Otras consecuencias que han sido encontradas en las células por Ni(II) es el daño cromosómico, daño oxidativo en las bases del ADN, enlaces cruzados ADN-proteína e inhibición en la reparación del ADN. Y en efectos epigenéticos, altera la expresión génica causada por la hipermetilación del ADN, la activación y supresión de algunos genes y factores de transcripción, así como la supresión de la acetilación de histonas (*Martín, A., et. al., 2015a*).

Sin embargo, los riesgos de daño genético por Ni se consideran mínimos, debido a que no se han hallado informes de carcinogenicidad en relación al uso intraoral de aleaciones dentales que contienen Ni (*Martín, A., et. al., 2015a*).

Además, no hay que descartar que son algunas de las AM más bioestables que otras al encontrarse en condiciones como las que presenta la cavidad oral y esto puede ser un punto de partida importante al momento de elegir materiales de los que podrían elaborarse la aparatología, por ejemplo, un estudio realizó una evaluación *in vivo* de la genotoxicidad ocasionada por AM como acero inoxidable, Ti y libres de Ni (habitualmente utilizadas en los tratamientos de ortodoncia), en el cual aplicaron a pacientes de entre 12 y 16 años, brackets y tubos elaborados con dichas aleaciones y evaluaron muestras de células de la mucosa bucal antes y 30 días después del tratamiento con el Ensayo Cometa. Encontraron que el acero inoxidable y aleaciones libres de Ni, indujeron un mayor daño en el ADN que las aleaciones de Ti, (puesto que los resultados con aleaciones de Ti fueron similares a los controles), concluyendo que los brackets y tubos de Ti son los más biocompatibles de las tres aleaciones (*Fernández, E., et. al., 2011*).

De acuerdo a lo antes mencionado, en una evaluación donde cuantificaron la concentración de Ni liberado en tres tipos de arcos de ortodoncia lingual: acero inoxidable, NiTi y CuNiTi. Hallaron después de la inmersión de los arcos en solución salina a los 7, 14 y 30 días, que los elaborados con acero inoxidable son los que liberan mayor cantidad de Ni en comparación con los otros dos tipos de arcos. (*Martín, A., et. al., 2015a*).

Así mismo, en otro estudio compararon la concentración de IM liberados en un medio de cultivo durante 30 días de 3 tipos de aleaciones, acero inoxidable, aleaciones libres de Ni y aleaciones libres de Ti, con resultados que demuestran que los materiales con más susceptibilidad a la corrosión son aquellos con una mayor cantidad de Ni, liberando mayores cantidades de Fe, Mn y Cr durante la primer semana de inmersión. Concluyendo que los tubos y brackets de aleación de Ti fueron los más biocompatibles a comparación del resto (*Martín, A., et. al., 2015a*).

Para finalizar, es relevante mencionar que aunque la genotoxicidad puede ser parte de procesos cancerígenos o mutagénicos, hasta ahora no ha habido ningún estudio que informe una asociación de estas condiciones con la AO fija, además de que no existe evidencia de daño genotóxico permanente, aunque se halla retirado la aparatología. Esto podría relacionarse a la reparación de lesiones que realizan las células sanas (*Natarajan, M., et. al., 2011*).

Además las concentraciones de IM liberados por AO fija se encuentra significativamente por debajo de la ingesta diaria aceptada, no alcanzando concentraciones tóxicas (*Fiorenzo, F., et. al., 2003*).

Probablemente todas las contradicciones entre los resultados en este campo se deba a diferencias en el diseño de los estudios, por ejemplo en el tamaño de la muestra, el rango de edad de los pacientes, el método utilizado para la detección de efectos genotóxicos, los factores de riesgo a los que estuvieron expuestos, la variabilidad entre las condiciones individuales de la cavidad bucal y los materiales involucrados en la fabricación de la aparatología en el tratamiento también varían entre los estudios (*Heravi, F., et. al., 2013; Fernández, E., et. al., 2011*).

