

**“Genotóxicidad de Resina Dental a Base de  
Monómeros Bis-GMA y UDMA en Cavidad bucal  
Humana.”**

*SAMIR ALEJANDRO GALVIS GARCIA*

*JAIRO JOSE FLOREZ PAJARO*



**UNIVERSIDAD DE CARTAGENA  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
CARTAGENA DE INDIAS D.T Y C.**

**2017**



**UNIVERSIDAD DE CARTAGENA**  
**FACULTAD DE ODONTOLOGIA**

Tesis de Grado para optar al título de:  
ODONTOLOGO.

**“Genotóxicidad de resina dental a base de monómeros  
Bis-GMA y UDMA en cavidad bucal humana.”**

Investigador principal:  
Javier Enrique Méndez Silva

Co-investigadores:  
Samir Alejandro Galvis García  
Jairo José Flórez Pájaro

Grupo de investigación  
Grupo de Investigación en Materiales Dentales de la Facultad de Odontología  
de la Universidad de Cartagena MADEFOUC

Universidad de Cartagena  
Facultad de odontología

2017

# CONTENIDO

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>7</b>
<b>CAPÍTULO 1. FUNDAMENTACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN</b>	<b>10</b>
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
1.2 JUSTIFICACIÓN	12
1.3 OBJETIVOS	17
1.3.1 GENERAL	17
1.3.2 ESPECÍFICOS	17
<b>CAPÍTULO 2. MARCO CONCEPTUAL</b>	<b>18</b>
2.1 GENERALIDADES DE LA GENOTOXICIDAD; CANCER Y BIOMARCADORES	18
2.2 ENSAYO DE MICRONÚCLEOS (MN)	21
2.3 GENERALIDADES DE LAS RESINAS DENTALES	26
2.4 RESINAS COMPUESTAS	28
2.5 MONÓMEROS RESIDUALES	29
2.6 CITOTOXICIDAD DE LAS RESINAS DENTALES	31
<b>CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA</b>	<b>32</b>
3.1. TIPO DE ESTUDIO	32

3.2	DISEÑO DEL EXPERIMENTO	33
3.3.	MUESTRA	34
3.4	RECOLECCION DE LA MUESTRA	35
3.5	PREPARACION DE LOS PORTA OBJETOS	36
3.6	ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS	37
<b>CAPÍTULO 4. RESULTADOS PRELIMINARES</b>		<b>38</b>
<b>CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN Y CONCLUSION</b>		<b>40</b>
5.1	DISCUSIÓN	40
5.2	CONCLUSIÓN	46
5.3	RECOMENDACIONES	46
<b>Bibliografía</b>		<b>48</b>
ANEXO1- TABLA DE PORCENTAJE DE ABERRACIONES Y CONTEO		54
ANEXO2- CONTEO Y GRAFICAS		55
ANEXO3- CONSIDERACIONES ÉTICAS		56
ANEXO-4 FOTOS DE INTERVENSION Y LABORATORIO		58

## RESUMEN

**Problema:** Históricamente en odontología el daño biológico causado por materiales de uso intraoral es puesto en conocimiento cuando este es evidente (ejemplos carboxilatos, silicatos o la amalgama). En el caso de esta última, su relación con el daño celular impulsó al recambio de ellas por resinas sin estudios previos de inocuidad en el medio oral. **Objetivo:** Evaluar la genotoxicidad de una resina dental a base de los monómeros BIS-GMA y UDMA en la cavidad oral de seres humanos. Metodología: resinas colocadas en seres humanos que se dividirán en tres grupos: grupo 1 control (0 resina), grupo 2 (pacientes con resina) y analizados en diferentes tiempos de exposición de las resinas: 0 y 15 días medidos por la prueba de genotoxicidad el ensayo de micro-núcleos usando células exfoliadas de mucosa oral. **Resultados Preliminares:** Las anomalías después de la exposición encontradas fueron micro-núcleos, Células bi-nucleadas, células con yemas nucleares (broken eggs), cariorrexis y cariólisis. El promedio de porcentajes tabulados en Excel de (MN, BN, CYN, CR, CL) en el primer grupo fue de (0-11-2,25-0,75-1,5), mientras que en el segundo grupo fue (0,25-20,25-9,75-11,25-15) respectivamente, al comparar los

resultados obtenidos en ambos grupos evaluados, fueron encontradas diferencias considerables en BN, CR y CL, mientras que en los MN no.

**PALABRAS CLAVE:** Citogenotoxicidad, Prueba de Micronucleos, cavidad oral humana.

## **ABSTRACT**

**Background:** Historically in dentistry the biological damage caused by materials of intraoral use is brought to the notice when this is evident (examples carboxylates, silicates or amalgam). In the case of the latter, its relation with the cellular damage prompted the replacement of them by resins without previous studies of innocuity in the oral medium.

**Objective:** To evaluate the genotoxicity of a dental resin based on the BIS-GMA and UDMA monomers in the oral cavity of humans.

**Materials and Methods:** resins placed in human beings that will be divided into three groups: group 1 control (0 resin), group 2 (patients with resin) and analyzed in different exposure times of resins: 0 and 15 days

**Measured by the genotoxicity test the micronucleus test using exfoliated cells of oral mucosa.**

**Preliminary results:** The post-exposure anomies found were micro-nuclei, bi-nucleated, broken egg cells,

karyorrhexis and karyolysis. The mean of tabulated percentages in Excel of (MN, BN, CYN, CR Y CL) in the first group was (0-11-2.25-0.75-1.5) while in the second group it was (0.25-20.25-9.75-11.25-15) respectively, when comparing the results obtained in the both groups evaluated, considerable differences were found in BN, CR and CL while in MN no.

**KEY WORDS:** Cytotoxotoxicity, Micronucleus test, human oral cavity.

## INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia de la odontología se han presenciado la creación de múltiples materiales con el fin de suplir las necesidades en odontología; el advenimiento y la evolución de nuevos materiales dentales ha demostrado una falencia muy importante que radica principalmente en la escasa evidencia de estudios que demuestren la biocompatibilidad de materiales que utilizamos a diario y el pobre control por parte de las entidades que se encargan de aprobar la comercialización de estos, un ejemplo claro fue la llegada de la amalgama del cual sabemos que cuando salió al mercado fue un material de elección y utilizado ampliamente a nivel mundial, estudios posteriores demostraron los efectos citotóxicos que esta causaba y se vieron obligados a la creación de un material que la sustituyera, sin embargo se siguieron presentado las mismas falencias y la poca evidencia científica antes de sacar el producto al mercado, lo cual conlleva a cuestionar e indagar sobre el material que se dispone.

El reto más grande que ha afrontado la odontología desde sus inicios es la búsqueda de la estética, esto aparece reflejado en museos como

el American Museum of Natural History de Nueva York donde están vestigios de fósiles con trabajos orales remplazando dientes perdidos con conchas de nácar y atados a dientes vecinos con hilos de oro o en estudios antropológicos que demostraban la importancia de los dientes para el hombre antiguo, impidiéndole ser sacerdote de la tribu a una persona si tenía ausencia dental. De igual manera en la edad moderna el remplazo de la amalgama, de amplia aplicación en el siglo XIX y XX se convierte en un reto para los investigadores pues su color metálico lo convertía en muy antiestético en caso de obturaciones del sector anterior donde no se podía disimular <sup>1</sup>.

El uso de los silicatos es el primer intento de obturación estética que aparece en el mercado con una gran expectativa, pues además de la ventaja de mimetizarse por su color con el tejido del diente traía consigo otra, cuál era la de ser anti-cariogénico por su propiedad de liberar flúor en forma gradual, infortunadamente su vida comercial fue <sup>1</sup>relativa mente corta debido a su alta acidez, la cual trajo como consecuencia un daño a la pulpa dental <sup>2</sup>.

---

<sup>1</sup>BATES, MN. et al. Mercury amalgam dental fillings: an epidemiologic assessment. En: International journal of hygiene and environmental health. 2006 Jul;209(4):309-16.

<sup>2</sup>FERRACANE, JL. Et al. Resin composite--state of the art. EN: Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials. 2011 Jan;27(1):29-38.

<sup>3</sup>SCHWEIKL H, SPAGNUOLO G, SCHMALZ G. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. Journal of dental research. 2006 Oct;85(10):870-7.

La búsqueda de la estética toma su máximo pico al darse a conocer el daño celular causado por la amalgama, debido a liberación de iones mercurio en el medio oral lo que puede llevar a las células de los tejidos adyacentes a una posible apoptosis anticipada, así como daño a los diferentes sistemas por la acumulación de los vapores de mercurio, lo que indujo a la comunidad científica a experimentar con otras alternativas, entre ellas las resinas dentales como material sustituto de la amalgama por dos grandes razones, la primera por la necesidad de poder tener el mismo color del diente (estética) y la segunda por su aparente afinidad con los tejidos dentales (biocompatibilidad). Se desató una competencia entre casas comerciales en cuanto al mejor producto desde el punto de vista estético, pasando por al menos siete generaciones de resinas, cada una mejorando las propiedades físicas de su antecesora pero dejando de lado la segunda razón, la biocompatibilidad pues se daba por seguro que este material no causaba daño a nivel celular <sup>3</sup>.

Los primeros estudios referentes<sup>2</sup> a la biocompatibilidad solo median el posible daño a nivel celular (citogenéticos), sin poder cuantificar el que

---

<sup>4</sup>SCHWEIKL H, HILLER KA, BOLAY C, KREISSL M, KREISMANN W, NUSSER A, et al. Cytotoxic and mutagenic effects of dental composite materials. *Biomaterials*. 2005 May;26(14):1713-9.

se podía estar dando a nivel del ADN (genotoxicidad). Las nuevas técnicas han permitido cubrir ese nuevo campo, permitiendo así hallar que indican que los monómeros de las resinas no polimerizados, quedan dentro de la matriz polimerizada de la resina compuesta y se liberan lentamente al medio oral el cual en contacto con los tejidos blandos penetran en el torrente sanguíneo produciendo cambios en el ADN de las células <sup>4</sup>.