Sin embargo, hasta el término del proyecto la mayor cantidad de evaluaciones analizadas han reflejado que la AO fija no ejerce un potencial genotóxico en células de la cavidad bucal, por lo que podrían ser necesarios más estudios para confirmar estos hallazgos.

CONCLUSIONES

- ✓ Bajo las condiciones establecidas en este estudio y como se ha demostrado con el ensayo de MN, la aparatología ortodóncica fija no exponen a los pacientes a un mayor riesgo de daño genotóxico en las células de la mucosa oral.
- ✓ Se demuestra la eficacia de la tinción de Feulgen al observar e identificar perfectamente las estructuras que revelan un evento genotóxico, además de conservar a largo plazo el material biológico, pues las laminillas permanecieron con la nitidez y claridad al verlas al microscopio óptico desde el momento en que se tiñeron, hasta el momento de ser analizadas, aún al haber transcurrido varios meses.

REFERENCIAS

- [1] Angelieri, F., Carli, V., Martins, R. & Ribeiro, D. (2009) Biomonitoring of mutagenicity and cytotoxicity in patients undergoing fixed orthodontic therapy. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedic*, 139(4), 399-404
- [2] Arango, S. (2012) Biomarcadores para la evaluación de riesgo en la salud humana. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, 30(1), 75-82.
- [3] Arredondo, G. (2011). Evaluación del daño genotóxico de glucofosfoproteínas inmunoestimuladoras mediante la técnica de micronúcleos. [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México]. <http://132.248.9.195/ptb2011/septiembre/0673311/Index.html>
- [4] Bonassi, S., Biasotti, B., Kirsch-Volders, M., et. al. (2009). State of the art survey of the buccal micronucleus assay--a first stage in the HUMN(XL) project initiative. *Mutagenesis*, 24(4), 295-302. doi:10.1093/mutage/geb019
- [5] Bonassi, S., Coskun, E., Ceppi, M., Lando, C., Bolognesi, C., Burgaz, S., Holland, N., Kirsh-Volders, M., et. al. (2011). The HUMAN MicroNucleus project on exfoliated buccal cells (HUMNXL): The role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 728(3), 88-97
- [6] Brugada, A. & Ortiz, A. (2017). *Evaluación de la genotoxicidad de Astragalus membranaceus mediante el ensayo de micronúcleos in vivo en ratones CD1 en un estudio agudo y subcrónico*. [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México]. <http://132.248.9.195/ptd2017/noviembre/0768023/Index.html>
- [7] Caltzontzin, K. (2020). *Ensayo de micronúcleos en células exfoliadas de mucosa oral como biomarcador de genotoxicidad y citotoxicidad en trabajadores de una imprenta industrial expuestos a compuestos orgánicos volátiles* [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México]. <http://132.248.9.195/ptd2020/agosto/0802462/Index.html>
- [8] Cervantes, E., Rodríguez, L., Graniel, J. & Ortiz, A. (2014). Evaluation of the frequency and type of micronuclei in moderately and severely malnourished children. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 30, 23-35
- [9] Chang, R., Goldsby, K. & Hernández, P. (2017). *Química*. McGraw-Hill Interamericana. <https://ebookcentral.proquest.com/lib/bibliodgbsp/detail.action?docID=4849429>.
- [10] Chavarría, I. (2017). *Evaluación del efecto del aceite esencial de Decatropis bicolor sobre la inducción de micronúcleos en células binucleadas en cultivo de linfocitos humanos* [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México] <http://132.248.9.195/ptd2017/enero/0754397/Index.html>
- [11] Cheong, H., Seth, I., Joiner, M. & Tucker, J. (2013). Relationships among micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds within individual cells in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutagenesis*, 28(4), 433-440.

- [12] Chieco, P. & Derenzini, M. (1999). The Feulgen reaction 75 years on. *Histochemistry and Cell Biology*, 111(5), 345- 358.
- [13] Cruz, F. (2011). *El uso de aberraciones cromosómicas y micronúcleos como biomonitores del efecto genotóxico de plaguicidas en personas ocupacionalmente expuestas* [Tesis de licenciatura no publicada]. Universidad Nacional Autónoma de México.
- [14] Dhawan, A. & Bajpayee, M. (2019). *Genotoxicity Assessment*. Humana Press. https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1007/978-1-4939-9646-9_4
- [15] Díaz Rojas, A. R. (2015). *Determinación del perfil genético de los pacientes con aparatología ortodóncica fija de la unidad de especialidades odontológicas* [Tesis para obtener especialidad en ortodoncia, Unidad de Especialidades Odontológicas Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad]
- [16] Faccioni, F., Franceschetti, P., Cerpelloni, M. & Fracasso, M. (2003). *In vivo* study on metal release from fixed orthodontic appliances and DNA damage in oral mucosa cells. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*. 124(6), 687-693.
- [17] Fenech M. (2005). *In Vitro Micronucleus Technique to Predict Chemosensitivity*. Humana Press. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1385/1-59259-889-7:003>
- [18] Fenech, M., Holland, N., Chang, W. P., Zeiger, E., & Bonassi, S. (1999). The HUMAN MicroNucleus Project—An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 428(1), 272–280. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(99\)00053-8](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(99)00053-8)
- [19] Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A., Surralles, J., Crott J., Parry J., et al. (2011). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, 26(1), 125–132.
- [20] Fernández, E., Ortiz, C., Vicente, A., Calvo, J. & Ortiz, A. (2011). Metallic ion content and damage to the DNA in oral mucosacells of children with fixed orthodontic appliances. *Biometals*, 24(5), 935-941.
- [21] Ferré, D., Quero, M., Hynes, V., Saldeña, E., Lentini, V., Tornello, M., Carracedo, R. & Gorla, N. (2018) Ensayo de micronúcleos de citoma bucal en trabajadores de fincas frutícolas que han aplicado plaguicidas alrededor de quince años. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 34(1), 23-33.
- [22] Fiorenzo, F., Franceschetti, P., Cerpelloni, M. y Fracasso, M. (2003). *In vivo* study on metal release from fixed orthodontic appliances and DNA damage in oral mucosa cells. *American Journal of Othodontics and Dentofacial Orthopedics*, 124(6), 687-693.
- [23] Flores, M., Satie, C., Castillo, W., Pereira, M., Calvano, E., Nakane, M., Lima, J., Nelson, P. y Romano, F. (2019) Genotoxic effects in oral mucosal cells caused by the use of

orthodontic fixed appliances in patients after short and long periods of treatment. *Clinical Oral Investigations*, (23)7, 2913-2919

[24] Galeano Patiño, A. C. & Gutiérrez Palacio, T. (2009) *Estandarización de dos técnicas para evaluar actividad y viabilidad celular in vitro en respuesta biomateriales* [Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de Occidente]. <https://red.uao.edu.co/bitstream/handle/10614/1111/TBM00254.pdf;jsessionid=66C5F1A1B31F058899E7CD4E13F908F0?sequence=1>

[25] Giraldo, O. (2004). Metales y aleaciones en Odontología. *Revista Facultad de Odontología Universidad de Antioquia*, 15(2), 53-63.

[26] Gómez, V., Fang, L., Herrera, A. & Díaz, A. (2014). El níquel y su vínculo con el agrandamiento gingival: Revisión de la literatura. *Avances en periodoncia*, 26(2), 83-89.

[27] Gómez, V., Fang, L., Herrera, A. & Díaz, A. (2015). Bioacumulación de níquel en encía, saliva y hueso alveolar de paciente con aparatología ortodóncica fija: reporte de un caso. *Revista clínica de periodoncia y rehabilitación oral*, 8(2), 164-166. <http://dx.doi.org/10.1016/j.piro.2015.03.001>

[28] Graziano, M. & Jacobson-Kram, D. (2015). *Genotoxicity and carcinogenicity testing of pharmaceuticals*. Springer. <https://link-springer-com.pbidi.unam.mx:2443/content/pdf/10.1007%2F978-3-319-22084-0.pdf>

[29] Hayashi, M. (2016). The micronucleus test—most widely used *in vivo* genotoxicity test. *Genes and Environment*, 38(18), 1-6. <https://doi.org/10.1186/s41021-016-0044-x>

[30] Heravi, F., Reza, M., Merati, M., Hasanzadeh, N., Dadkhah, E. & Ahrari, F. (2013). DNA Damage in Oral Mucosa Cells of Patients with Fixed Orthodontic Appliances. *Journal of Dentistry, Tehran University of Medical Sciences*, 10(6), 494-495.