## **CAPÍTULO 1. FUNDAMENTACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN**

### **1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En el transcurrir de los años el reto más complejo de la odontología es la concepción de lo estético, la evolución y mejora de sistemas restauradores adhesivos posibilitan al odontólogo obtener óptimos resultados estéticos y funcionales, con un menor costo y tiempo de procedimiento. La amalgama con componente a base de mercurio se convierte en el material de predilección cuando se trata de obturaciones en dientes cariado. De igual manera en la edad moderna fue remplazada por otros materiales mucho más estéticos, debido a que su color lo convierte en un material antiestético añadiendo a su

condición antiestéticas tenemos los estudios dan al hombre el conocimiento del daño celular que causan los componentes de amalgama; dos aspectos son los de gran importancia en el desarrollo de nuevos biomateriales: uno es el aspecto estético, es decir, que sean lo más parecido posible a las estructuras dentarias, y el segundo, la posibilidad de obtener unión química primaria a los tejidos dentarios, de manera que al unirse íntimamente al diente, se elimine la interfase diente-restauración, y se evite la recurrencia de caries a ese nivel; los silicatos los primeros en aparecer cumplían estas reglas pero debido a su baja concentración de pH lo que conllevaba a daño pulpar, su vida comercial fue corta. Entre los biomateriales restauradores estéticos que logran resultados ópticos satisfactorios encontramos a las Resinas Compuestas o Composites, las cuales desde su advenimiento han experimentado un significativo desarrollo. Estudios referentes a la biocompatibilidad solo median el posible daño a nivel celular (citogenéticos), sin poder cuantificar el que se podía estar dando a nivel del ADN (genotoxicidad). Con las nuevas tecnologías se ha podido determinar solo que si existe daño cito-génico por parte de las resinas debido a esto se ha convertido en un reto para los investigadores lograr encontrar un material ideal que cumpla la

expectativa y que sea totalmente biocompatible sin generar alteración alguna. Teniendo en cuenta lo anterior se plantea el siguiente interrogante: ¿Existe una relación directa entre la aparición de micro núcleos, que sugieran genotoxicidad, en la cavidad bucal de seres humanos que son sometido a restauraciones en resina dental a base de los monómeros BIS- GMA y UDMA?

## **1.2 JUSTIFICACIÓN**

El ser humano está expuesto diariamente a xenobióticos que pueden ser potencialmente genotóxicos. Los materiales de uso en boca pueden favorecer procesos de inestabilidad en el material genético de la célula elevando el riesgo de aparición de daños<sup>39</sup> y modificaciones en los tejidos cercanos o que se encuentran en contacto con ellas, así como a otros tejidos blanco distantes al lugar donde se está generando el estímulo carcinogénico; por lo tanto, es de enorme importancia determinar la relación riesgo-beneficio de las actuales resinas compuestas, ya que hasta el momento los beneficios son palpables en la práctica clínica y en la satisfacción de los pacientes, sin embargo el riesgo biológico no es claro, ya que son muy pocos los

estudios que tratan de cuantificar el daño genético que pueden causar estos materiales.

La ausencia de estudios científicos que alimenten a las entidades que rigen la calidad y biocompatibilidad de los materiales odontológicos son una falencia importante de estas para llevar a cabo su acción natural, la cual es controlar estrictamente la acción inocua de los materiales que usamos en boca.

Es así que se pretende enriquecer el conocimiento científico para que las organizaciones encargadas de regular la bio-compatibilidad, calidad y validez de los materiales dentales puedan mejorar los estándares para la producción de estos, ya que el rápido desarrollo tecnológico y la gran maquinaria productiva con la que cuentan las empresas en la actualidad obligan a frecuentes evaluaciones y monitoreo de todos los cambios sustanciales que se gestan en el mercado. La preocupación por la creciente prevalencia de patologías en cavidad oral, por ejemplo cáncer, genera dudas sobre la inocuidad de varios materiales dentales de amplio uso en la población. En la mayoría de los casos la etiología de estas patologías es desconocida, por lo tanto, es necesario indagar sobre ciertos compuestos que

reportan generación de daño a cromosomas en células del epitelio bucal en contacto con materiales restaurativos como las resinas<sup>4</sup>. Con el desarrollo de la adhesión a los tejidos dentales, las resinas compuestas revolucionaron la odontología desde hace aproximadamente 50 años no sólo por su capacidad de lograr una íntima unión con la estructura dental, si no por poseer la propiedad de imitar el color y proporcionarles a los pacientes el máximo de estética deseada en su sonrisa. Su advenimiento coincidió con la gran preocupación de los dentistas a nivel mundial sobre la seguridad biológica en el uso de la amalgama de plata, fundamentada en los estudios que advertían intoxicación por vapores de mercurio liberados por este material<sup>5</sup>, por lo tanto, uno de los motivos principales para el cambio de este tipo de obturador dental por resinas compuestas de foto-curado era la seguridad biológica, sin apartar los requerimientos

---

<sup>4</sup>SCHWEIKL H, HILLER KA, BOLAY C, KREISSL M, KREISMANN W, NUSSER A, et al. Cytotoxic and mutagenic effects of dental composite materials. *Biomaterials*. 2005 May;26(14):1713-9.

<sup>4</sup>SCHWEIKL H, HILLER KA, BOLAY C, KREISSL M, KREISMANN W, NUSSER A, et al. Cytotoxic and mutagenic effects of dental composite materials. *Biomaterials*. 2005 May;26(14):1713-9.

<sup>5</sup>RICHARDSON GM, WILSON R, ALLARD D, PURTILL C, DOUMA S, GRAVIERE J. Mercury exposure and risks from dental amalgam in the US population, post-2000. *The Science of the total environment*. 2011 Sep 15;409(20):4257-68.

<sup>6</sup>MUTTER J, NAUMANN J, SADAGHIANI C, WALACH H, DRASCH G. Amalgam studies: disregarding basic principles of mercury toxicity. *International journal of hygiene and environmental health*. 2004 Sep;207(4):391-7.

<sup>7</sup>POLYDOROU O, KONIG A, HELLWIG E, KUMMERER K. Long-term release of monomers from modern dental-composite materials. *European journal of oral sciences*. 2009 Feb;117(1):68-75.

estéticos que cada vez tenían mayor auge conforme se desarrollaban mejores propiedades ópticas para estos materiales resinosos<sup>6</sup>.

Aunque acertaron en la estética del material, el cual mejora cada momento más, parece no ser tan exitosa su bio-compatibilidad pues algunos estudios documentan su acción toxica, causada por liberación de monómeros residuales al medio oral, los cuales surgen de la polimerización incompleta del material<sup>7</sup> causando una serie de alteraciones metabólicas a nivel celular y genético comparables con las que pueden presentar la amalgama de plata <sup>8 9</sup>. Inicialmente estudios in vitro evaluaron la capacidad citotóxica y genotóxica de los monómeros dentales, aunque sus mecanismos no estaban totalmente dilucidados, varios hallazgos identificaron al dimetacrilato de trietilenglicol co-monómero (TEGDMA) y el 2 hidroxietil metacrilato (HEMA), entre otros, como causantes de alteraciones en el ciclo celular, mediante dos vías: la primera, cuando actúan directamente

---

sobre el ADN, penetrando hasta el, por su capacidad lipo-fílica para atravesar membranas y la segunda, por la inhibición de los niveles de glutatión (GSH) el cual funciona como antioxidante natural protegiendo la célula de los daños causado por especies reactivas de oxígeno (ROS), los cuales pueden activar diferentes vías de apoptosis celular<sup>10 11</sup>. Además el daño al ADN puede manifestarse en una mutación a largo plazo y en determinadas concentraciones estar relacionadas directamente con alto potencial carcinogénico dado por la interacción que interrumpe el balance del glutatión, lo que permite mayor formación de ROS por la alta disponibilidad de la misma<sup>12</sup>. Diversos estudios en animales corroboran la actividad mutagénica de estos compuestos mediante el test de recombinación y mutación somática (S.M.A.R.T, por sus siglas en inglés) en *Drosophila melanogaster* y *Sus scrofa domestica* var landrac, la cual posee una genética homóloga a los mamíferos y esta última que contiene material

---

<sup>8</sup>DI PIETRO A, VISALLI G, LA MAESTRA S, MICALE R, BALUCE B, MATARESE G, et al. Biomonitoring of DNA damage in peripheral blood lymphocytes of subjects with dental restorative fillings. Mutation research. 2008 Feb 29;650(2):115-22.

<sup>11</sup>. POPLAWSKI T, PAWLOWSKA E, WISNIEWSKA-JAROSINSKA M, KSIAZEK D, WOZNIAK K, SZCZEPANSKA J, et al. Cytotoxicity and genotoxicity of glycidyl methacrylate. Chemico-biological interactions. 2009 Jun 15;180(1):69-78.

<sup>10</sup> SCHWEIKL H, HARTMANN A, HILLER KA, SPAGNUOLO G, BOLAY C, BROCKHOFF G, et al. Inhibition of TEGDMA and HEMA-induced genotoxicity and cell cycle arrest by N-acetylcysteine. Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials. 2007 Jun;23(6):688-95

genético homológamente hablando al de seres humanos. Así otros autores notificaron conclusiones similares en cuanto a la medición en mamíferos del daño causado por los monómeros de uso odontológico<sup>13 14</sup>.