[31] House, K., Sernetz, F., Dymock, D., Sandy, J. & Ireland, A. (2008). Corrosion of orthodontic appliances—should we care? *American Journal of Orthodontics Dentofacial Orthopedics*, 133(4), 584-592

[32] Kiernan, J. (2015). *Histological and Histochemical Methods*. Scion.

[33] Martín Cameán, J. A. (2015). Evaluación de la liberación *in vivo* de iones metálicos a partir de aparatología ortodóncica en diversas matrices y sus potenciales efectos tóxicos [Tesis de doctorado no publicada]. Universidad de Sevilla.

[34a] Martín, A., Jos, A., Mellado, P., Iglesias, A., Solano, E. & Cameán, A. (2015). *In vitro* and *in vivo* evidence of the cytotoxic and genotoxic effects of metal ions released by orthodontic appliances: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 40, 86-113.

[35b] Martín, A., Jos, A., Puerto, M., Calleja, A., Iglesias, A., Solano, E., Cameán, A. (2015). *In vivo* determination of Aluminum, Cobalt, Chromium, Copper, Nickel, Titanium and Vanadium in oral mucosa cells from orthodontic patients with mini-implants by Inductively

coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS). *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 32, 1-39. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2015.05.001>

[36] Martínez, J. (2015). Detección de metales liberados en saliva después de la colocación de coronas níquel cromo: Estudio piloto. [Proyecto terminal de especialidad, Universidad Autónoma del Estado de México]

[37] Mello, M. & Campos B. (2017). The Feulgen reaction: A brief review and new perspectives. *Acta Histochemical*, 119(6), 203-206.

[38] Metgud, R. & Neelesh, B. (2018). Effect of staining procedures on the results of micronucleus assay in the exfoliated buccal mucosal cells of smokers and nonsmokers: A pilot study. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 14(2), 372-376.

[39] Mikulewicz, M., Chojnacka, K., Woźniak, B. & Downarowicz, P. (2012). Release of Ion Metals from Orthodontic Appliances: An *In Vitro* Study. *Investigación de oligoelementos biológicos*, 146(2), 272–280. <https://doi.org/10.1007/s12011-011-9233-4>

[40] Natarajan, M., Padmanabhan, S., Chitharanjan, A. & Narasimhan, M. (2011). Evaluation of the genotoxic effects of fixed appliances on oral mucosal cells and the relationship to nickel and chromium concentrations: an *in-vivo* study. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 140(3), 383-388.

[41] Organización Internacional de Normalización. (2009). *Evaluación biológica de productos sanitarios. Parte 5: Ensayos de citotoxicidad in vitro* (ISO 10993-5: 2009). <https://www.iso.org/obp/ui#iso:std:iso:10993:-5:ed-3:v1:en>

[42] Organización Internacional de Normalización. (2014). *Evaluación biológica de productos sanitarios. Parte 3: Pruebas de genotoxicidad, carcinogenicidad y toxicidad para la reproducción* (ISO 10993-3: 2014). <https://www.iso.org/obp/ui#iso:std:iso:10993:-3:ed-3:v1:en>

[43] Organización Internacional de Normalización. (2018). *Evaluación biológica de dispositivos médicos. Parte 1: Evaluación y pruebas dentro de un proceso de gestión de riesgos* (ISO 10993-1: 2018). <https://www.iso.org/obp/ui#iso:std:iso:10993:-1:ed-5:v2:en>

[44] Ousehal, L. & Lazrak, L. (2012). Change in nickel levels in the saliva of patients with fixed orthodontic appliances. *International Orthodontic*, 10(2), 190-196. DOI: 10.1016/j.ortho.2012.03.003

[45] Pérez, L. & Reytor, E. (2013). Soportes de autoligado en ortodoncia. *Gaceta Médica Espirituana*, 15(1), 110-120.

[46] Press, S. (Ed. 8ª). (2018). *Magill's Medical Guide*. Salem Press.

[47] Quirós, O. (2004). Introducción a la ortodoncia. *Acta Odontológica Venezolana*, 42(3), 230-231.

- [48] Raap, U., Stiesch, M. & Kapp, A. (2012). Contact allergy to dental materials. *Journal of the German Society of Dermatology*, 10(6), 391-396.
- [49] Restrepo, D. & Ardila, C. (2010). Adverse reactions caused by biomaterials used in prosthodontics. *Avances en Odontoestomatología*, 26(1), 19-30. http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0213-12852010000100003&lng=es&tlng=es
- [50] Rodríguez, E. (2019). *Ortodoncia Contemporánea. Diagnóstico y tratamiento*. AMOLCA. <https://ebooks-amolca-com.pbidi.unam.mx:2443/reader/rodriguez?location=4>
- [51] Ruiz, A. (2017). *Evaluación genotóxica y citotóxica del extracto de Bacopa procumbens en sangre periférica de ratones CD1 machos por la técnica de micronúcleos in vivo* [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México]. <http://132.248.9.195/ptd2017/septiembre/0765521/Index.html>
- [52] Salvatierra, N., Oldani, C., Reyna, L. & Taborda, R. (2009). ¿Qué es la biocompatibilidad? *Revista Argentina de Bioingeniería*, 15(1), 28-32.
- [53] Shruthi, D., Patil, G. & Prithviraj, D. (2020). Comparative Evaluation of Ion Release in Bonded and Nonbonded Stainless Steel Brackets with Use of Different Mouthwashes: An *In vitro* Study. *Contemporary Clinical Dentistry*, 11(1), 15-19.
- [54] Shimizu, N. (2011). Molecular mechanisms of the origin of micronuclei from extrachromosomal elements. *Mutagenesis*, 26(1), 119-123.
- [55] Thomas, P., Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch Volders M., Bonassi, S., Zeiger, E Knasmueller, S. & Fenech, M. (2009) Buccal micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 4(6), 825-837.
- [56] Ulbrinox. (2020). ¿Qué son los aceros inoxidable? *Ulbrinox*. <https://www.ulbrinox.com.mx/blog/que-son-los-aceros-inoxidables-1>
- [57] Yuen, N. (2018). *Corrosión de los arcos de acero inoxidable con un uso clínico en boca de 1 a 6 meses* [Tesis de maestría no publicada]. Universidad de Panamá.
- [58] Zalacain, M., Sierrasesúmaga, L. & Patiño, A. (2005). El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 28(2), 227-236.
- [59] Zaragoza, T. & Velasco, J. (2018). *La saliva, auxiliar de diagnóstico*. Universidad Nacional Autónoma de México. <https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/Portal2015/publicaciones/libros/Saliva.pdf>

ANEXOS

Anexo I. Carta de consentimiento para la participación del proyecto de investigación

Carta de Consentimiento para la Participación del Proyecto de Investigación

Título del proyecto de investigación:

Identificación de anomalías nucleares de las células epiteliales bucales en pacientes con ortodoncia, mediante el uso de la tinción de Feulgen.

Domicilio: Av. Industria Militar 1113A, Lomas de Sotelo, Lomas de San Isidro, Miguel Hidalgo, 11200 Naucalpan de Juárez, Méx.

Sede donde se llevará a cabo el estudio: Unidad de Especialidades Odontológicas (SEDENA).

Nombre del paciente: _____

Edad: _____

Sexo: _____

1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La ortodoncia ha tenido como objetivo lograr la corrección de malposiciones dentarias y de trastornos maxilofaciales, encaminándolo al desarrollo e implemento de diversos tratamientos que permiten una mejora en la oclusión dentaria, resistencia a las caries e incluso mejoras ante enfermedades periodontales, uno de los tratamientos comúnmente utilizados en la ortodoncia, es el uso de aparatología ortodóncica fija, que son elaborados en su mayoría por metales. Según estudios, algunos metales pueden acumularse en la cavidad oral debido a las propiedades enzimáticas, microbiológicas y térmicas que son ideales para la biodegradación de metales. El interés en los datos sobre su biocompatibilidad al ocasionar eventos genotóxicos lo vuelve un tema de gran relevancia.