## **1.3 OBJETIVOS**

### **1.3.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar y medir el grado de genotoxicidad de una resina dental a base de los monómeros BIS-GMA y UDMA en la cavidad oral de seres humanos mediante la prueba Micro-Núcleos.

### **1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Establecer la frecuencia de Micronúcleos (MN) y otras aberraciones cromosómicas causadas por una resina compuesta a base de monómeros BIS GMA y UDMA en células exfoliadas de los carrillos adyacentes a la restauración.

---

<sup>13</sup> AROSSI GA, DIHL RR, LEHMANN M, CUNHA KS, REGULY ML, DE ANDRADE HH. In vivo genotoxicity of dental bonding agents. *Mutagenesis*. 2009 Mar;24(2):169-72.

<sup>12</sup> SCARPARO RK, GRECCA FS, FACHIN EV. Analysis of tissue reactions to methacrylate resin-based, epoxy resin-based, and zinc oxide-eugenol endodontic sealers. *Journal of endodontics*. 2009 Feb;35(2):229-32.

- Comparar la diferencia de presentación de aberraciones cromosómicas antes y después de haber realizado la restauración.
- Evaluar la presentación de aberraciones en distintos periodos de tiempo.

## **Capítulo 2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 GENERALIDADES DE LA GENOTOXICIDAD; CANCER Y BIOMARCADORES**

La genotoxicidad es la capacidad relativa de un agente de ocasionar daño en el material genético, originando efectos biológicos adversos. El daño inducido en el "material genético" incluye no sólo al ADN<sup>15</sup>, sino también a todos aquellos componentes celulares que se encuentran relacionados con la funcionalidad y comportamiento de los cromosomas dentro de la célula. Ejemplos de esto último son las proteínas que intervienen en la reparación, condensación y descondensación del ADN en los cromosomas u otras estructuras como el

---

<sup>15</sup> GRANDI C, D'OVIDIO MC, TOMAO P. [Use of the comet test in occupational medicine and industrial toxicology: considerations and prospects]. *Giornale italiano di medicina del lavoro ed ergonomia*. 2006 Jan-Mar;28(1):5-13.

huso mitótico, responsable de la distribución de los cromosomas durante la división celular<sup>16</sup>.

Para evaluar el daño causado por los potenciales agentes genotóxicos se hace imprescindible el reconocimiento, caracterización y seguimiento de ese efecto y en distintos niveles de análisis, tarea que le compete a una rama de la ciencia interdisciplinaria, la Genética Toxicológica, que se encarga del monitoreo ambiental y humano en general, por distintos tipos de exposición. Por lo tanto, la Genética Toxicológica, una rama de la ciencia interdisciplinaria, se encarga de evaluar el daño causado por los potenciales agentes genotóxicos a partir del monitoreo ambiental y humano en general por distintos tipos de exposición<sup>17</sup>.

Existen varias formas de evaluar tanto citotoxicidad como genotoxicidad de los materiales dentales, las cuales pueden diferir en metodología, sensibilidad, efectividad y costos, tales como el análisis de intercambio de cromátides hermanas, ensayo de aberración

---

<sup>16</sup> HEDDLE JA. Implications for genetic toxicology of the chromosomal breakage syndromes. Mutation research. 1991 Apr;247(2):221-9.

<sup>17</sup> LEON G, PEREZ LE, LINARES JC, HARTMANN A, QUINTANA M. Genotoxic effects in wild rodents (*Rattus rattus* and *Mus musculus*) in an open coal mining area. Mutation research. 2007 Jun 15;630(1-2):42-9.

cromosómica y ensayo de micro-núcleos, así como la prueba en gel de electroforesis de células individuales o ensayo cometa<sup>18</sup>. En el presente estudio se utilizan dos de estas pruebas: El ensayo de micro-núcleos y el gel de electroforesis de células individuales, como se describe más adelante.

El cáncer es una de las enfermedades crónico-degenerativas prevalentes a nivel mundial. La incidencia en el año 2008 fue de 12.7 millones, con una mortalidad de 7.6 millones; de estas cifras, 56% de los casos nuevos de cáncer y 63% de las muertes por esta enfermedad ocurrieron en las regiones menos desarrolladas del mundo<sup>19</sup> y el 30% pudieron prevenirse<sup>20</sup>. Acorde a la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es la primera causa de mortalidad a nivel mundial, y se reporta que el cáncer de mama ocupa el primer lugar en mujeres, mientras que en hombres es el cáncer de pulmón. Se espera que las muertes por neoplasias malignas alcancen 12 millones de casos para 2030<sup>15</sup>.

---

<sup>18</sup> CHATTERJEE S, DHAR S, SENGUPTA B, GHOSH A, DE M, ROY S, et al. Cytogenetic monitoring in human oral cancers and other oral pathology: the micronucleus test in exfoliated buccal cells. Toxicology mechanisms and methods. 2009 Sep;19(6-7):427-33.

<sup>19</sup> FERLAY J, SHIN HR, BRAY F, FORMAN D, MATHERS C, PARKIN DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. International journal of cancer Journal international du cancer. 2010 Dec 15;127(12):2893-917.

<sup>20</sup> ADES F, SENTERRE C, DE AZAMBUJA E, SULLIVAN R, POPESCU R, PARENT F, et al. Discrepancies in cancer incidence and mortality and its relationship to health expenditure in the 27 European Union member states. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO. 2013 Nov;24(11):2897-902.

Se postula que el desarrollo del cáncer es el resultado de la acumulación de errores genéticos en un mismo tejido<sup>21 22</sup>, donde también se encuentran implicadas la activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumores<sup>23</sup>. Estudios estadísticos de aspectos moleculares sugieren que hacen falta entre 6 y 10 alteraciones genéticas, para que se produzca una transformación maligna de la mucosa oral. Existen diferentes tipos de marcadores celulares y tisulares que, desde una perspectiva molecular, pueden proporcionar información adicional a la recopilada en el examen clínico y en el estudio histopatológico.

La determinación de la frecuencia de MN en células exfoliadas de mucosa bucal puede ser de gran utilidad en la prevención y detección oportuna de riesgo de algunos tipos de cáncer<sup>24</sup>. Este biomarcador puede tener gran impacto como un pre-tamizaje en poblaciones con factores de riesgo para desarrollar cáncer. Esto contribuiría a los

---

<sup>21</sup> KIM J, SHIN DM, EL-NAGGAR A, LEE JS, CORRALES C, LIPPMAN SM, et al. Chromosome polysomy and histological characteristics in oral premalignant lesions. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention* : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology. 2001 Apr;10(4):319-25.

<sup>22</sup> JOSEPH BK. Oral cancer: prevention and detection. *Medical principles and practice: international journal of the Kuwait University, Health Science Centre*. 2002;11 Suppl 1:32-

<sup>23</sup> SUDBO J, BRYNE M, JOHANNESSEN AC, KILDAL W, DANIELSEN HE, REITH A. Comparison of histological grading and large-scale genomic status (DNA ploidy) as prognostic tools in oral dysplasia. *The Journal of pathology*. 2001 Jul;194(3):303-10.

<sup>24</sup> CHEN C, ARJOMANDI M, QIN H, BALMES J, TAGER I, HOLLAND N. Cytogenetic damage in buccal epithelia and peripheral lymphocytes of young healthy individuals exposed to ozone. *Mutagenesis*. 2006 Mar;21(2):131-7.

programas sociales dirigidos a disminuir la incidencia y mortalidad por cáncer, lo cual impactaría en una reducción del gasto económico en instituciones de salud y en mejorar la calidad y expectativas de vida de las personas con riesgo de desarrollar esta enfermedad.

### **2.3 ENSAYO DE MICRONÚCLEOS**

Los micro-núcleos son cuerpos citoplasmáticos de naturaleza nuclear, se corresponden con material genético no incorporado correctamente a las células hijas durante la división celular, reflejan aberraciones cromosómicas y se originan por roturas cromosómicas, por errores durante la replicación y posterior división celular del ADN y/o por la exposición a agentes genotóxicos. Existen factores capaces de influir o modificar el número de micro-núcleos presentes en una célula (edad, género, vitaminas, tratamientos médicos, exposición diaria a agentes genotóxicos, entre otros.)<sup>12</sup>.

La mucosa bucal provee una barrera contra los potenciales carcinógenos que son metabolizados productos reactivos. Cerca del 90% de los cánceres son de origen epitelial, la mucosa bucal puede ser usada para monitorear eventos genotóxicos tempranos como

resultado de carcinógenos potenciales que entran al cuerpo por ingestión o inhalación. Células bucales exfoliadas son usadas exitosamente mostrando efectos genotóxicos del tabaco, tratamientos médicos como radioterapia, exposición ocupacional a potenciales mutagénicos y/o químicos carcinogénicos y para estudios de quimio-prevencción del cáncer<sup>25</sup>.

El origen de un micro-núcleo se basa en el hecho de que cualquier fragmento cromosómico que alcance anafase sin tener un centrómero, no quedara integrado en el núcleo en formación, razón por la cual se condensara como una estructura aparte de este.

Chatterjee *et al* 2009 firman que el test de micro-núcleos es un indicador de exposición genotóxica y lo asocian a aberraciones cromosómicas, ya que un incremento en la tasa de mutación en las células escamosas orales está determinado por un incremento en la frecuencia de micro-núcleos relacionado con el desarrollo del carcinoma oral<sup>26</sup>. El ensayo de micro-núcleos se ha usado para las poblaciones de bajo riesgo de detección de agentes mutagénicos que

---

<sup>25</sup> STANG A, WITTE I. Performance of the comet assay in a high-throughput version. *Mutation research*. 2009 Apr 30;675(1-2):5-10.

<sup>26</sup> CHATTERJEE S, DHAR S, SENGUPTA B, GHOSH A, DE M, ROY S, et al. Cytogenetic monitoring in human oral cancers and other oral pathology: the micronucleus test in exfoliated buccal cells. *Toxicology mechanisms and methods*. 2009 Sep;19(6-7):427-

causan neoplasias orales, especialmente para la identificación de los pasos de pre-clínicos del proceso carcinogénico.

El valor del test de micro-núcleos como biomarcador radica en su sensibilidad pues su capacidad para detectar daño genético en los primeros estadios del ciclo celular, como la anafase, le confiere un carácter más confiable que el ensayo cometa, los cuales solo nos muestran el daño como tal sin tener en cuenta la capacidad de reproducción del daño de forma hereditaria<sup>(19 y 25)</sup>

El monitoreo del daño genético en las poblaciones expuestas utilizando biomarcadores se vislumbra como una herramienta útil en la prevención de los tumores. Los micronúcleos constituyen uno de los biomarcadores de efecto utilizados para monitorear el daño genético de poblaciones expuestas, ya sea de células epiteliales o de linfocitos. Son núcleos pequeños que se ubican al lado del núcleo celular que indican algún tipo de aberración cromosómica que pudo producirse como efecto de la exposición a agentes ambientales<sup>27</sup>. Las mayores limitaciones que tienen como marcadores de efecto son que no

---

<sup>27</sup> TOLBERT PE, SHY CM, ALLEN JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuff users. American journal of epidemiology. 1991 Oct 15;134(8):840-50.

caracterizan la naturaleza del daño nuclear inducido y que existe una considerable variación intra e interindividual<sup>28</sup>.

Mediante el proyecto internacional de micro-núcleos en humanos (HUMN<sub>XL</sub>) se logró realizar un estudio colaborativo en el cual intervinieron varios laboratorios especializados en prueba de micro-núcleos, para calibrar y estandarizar el protocolo del ensayo, teniendo en cuenta las múltiples variables ambientales que pueden influir en sus resultados. Con esto se logró estandarizar el protocolo con las técnicas más confiables, lo que le confiere el carácter de biomarcador<sup>29</sup>. Además, es importante definir los criterios de selección con el propósito de unificar los conceptos al momento de realizar la lectura al microscopio. Estos criterios están destinados para clasificar las células bucales en categorías que distinguen entre las células "normales" y las células que se consideran "anormal" sobre la base de características citológicas y nucleares, que son indicativos de daño en el ADN, insuficiencia o la muerte celular<sup>30</sup>.

---

<sup>28</sup> BONASSI S, AU WW. Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction. Mutation research. 2002 Mar;511(1):73-86.

<sup>29</sup> BONASSI S, COSKUN E, CEPPI M, LANDO C, BOLOGNESI C, BURGAZ S, et al. The HUMAN MicroNucleus project on exfoliated buccal cells (HUMN(XL)): the role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. Mutation research. 2011 Nov-Dec;728(3):88-97.

<sup>30</sup> TOLBERT PE, SHY CM, ALLEN JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. Mutation research. 1992 Feb;271(1):69-77.

## CRITERIOS DE SELECCIÓN:

Son definidos con el fin de evitar confundir cuerpos no nucleares., bacterias y gránulos querato-hialinos con micronúcleos

- Diámetro entre  $1/16$  y  $1/3$  del diámetro del núcleo principal.
- No refractarios.
- Intensidad de tinción similar o superior.
- Forma similar
- No conectados ni apareados a los núcleos.
- Igual grado de tinción, tamaño y forma.
- Pueden estar unidos por puentes de cromatina.
- Pueden tocarse pero no solaparse.

## 2.4 GENERALIDADES DE LAS RESINAS DENTALES

El desarrollo de las resinas dentales está ligado con la necesidad más que imperiosa de buscar estética a partir de un material polimérico llamado acrílico de uso generalizado en la elaboración de prótesis totales el cual al poseer elevado módulo de elasticidad y alta exotérmica en su reacción química, producía al ser usado como material de obturación, gran percolación marginal así como trauma al paquete vascular y nervioso por elevado calor, lo que llevo a los investigadores a unirlos con materiales inorgánicos como tierras de diatomeas, cuarzo y/o vidrio finamente pulverizados con el fin de bajarles las propiedades anteriormente descritas y que eran a todas luces contraproducentes para la biocompatibilidad del material<sup>31</sup>.

El desarrollo de una molécula de xilano como agente de unión entre el material orgánico (mezcla de resinas acrílicas y epoxicas) y el inorgánico constituidos por vidrios molidos, tierras de diatomea, cuarzo, etc. permitió que este último no se saliera de la matriz orgánica (dejando poros que se rellenaban fácilmente con saliva,

---

<sup>31</sup> TICE RR, AGURELL E, ANDERSON D, BURLINSON B, HARTMANN A, KOBAYASHI H, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Environmental and molecular mutagenesis. 2000;35(3):206-21.

haciendo perder rápidamente el color y tomando olor desagradable) dando paso a la primera resina compuesta como material obturador.

Bowen *et al.*<sup>2</sup> utiliza la molécula BIS GMA (bisfenol glicidil metacrilato) como monómero aprovechando su característica bipolar (hidrofílico por un polo e hidrofóbico por el otro) para causar adhesión en sustratos como la dentina que en su interior tienen agua y de esta manera salen al mercado los sistemas de adhesión.

El inicio de la odontología adhesiva genera en la profesión toda una serie de cambios de gran importancia, promoviendo recambio de amalgamas en boca por 3 razones sustanciales: Conservación del tejido dental pues al tener afinidad a este tejido se evitaba hacer una cavidad más grande con fines de retención mecánica para el antiguo material. Estética por su alta capacidad de mimetización con el color del diente y la supuesta biocompatibilidad del nuevo material.

## **2.5 RESINAS COMPUESTAS**

Las resinas compuestas son usadas para una variedad de aplicaciones en odontología, básicamente están compuestas de una

matriz polimérica, que típicamente es un metacrilato, un relleno de refuerzo hecho de vidrio radio opaco, un agente de unión Silano que une la matriz con el relleno y promotores o moduladores de polimerización. El monómero predominante usado en las resinas compuestas comerciales es el bis-GMA el cual posee una alta viscosidad, por lo tanto es mezclado con otros monómeros como TEGDMA y UDMA<sup>2</sup>.

Los monómeros pueden ser considerados el constituyente clave en la resina dental, su grado de conversión es un determinante importante de las fuerzas físico-mecánicas del polímero resultante. La conversión generalmente no es completa y se acepta que sea baja en las resinas compuestas y en los adhesivos. Aparte de menores fuerzas mecánicas, un bajo grado de conversión resulta en una alta permeabilidad, mayor absorción de agua, mayor microfiltración, mayor liberación de monómeros residuales y por lo tanto menor biocompatibilidad. La polimerización es inhibida por varios factores, tales como la presencia de oxígeno (resultando en la capa inhibida), la presencia de agua proveniente de la dentina, entre otros<sup>32</sup>.

---

<sup>32</sup> KLAUDE M, ERIKSSON S, NYGREN J, AHNSTROM G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. Mutation research. 1996 Jun 12;363(2):89-96.

## 2.6 MONÓMEROS RESIDUALES

El Bis-GMA, también llamado la molécula de 'Bowen' gracias a quien la diseñó, dio cabida a una nueva era de la odontología llamada la era de la adhesión pues esta molécula tiene la particularidad de ser bifuncional, teniendo un polo hidrofóbico con enlaces abiertos para la unión con el material de obturación (resina compuesta) y un polo hidrofílico que le permite interactuar con las estructuras dentales como la dentina en donde se fija a los micro túbulos dentinarios formando adhesión a ellos más allá de que estos contengan agua en su interior. Se utiliza universalmente, no sólo en los adhesivos, sino también en materiales compuestos. Sin curar, el Bis-GMA es muy viscoso. Debido a su alto peso molecular, Bis-GMA proporciona menor contracción de polimerización y endurecimiento rápido y bastante rígido lo cual no es tan bueno desde el punto de vista de la tasa de conversión, favoreciendo la formación de monómero sin polimerizar (monómero residual).

Para contrarrestar este efecto se pueden mezclar con diferentes dimetacrilatos tales como UDMA, EDMA o TEGDMA los cuales pueden ser utilizados como diluyentes, o en caso de presentaciones

tipo fluida en el cual la proporción de estos aumenta y disminuye la de BIS GMA. TEGDMA se utiliza generalmente en conjunción con Bis-GMA o UDMA. La mayor flexibilidad de TEGDMA compensa la rigidez de Bis-GMA y la mezcla dará como resultado resinas con más alta tasa de conversión. Además, esto también se demostró que resulta en una mayor resistencia a la tracción, pero reducida resistencia a la flexión del polímero resultante.

## **2.7 CITOTOXICIDAD DE LAS RESINAS DENTALES**

En la operatoria dental la motivación primordial además de la estética que cambió los paradigmas de la práctica clínica en la odontología mundial, fue la falta de seguridad biológica en el uso de la amalgama de plata, fundamentada en los estudios que advertían intoxicación por vapores de mercurio liberados de este material<sup>5</sup>, por lo tanto al encontrar en las resinas compuestas la respuesta estética tan anhelada y la supuesta biocompatibilidad requerida se desató una ola mundial que aún hoy sigue en moda, cual es cambiar las obturaciones de amalgamas por resinas compuestas, permitiendo ofrecer seguridad biológica<sup>6</sup> y estética, las cuales cada vez tenían mayor auge conforme

se desarrollaban mejores propiedades ópticas para estos materiales resinosos<sup>2</sup>.