2. OBJETIVO DEL ESTUDIO

Analizar células epiteliales de la mucosa bucal de pacientes con aparatología ortodóncica fija por ensayo de MN, con la finalidad de realizar un biomonitoreo del daño al ADN y determinar si el material del que está elaborado el aparato de ortodoncia es capaz de inducir un efecto genotóxico.

3. BENEFICIOS DEL ESTUDIOS

No existe un beneficio directo para el paciente, sin embargo, se estaría contribuyendo al avance de la medicina y permitirá que en un futuro otros pacientes se beneficien de los resultados obtenidos.

4. PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO

Se realizará dos tomas de muestra, la primera antes de ser colocada la aparatología ortodóncica fija y a los 12 meses de tratamiento, y así realizarles una prueba de micronúcleos. La toma de muestra consta de un raspado suave en los carrillos internos de la cavidad bucal.

5. RIESGOS ASOCIADOS CON EL ESTUDIO

Es una muestra que no implica riesgos, sin embargo podría notar un sabor desagradable.

6. PROTECCIÓN DE DATOS PERSONALES

Toda la información personal y datos recabados en el estudio se manejaran de forma confidencial y serán utilizados únicamente en este estudio.

Los datos personales que se solicitarán son:

- Nombre completo del paciente
- Sexo
- Edad

El investigador principal del Proyecto de Tesis es el responsable del tratamiento de los datos personales que usted proporcione con motivo de su participación en el Proyecto de Investigación.

7. ACLARACIONES

Habiendo recibido previamente la información correspondiente a la toma de muestra y su uso asignado, al firmar la presente, usted autoriza voluntariamente su participación en el estudio; esto implica que se utilicen las muestras obtenidas de células epiteliales de la mucosa bucal para su uso exclusivo en el estudio, quedando restringida esta misma a la divulgación con otros fines no autorizados.

No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted en caso de no aceptar participar en el proyecto. Así mismo, puede retirarse en el momento que desee, pudiendo informar o no, las razones por las cuales ha tomado la decisión.

No recibirá un pago por su participación.

Y podrá solicitar información actualizada del proyecto, a los investigadores participantes.

Si considera que todas sus dudas y preguntas acerca del proyecto de investigación han sido aclaradas, puede, si así lo desea, firmar la Carta de Consentimiento

Yo, _____ he sido informado acerca del proyecto de investigación y he leído y comprendido la información anterior. Así mismo, mis dudas han sido aclaradas y entiendo que los datos obtenidos pueden ser difundidos con fines científicos. Doy mi consentimiento al participar en este proyecto de investigación y recibiré una copia de esta carta firmada y fechada.

FIRMA

FECHA

Esta sección deberá ser completada por el investigador.

He explicado al Sr(a) _____ el objetivo del estudio, además de los riesgos y beneficios que implica la participación del paciente. Le he preguntado al paciente si tiene alguna duda y he contestado a las preguntas correspondientes.

NOMBRE Y FIRMA DEL INVESTIGADOR

FECHA

8. CARTA DE REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

Título del proyecto de investigación:

Identificación de anormalidades nucleares de las células epiteliales bucales en pacientes con ortodoncia, mediante el uso de la tinción de Feulgen.

Sede donde se llevará a cabo el estudio: Unidad de Especialidades Odontológicas (SEDENA).

Nombre del paciente: _____

Complete la opción que corresponda:

Yo, _____ he decidido excluir al paciente del proyecto de investigación por las siguientes razones:

_____.

Por medio de la presente, informo mi decisión de retirarme del proyecto de investigación por las siguientes razones:

_____.

Si así lo desea, puede pedir que se le sea otorgada la información que haya sido recabada referente a su participación.

FIRMA

FECHA