Estudios productos de nuevas tecnologías ponen en duda la biocompatibilidad de las resinas compuestas pues están hablando de su acción toxica la cual es causada por liberación de monómeros residuales al medio oral, los cuales surgen de la polimerización incompleta de los monómeros (monómeros residuales) <sup>7</sup> causando alteraciones metabólicas en la célula y/o ADN comparables con las que pueden presentar la amalgama de plata <sup>8, 9</sup>. Inicialmente los estudios in vitro evaluaron la capacidad citotóxica y genotóxica de los monómeros dentales, aunque sus mecanismos no estaban totalmente dilucidados. Varios hallazgos identificaron al dimetacrilato de trietilenglicol co-monómero (TEGDMA) y el 2 hidroxietil metacrilato (HEMA), entre otros, como causantes de alteraciones en el ciclo celular, mediante la inhibición de los niveles de glutati6n (GSH) el cual funciona como antioxidante natural protegiendo la célula de los da1os causado por especies de 6xido reactivas (ROS), quienes pueden activar diferentes v1as de apoptosis celular<sup>33</sup>. Adem1as la

---

<sup>33</sup> SCHLEGEL R, MACGREGOR JT, EVERSON RB. Assessment of cytogenetic damage by quantitation of micronuclei in human peripheral blood erythrocytes. Cancer research. 1986 Jul;46(7):3717-21.

transformación del daño en el ADN a mutación no suele ser inmediata sino a largo plazo y, en determinadas concentraciones estos monómeros dentales tienen un alto potencial carcinogénico<sup>34</sup>

## **Capítulo 3. METODOLOGIA**

### **3.1 TIPO DE ESTUDIO**

Es un estudio experimental que tiene una finalidad aplicada en genética clínica específicamente citogenética, con un carácter de medida cuantitativo puesto que cuantifica el porcentaje de ocurrencia de los fenómenos del citoma. De conceptualización fenomenológica nomotética dado el registro de la información, de orientación a comprobación del evento citológico en presencia de monómeros de resinas utilizadas en odontología. Este estudio se desarrolló en un marco de lugar del laboratorio de química farmacéutica de la UNIVERSIDAD DE CARTAGENA con una profundidad experimental puesto que se hizo el control de las variables, colocando resinas y tomando muestras a diferentes tiempos, así mismo se dispuso con un diseño experimental para la toma de muestras e igualmente una técnica que fue desarrollada dentro de un laboratorio de genética con

---

<sup>34</sup> POPLAWSKI T, LOBA K, PAWLOWSKA E, SZCZEPANSKA J, BLASIAK J. Genotoxicity of urethane dimethacrylate, a tooth restoration component. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 2010 Apr;24(3):854-62.

un alcance temporal longitudinal porque los datos serán tomados en diferentes lapsus de tiempo.

### **3.2 DISEÑO DEL EXPERIMENTO**

El experimento se diseñó siguiendo el criterio de Montgomery (2005) para Bloques Aleatorizados (Diseño latino), cada bloque será en un tiempo de muestreo. Siendo del siguiente modo:

### **3.3 MUESTRA**

Se utilizó individuos de la ciudad de Cartagena que asistieron a la facultad de odontología que cumplan los criterios de inclusión. Se llevó a cabo una toma de muestra inicial  $[t_0]$  que fue antes de realizar la restauración en resina compuesta la cual será el grupo control (0), mientras que el segundo grupo (1) estuvo conformado por muestras de los mismos pacientes después de haber realizado la restauración en resina. Se seleccionaron niños ya que no fuman y no toman bebidas alcohólicas sustancias que causan daño celular, ya que nos podría causar un sesgo; luego de tomar las muestras y haber realizado la restauración en resina compuesta esperamos un periodo de 15 días para nuevamente tomar las muestras  $[t_1]$ . La recolección de

muestras fue realizada en cada uno de estos tiempos  $[t_0]$  y  $[t_1]$ . Posteriormente fueron transportadas de inmediato al laboratorio de química farmacéutica de la UNIVERSIDAD DE CARTAGENA. Las muestras de células exfoliadas de los carrillos de la cavidad oral de cada participante fueron marcadas con el número del 0 en los pacientes antes de realizarse la restauración (tinta negra) y 1 en 15 días después de haber realizado la restauración (tinta roja) en tubos falcón con 5 centímetros cúbicos de PBS (phosphate buffered saline) una solución buffer con PH de 7 (cloruro de sodio al 0.9%). La recolección de células exfoliadas se realizó con hisopos estériles previo enjuague con agua de la boca de cada participante.

### **3.4 RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA**

Las muestras fueron tomadas mediante un raspaje de la mucosa bucal en contacto con los dientes que serán restaurados con la resina compuesta y se almacenadas en tubos falcón tapa azul con 5cc de PBS y conservadas en neveras a 4 ° C. Previo a la recolección de células bucales, el paciente debe realizar 3 enjuagues con agua con el fin de eliminar el exceso de desechos.

Con suavidad se giró un hisopo estéril varias veces contra el interior de la mejilla en un movimiento circular a partir de la mitad y poco a poco se aumentó la circunferencia para producir un efecto de espiral hacia el exterior. La cabeza del hisopo se colocó en el recipiente del fijador y girándola de tal manera que las células sean desprendidas y liberadas en la suspensión. Las muestras obtenidas se colocaron en solución salina al 0.9% y se depositaron en una hielera aproximadamente a 10°C, mientras se traslada al laboratorio, donde se guardaran a 4°C por 24 horas; posteriormente fueron centrifugadas a 1200/rpm durante 10 minutos y lavadas 3 veces con PBS (phosphate buffered saline/ buffer de fosfato salino) sacando el sobrenadante con pipetas multicanales y se adiciono dimetil sulfocido para preservar las células durante el extendido, posteriormente se realizó el extendido celular sacando el precipitado de los tubos y colocándolo en las láminas portaobjetos previamente rotuladas y se dejaron secar en la cabina biológica a temperatura de ambiente durante 24 horas; Pasadas las 24 se fijaron con etanol al 80% (refrigerado) durante 25 minutos<sup>35</sup>.

---

<sup>35</sup> MAJER BJ, LAKY B, KNASMULLER S, KASSIE F. Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. Mutation research. 2001 Dec;489(2-3):147-72.

### **3.5 PREPARACIÓN DE LOS PORTAOBJETOS**

Se realizó la limpieza de las láminas portaobjetos con metanol puro y servilletas estériles con el fin de eliminar residuos y luego rotuladas (P1=Paciente1, P2= Paciente 2, P3=Paciente 3, P4=Paciente 4) las muestra en [t<sub>0</sub>] fueron marcadas con tinta negra y las muestras en [t<sub>1</sub>] marcadas con tinta roja. También marcamos con las iniciales de cada paciente cada muestra para identificarlas, se utilizaron 3 láminas por paciente con el fin de evaluar más células; posterior a la fijación con etanol 80% (refrigerado), se esperó a que se secan las muestras para luego ser teñidas con giemsa al 4% sumergiendo las láminas durante 10 minutos donde luego fueron sacadas y lavadas con agua destilada y se colocaron inclinadas para eliminar el exceso de giemsa.

Una vez secas las láminas se observaron en un microscopio ZEISS PRIMO STAR con el fin de ver el estado de las células; se adiciono aceite de inmersión sobre la muestra y se observaron a 100X en microscopio óptico hasta analizar el mayor número de células por lámina<sup>36</sup>.

### **3.6 ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS**

---

<sup>36</sup> THOMAS P, HOLLAND N, BOLOGNESI C, KIRSCH-VOLDERS M, BONASSI S, ZEIGER E, et al. Buccal micronucleus cytome assay. Nature protocols. 2009;4(6):825-37.

Para la identificación de los micro núcleos se utilizaran los criterios de Tolbert *et al.* 1991<sup>37</sup> También se analizaran las siguientes anomalías nucleares según la clasificación de Tolbert *et al.* 1991<sup>29</sup>. Células bi-nucleadas, células con núcleo en “broken eggs”, células con núcleo picnótico, células con núcleo donde la cromatina está condensada, células con núcleo en cariorresis o desintegración nuclear, células con núcleos en cariólisis o disolución nuclear, aunque para los efectos de interés en este estudio sólo se tendrán en cuenta los síntomas de genotoxicidad correspondiente a la suma de las células con micronúcleos<sup>28</sup>.

El análisis de varianza (**ANOVA**) se realizara cuando se obtenga un mayor tamaño de muestra con el fin de analizar las muestras divididas dos grupos; grupo 0 (antes de colocar la restauración en resina compuesta) y grupo 1 (15 días después de realizado la restauración) con el fin de comparar de una manera cuantitativa si hay diferencia significativa respecto a antes y después de la exposición de la resina dental.

Todas las muestras serán analizadas con un intervalo de confianza del 95%.

---

<sup>37</sup> TOLBERT PE, SHY CM, ALLEN JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuff users. American journal of epidemiology. 1991 Oct 15;134(8):840-50.

## CAPÍTULO 4. RESULTADOS PRELIMINARES

El desarrollo de este trabajo permitió la identificación de aberraciones cromosómicas en células epiteliales de la mucosa bucal de los participantes. Las anomalías después de la exposición encontradas fueron micro-núcleos (MN), Células bi-nucleadas (BN), células con yemas nucleares (CYN / broken eggs), cariorrexis (CR) y cariólisis (CL). El promedio de (MN, BN, CYN, CR, CL) en el primer grupo fue de (0-11-2,25-0,75-1,5), mientras que en el segundo grupo fue (0,25-20,25-9,75-11,25-15) respectivamente, **(tabla. 1)** al comparar los resultados obtenidos en ambos grupos evaluados, fueron encontradas diferencias considerables en BN, CR y CL, mientras que en los MN no. La población de estudio fue representada por un grupo de no expuestos a las resinas dentales a base de Bis-gma y UDMA, y un grupo expuesto. El grupo no expuesto estuvo determinado por 4 participantes en el cual no se identificaron micro-núcleos con un promedio de 0%, mientras que en el grupo expuesto estuvo compuesto por los mismos cuatro pacientes 15 días después de colocar una restauración en resina a base de Bis-Gma y UDMA, se

hallaron micro-núcleos con un promedio de 0.25%. Esto demuestra que no existe una diferencia significativa entre las medias. La diferencia significativa entre las medias de ambos grupo está claramente evidenciada en la presencia de BN, CR y CL del grupo expuesto con respecto a el no expuesto.

## **CAPITULO 5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN**

### **5.1 DISCUSIÓN**

La evaluación del citoma ha sido ampliamente utilizada para monitorear el posible efecto genotóxico de los materiales de uso cotidiano. Dentro de los principales biomarcadores se encuentran Aberraciones Cromosomales (CAs), Micro-núcleos (MN) e intercambio de Cromátides Hermanas (ICH), en este sentido de monitoreo también se destacan la Prueba Cometa (CA)<sup>38</sup>. Estos métodos de evaluación han tenido una gran acogida por su simplicidad y eficiencia para evaluar el daño en el ADN de células de mamíferos<sup>39</sup>. Así mismo cabe destacar que la eficiencia de estos métodos no solo viene dada en la

---

<sup>38</sup> DEMARINI DM. Genotoxicity biomarkers associated with exposure to traffic and near-road atmospheres: a review. *Mutagenesis*. 2013 Sep;28(5):485-505.

<sup>39</sup> MARINS JS, SASSONE LM, FIDEL SR, RIBEIRO DA. In vitro genotoxicity and cytotoxicity in murine fibroblasts exposed to EDTA, NaOCl, MTAD and citric acid. *Brazilian dental journal*. 2012 Sep-Oct;23(5):527-33.

sensibilidad para bajos niveles de daño en el ADN, sino también en términos económicos y tamaño de muestra de células a revisar, que puede ser completado en un corto tiempo<sup>40</sup>.

Se ha propuesto el uso del ensayo in vivo de genotoxicidad, por hallazgos reportados por la prueba de MN en otros, ya que este ensayo que difiere en sensibilidad con otros ensayos, puntos finales medidos y el tipo de datos generados contribuyendo a mejorar significativamente las capacidades estándar actuales para detección de genotoxicidad<sup>41</sup>.

El estudio para evaluar la acción genotóxica de las resinas a través del ensayo de micro-núcleos es eficiente, dado que la salida de monómeros no polimerizados de la matriz polimérica se da a largo plazo y una constante acción residual sobre las células de la mucosa<sup>42</sup>. La razón principal de tal eficiencia radica en que es un ensayo mínimamente invasivo que permite estudiar todo el sistema de daño de ADN, inestabilidad cromosómica, muerte celular y potencial

---

<sup>40</sup> BARABA A, ZELJEŽIĆ D, KOPJAR N, MLADINIĆ M, ANIĆ I, MILETIĆ I. Evaluation of cytotoxicity and genotoxic effects of two resin based root canal sealers and their components on human leucocytes in vitro. *International endodontic journal*. 2011;44:652-61.

<sup>41</sup> LUZHNA L, KATHIRIA P, KOVALCHUK O. Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond. *Frontiers in genetics*. 2013;4:131.

<sup>42</sup> THOMAS P, HOLLAND N, BOLOGNESI C, KIRSCH-VOLDERS M, BONASSI S, ZEIGER E, et al. Buccal micronucleus cytome assay. *Nature protocols*. 2009;4(6):825-37.

regenerativo del tejido de la mucosa oral<sup>43</sup>, esto se evidencia en los cambios que se reportan en este estudio.

Los resultados reportados en este estudio, evidencian que el componente monomérico de la resina de uso odontológico aumentó los micronúcleos a lo largo del tiempo y por exposición<sup>44</sup>. Este resultado es similar con los hallazgos de Azhar *et al.* 2013<sup>45</sup>, el cual evidencio un aumento de micronúcleos en la mucosa oral con respecto al del grupo control. Se infiere que esto se pudo haber dado por la composición tegumentaria de la mucosa oral, la cual es muy sensitiva a las sustancias toxicas y se relaciona con el tiempo de exposición<sup>17</sup>; además las células del epitelio bucal se encuentran sometidas a constante exfoliación. Por su parte Antonija *et al.* 2013<sup>46</sup> ratifica la importancia del tiempo de exposición en la inducción de cambios apreciables, al reportar que cuando se evaluaron leucocitos de sangre periférica considerando la respuesta ante tres diferentes tipos de

---

<sup>43</sup> THOMAS P, FENECH M. Buccal micronucleus cytome assay. *Methods Mol Biol.* 2011;682:235-48

<sup>44</sup> SHEHATA M, DURNER J, ELDENEZ A, VAN LANDUYT K, STYLLOU P, ROTHMUND L, *et al.* Cytotoxicity and induction of DNA double-strand breaks by components leached from dental composites in primary human gingival fibroblasts. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials.* 2013 Sep;29(9):971-9.

<sup>45</sup> AZHAR DA, SYED S, LUQMAN M, ALI AA. Evaluation of methyl methacrylate monomer cytotoxicity in dental lab technicians using buccal micronucleus cytome assay. *Dental materials journal.* 2013;32(3):519-21.

<sup>46</sup> TADIN A, MAROVIC D, GALIC N, MILEVOJ A, MEDVEDEC MIKIC I, ZELJEZIC D. Genotoxic biomonitoring of flowable and non-flowable composite resins in peripheral blood leukocytes. *Acta odontologica Scandinavica.* 2013 May-Jul;71(3-4):923-9.

resina odontológica, los cambios se hacen evidentes al transcurrir el tiempo de exposición, sin embargo no considera estos cambios significativos ni amenazantes para el genoma.

Así mismo, se ha demostrado que el someter a las células a nanopartículas, como son los monómeros residuales de las resinas dental (MRRD), estas interfieren con los procesos de despolimerización del ADN, posibilitando la aparición de súper-enrollamientos que son escindidos pero no descartados por el número de bases que lo componen, produciéndose de este modo una madeja de ADN fragmentada, la cual no responderá a los procesos de apoptosis<sup>47</sup>.

De acuerdo a Gociu *et al.* 2013<sup>48</sup> Quien realizó un estudio para determinar el grado de biocompatibilidad de un sellador (a base de TEGDMA), mostró que los diferentes materiales dentales generan efectos variados a nivel celular. La resina a base de monómero TEGDMA, presente en la composición del sellador, incrementó la cantidad de especies reactivas de oxígeno intracelulares. Los

---

<sup>47</sup> GOMAA IO, KADER MH, SALAH TA, HEIKAL OA. Evaluation of in vitro mutagenicity and genotoxicity of magnetite nanoparticles. *Drug discoveries & therapeutics*. 2013 Jun;7(3):116-23.

<sup>48</sup> GOCIU M, PATROI D, PREJMEREAN C, PASTRAV O, BOBOIA S, PRODAN D, et al. Biology and cytotoxicity of dental materials: an in vitro study. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie*. 2013;54(2):261-5.

materiales compuestos a base de resina son citotóxicos antes de la polimerización y que inmediatamente después de la misma no causan casi ninguna reacción. Todas las muestras de los materiales compuestos mantuvieron su integridad durante el experimento, lo que permite el ensayo junto con las células embebidas, que demostraron una buena viabilidad, por lo que son adecuados para su uso en odontología.

Es importante resaltar que el anterior estudio fue realizado en células in vitro, mientras el presente estudio fue in vivo, lo que probablemente genere una respuesta diferente por la complejidad de la cavidad bucal ya que es un microsistema que posee autorregulación propia y cuyo ambiente no puede ser reproducido con exactitud en un sistema in vitro<sup>49</sup>. En este orden de ideas, la respuesta citológica depende situacionalmente al contexto y ambiente celular. En un epitelio de alta tasa de recambio celular, los mecanismos de regulación para la apoptosis están finamente equilibrados y esta es la razón principal por la cual las células que componen este epitelio son tan sensibles a

---

<sup>49</sup> WIEBERS DO, ADAMS HP, JR., WHISNANT JP. Animal models of stroke: are they relevant to human disease? Stroke; a journal of cerebral circulation. 1990 Jan;21(1):1-3.

cambios en la química del ambiente bucal<sup>50</sup>. Otro argumento para considerar la realización en este sistema in vivo es que los radicales libres se generan de manera constante in vivo y el ADN es el objetivo más importante de estrés oxidativo, por lo que el daño oxidativo del ADN se utiliza como un biomarcador predictivo con el fin de monitorear riesgo para ciertas enfermedades, por lo que a fin de considerar esta medición a nivel celular se consideró el micro núcleo<sup>51</sup>.

En la presente investigación se expresó el cambio en el ADN mediante micro núcleo, considerando la variación entre los grupos en virtud al porcentaje de ADN para los diferentes tiempos evaluados, presentándose incremento en el promedio del porcentaje de los grupos expuestos (Grupo M0 y M1, indicador considerado en los hallazgos de Collins<sup>52</sup> quien reportó al utilizar MN presencia de daño genético evidenciable por medio de la variación del %ADNT.

---

<sup>50</sup> SHUKLA RK, SHARMA V, PANDEY AK, SINGH S, SULTANA S, DHAWAN A. ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicology in vitro* : an international journal published in association with BIBRA. 2011 Feb;25(1):231-41.

<sup>51</sup> KAWAGUCHI S, NAKAMURA T, YAMAMOTO A, HONDA G, SASAKI YF. Is the comet assay a sensitive procedure for detecting genotoxicity? *Journal of nucleic acids*. 2010;2010:541-50.

<sup>52</sup> COLLINS AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular biotechnology*. 2004 Mar;26(3):249-61.

## **5.2 CONCLUSIÓN**

El estudio de células epiteliales de la mucosa bucal a partir de la prueba de micro-núcleos, permite identificar algunas aberraciones cromosómicas como micro-núcleos, células bi-nucleadas, células con yemas nucleares y puentes nucleo-plasmáticos en pacientes sometidos a la restauración en resina.

Existen porcentajes considerables entre el grupo control y el grupo expuesto, para células con cariorresis, binucleadas, mientras que para micro-núcleos no.

## **5.3 RECOMENDACIONES**

Se recomienda aumentar el tamaño de muestra con el fin de realizar las pruebas estadísticas correspondientes para darle validez al estudio; de igual manera el mejoramiento de la técnica de micro-núcleos con el fin de eliminar los falsos positivos a la hora de observar en el microscopio y por último establecer una relación con las otras facultades con el fin de que nos faciliten los laboratorios para seguir realizando este tipo de estudios.

## BIBLIOGRAFIA

ADES F, SENTERRE C, DE AZAMBUJA E, SULLIVAN R, POPESCU R, PARENT F, et al. Discrepancies in cancer incidence and mortality and its relationship to health expenditure in the 27 European Union member states. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2013 Nov;24(11):2897-902.

AROSSI GA, DIHL RR, LEHMANN M, CUNHA KS, REGULY ML, DE ANDRADE HH. In vivo genotoxicity of dental bonding agents. *Mutagenesis*. 2009 Mar;24(2):169-72.

AZHAR DA, SYED S, LUQMAN M, ALI AA. Evaluation of methyl methacrylate monomer cytotoxicity in dental lab technicians using buccal micronucleus cytome assay. *Dental materials journal*. 2013;32(3):519-21.

BARABA A, ZELJEŽIĆ D, KOPJAR N, MLADINIĆ M, ANIĆ I, MILETIĆ I. Evaluation of cytotoxicity and genotoxic effects of two resin based root canal sealers and their components on human leucocytes in vitro. *International endodontic journal*. 2011;44:652-61.

BATES MN. Mercury amalgam dental fillings: an epidemiologic assessment. *International journal of hygiene and environmental health*. 2006 Jul;209(4):309-16.

BONASSI S, AU WW. Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction. *Mutation research*. 2002 Mar;511(1):73-86.

BONASSI S, COSKUN E, CEPPI M, LANDO C, BOLOGNESI C, BURGAZ S, et al. The HUMAN MicroNucleus project on exfoliated buccal cells (HUMN(XL)): the role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutation research*. 2011 Nov-Dec;728(3):88-97.

CHATTERJEE S, DHAR S, SENGUPTA B, GHOSH A, DE M, ROY S, et al. Cytogenetic monitoring in human oral cancers and other oral pathology: the micronucleus test in exfoliated buccal cells. *Toxicology mechanisms and methods*. 2009 Sep;19(6-7):427-33.

CHATTERJEE S, DHAR S, SENGUPTA B, GHOSH A, DE M, ROY S, et al. Cytogenetic monitoring in human oral cancers and other oral pathology:

the micronucleus test in exfoliated buccal cells. Toxicology mechanisms and methods. 2009 Sep;19(6-7):427-

COLLINS AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. Molecular biotechnology. 2004 Mar;26(3):249-61.

DEMARINI DM. Genotoxicity biomarkers associated with exposure to traffic and near-road atmospheres: a review. Mutagenesis. 2013 Sep;28(5):485-505.

DI PIETRO A, VISALLI G, LA MAESTRA S, MICALE R, BALUCE B, MATARESE G, et al. Biomonitoring of DNA damage in peripheral blood lymphocytes of subjects with dental restorative fillings. Mutation research. 2008 Feb 29;650(2):115-22.

FERLAY J, SHIN HR, BRAY F, FORMAN D, MATHERS C, PARKIN DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. International journal of cancer Journal international du cancer. 2010 Dec 15;127(12):2893-917.

FERRACANE JL. Resin composite--state of the art. Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials. 2011 Jan;27(1):29-38.

GOCIU M, PATROI D, PREJMEREAN C, PASTRAV O, BOBOIA S, PRODAN D, et al. Biology and cytotoxicity of dental materials: an in vitro study. Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie. 2013;54(2):261-5.

GOMAA IO, KADER MH, SALAH TA, HEIKAL OA. Evaluation of in vitro mutagenicity and genotoxicity of magnetite nanoparticles. Drug discoveries & therapeutics. 2013 Jun;7(3):116-23.

GRANDI C, D'OVIDIO MC, TOMAO P. [Use of the comet test in occupational medicine and industrial toxicology: considerations and prospects]. Giornale italiano di medicina del lavoro ed ergonomia. 2006 Jan-Mar;28(1):5-13.

HEDDLE JA. Implications for genetic toxicology of the chromosomal breakage syndromes. Mutation research. 1991 Apr;247(2):221-9.

JOSEPH BK. Oral cancer: prevention and detection. Medical principles and practice : international journal of the Kuwait University, Health Science Centre. 2002;11 Suppl 1:32-Poplawski T, Loba K, Pawlowska E, Szczepanska J, Blasiak J. Genotoxicity of urethane dimethacrylate, a tooth restoration component. Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA. 2010 Apr;24(3):854-62.

KAWAGUCHI S, NAKAMURA T, YAMAMOTO A, HONDA G, SASAKI YF. Is the comet assay a sensitive procedure for detecting genotoxicity? Journal of nucleic acids. 2010;2010:541-50

KIM J, SHIN DM, EL-NAGGAR A, LEE JS, CORRALES C, LIPPMAN SM, et al. Chromosome polysomy and histological characteristics in oral premalignant lesions. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology. 2001 Apr;10(4):319-25.

KLAUDE M, ERIKSSON S, NYGREN J, AHNSTROM G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. Mutation research. 1996 Jun 12;363(2):89-96.

LEON G, PEREZ LE, LINARES JC, HARTMANN A, QUINTANA M. Genotoxic effects in wild rodents (*Rattus rattus* and *Mus musculus*) in an open coal mining area. Mutation research. 2007 Jun 15;630(1-2):42-9.

LUZHNA L, KATHIRIA P, KOVALCHUK O. Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond. Frontiers in genetics. 2013;4:131.

MAJER BJ, LAKY B, KNASMULLER S, KASSIE F. Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. Mutation research. 2001 Dec;489(2-3):147-72.

MARINS JS, SASSONE LM, FIDEL SR, RIBEIRO DA. In vitro genotoxicity and cytotoxicity in murine fibroblasts exposed to EDTA, NaOCl, MTAD and citric acid. Brazilian dental journal. 2012 Sep-Oct;23(5):527-33.

MUTTER J, NAUMANN J, SADAGHIANI C, WALACH H, DRASCH G. Amalgam studies: disregarding basic principles of mercury toxicity. International journal of hygiene and environmental health. 2004 Sep;207(4):391-7.

POLYDOROU O, KONIG A, HELLWIG E, KUMMERER K. Long-term release of monomers from modern dental-composite materials. *European journal of oral sciences*. 2009 Feb;117(1):68-75.

POPLAWSKI T, LOBA K, PAWLOWSKA E, SZCZEPANSKA J, BLASIAK J. Genotoxicity of urethane dimethacrylate, a tooth restoration component. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 2010 Apr;24(3):854-62.

POPLAWSKI T, PAWLOWSKA E, WISNIEWSKA-JAROSINSKA M, KSIAZEK D, WOZNIAK K, SZCZEPANSKA J, et al. Cytotoxicity and genotoxicity of glycidyl methacrylate. *Chemico-biological interactions*. 2009 Jun 15;180(1):69-78.

RICHARDSON GM, WILSON R, ALLARD D, PURTILL C, DOUMA S, GRAVIERE J. Mercury exposure and risks from dental amalgam in the US population, post-2000. *The Science of the total environment*. 2011 Sep 15;409(20):4257-68.

SCARPARO RK, GRECCA FS, FACHIN EV. Analysis of tissue reactions to methacrylate resin-based, epoxy resin-based, and zinc oxide-eugenol endodontic sealers. *Journal of endodontics*. 2009 Feb;35(2):229-32.

SCHLEGEL R, MACGREGOR JT, EVERSON RB. Assessment of cytogenetic damage by quantitation of micronuclei in human peripheral blood erythrocytes. *Cancer research*. 1986 Jul;46(7):3717-21.

SCHWEIKL H, HARTMANN A, HILLER KA, SPAGNUOLO G, BOLAY C, BROCKHOFF G, et al. Inhibition of TEGDMA and HEMA-induced genotoxicity and cell cycle arrest by N-acetylcysteine. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*. 2007 Jun;23(6):688-95.

SCHWEIKL H, HILLER KA, BOLAY C, KREISSL M, KREISMANN W, NUSSER A, et al. Cytotoxic and mutagenic effects of dental composite materials. *Biomaterials*. 2005 May;26(14):1713-9.

SCHWEIKL H, SPAGNUOLO G, SCHMALZ G. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *Journal of dental research*. 2006 Oct;85(10):870-7.

SHEHATA M, DURNER J, ELDENEZ A, VAN LANDUYT K, STYLLOU P, ROTHMUND L, et al. Cytotoxicity and induction of DNA double-strand breaks by components leached from dental composites in primary human gingival fibroblasts. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*. 2013 Sep;29(9):971-9.

SHUKLA RK, SHARMA V, PANDEY AK, SINGH S, SULTANA S, DHAWAN A. ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 2011 Feb;25(1):231-41.

STANG A, WITTE I. Performance of the comet assay in a high-throughput version. *Mutation research*. 2009 Apr 30;675(1-2):5-10.

SUDBO J, BRYNE M, JOHANNESSEN AC, KILDAL W, DANIELSEN HE, REITH A. Comparison of histological grading and large-scale genomic status (DNA ploidy) as prognostic tools in oral dysplasia. *The Journal of pathology*. 2001 Jul;194(3):303-10.

TADIN A, MAROVIC D, GALIC N, MILEVOJ A, MEDVEDEC MIKIC I, ZELJEZIC D. Genotoxic biomonitoring of flowable and non-flowable composite resins in peripheral blood leukocytes. *Acta odontologica Scandinavica*. 2013 May-Jul;71(3-4):923-9.

THOMAS P, FENECH M. Buccal micronucleus cytome assay. *Methods Mol Biol*. 2011;682:235-48.

THOMAS P, HOLLAND N, BOLOGNESI C, KIRSCH-VOLDERS M, BONASSI S, ZEIGER E, et al. Buccal micronucleus cytome assay. *Nature protocols*. 2009;4(6):825-37.

THOMAS P, HOLLAND N, BOLOGNESI C, KIRSCH-VOLDERS M, BONASSI S, ZEIGER E, et al. Buccal micronucleus cytome assay. *Nature protocols*. 2009;4(6):825-37.

TICE RR, AGURELL E, ANDERSON D, BURLINSON B, HARTMANN A, KOBAYASHI H, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and molecular mutagenesis*. 2000;35(3):206-21.

TOLBERT PE, SHY CM, ALLEN JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuff users. American journal of epidemiology. 1991 Oct 15;134(8):840-50.

TOLBERT PE, SHY CM, ALLEN JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. Mutation research. 1992 Feb;271(1):69-77.

TOLBERT PE, SHY CM, ALLEN JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuff users. American journal of epidemiology. 1991 Oct 15;134(8):840-50.

WIEBERS DO, ADAMS HP, JR., WHISNANT JP. Animal models of stroke: are they relevant to human disease? Stroke; a journal of cerebral circulation. 1990 Jan;21(1):1-3.

**ANEXO 1. Tabla de porcentaje de presentación de aberraciones cromosómicas, Tabla 1 (antes de realizar la restauración) y Tabla 2 (después de haber realizado la restauración).**

**Tabla 1. frecuencia de aberraciones de grupo no expuesto**

	MN	MN(%)	BN	BN(%)	CYN	CYN(%)	CR	CR(%)	CL	CL(%)
<i>p1m0</i>	0	0	12	0,43	2	0,07	0	0	0	0
<i>p2m0</i>	0	0	9	0,32	5	0,18	0	0	3	0,10
<i>p3m0</i>	0	0	18	0,65	1	0,04	2	0,07	1	0,04
<i>p4m0</i>	0	0	5	0,18	1	0,04	1	0,04	2	0,07
<i>promedio</i>	0		11		2,25		0,75		1,5	

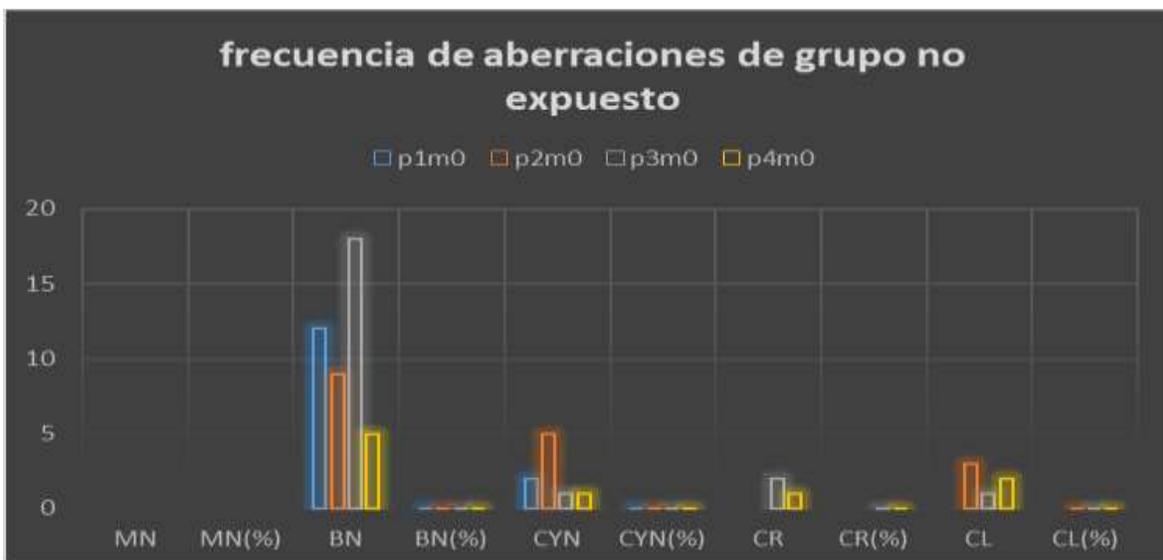
**Tabla 2. frecuencia de aberraciones de grupo expuesto**

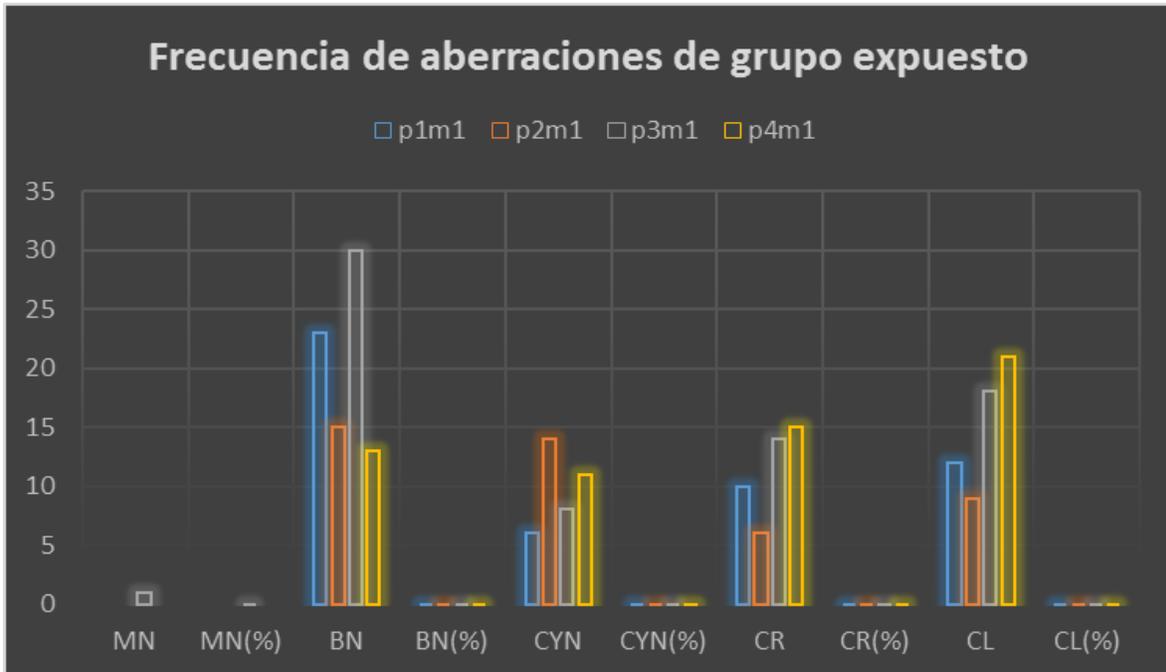
	MN	MN(%)	BN	BN(%)	CYN	CYN(%)	CR	CR(%)	CL	CL(%)
<i>p1m1</i>	0	0	23	0,83	6	0,21	10	0,36	12	0,43
<i>p2m1</i>	0	0	15	0,54	14	0,50	6	0,21	9	0,32
<i>p3m1</i>	1	0,04	30	1,09	8	0,29	14	0,50	18	0,65
<i>p4m1</i>	0	0	13	0,47	11	0,40	15	0,54	21	0,76
<i>promedio</i>	0,25		20,25		9,75		11,25		15	

## ANEXO 2. CONTEO DE CELULAS Y GRAFICAS

CONTEO DE CELULAS																
	lamina 1				lamina 2				lamina 3				tola de celulas por lamina			media
	campo 1	campo 2	campo 3	campo 4	campo 1	campo 2	campo 3	campo 4	campo 1	campo 2	campo 3	campo 4	lamina 1	lamina 2	lamina 3	
	P1M0	27	22	13	12	22	23	14	34	23	14	9	10	74	93	
P1M1	55	20	103	82	48	55	83	47	29	22	31	25	260	233	107	200
P2M0	36	23	44	15	33	28	40	16	22	19	8	24	118	117	73	102,6666667
P2M1	77	54	32	43	32	38	26	17	16	24	13	17	206	113	70	129,6666667
P3M0	29	8	59	36	21	22	19	12	15	19	21	18	132	74	73	93
P3M1	31	42	18	23	33	23	18	12	29	17	25	38	114	86	109	103
P4M0	22	9	36	51	17	27	10	34	21	27	14	29	118	88	91	99
P4M1	43	22	35	14	36	22	27	19	26	37	41	19	114	104	123	113,6666667
														total	2746	

## GRAFICAS COMPARACION DE FRECUENCIAS EN LOS 4 PACIENTES, ANTES Y DESPUES.





#### **ANEXO 4. CONSIDERACIONES ÉTICAS**

En este proyecto se procederá a realizar un consentimiento informado previo a la realización de cada procedimiento del estudio.

Yo \_\_\_\_\_ De Numero de identificación \_\_\_\_\_ He entendido todo respecto al procedimiento del estudio y sus consecuencias en el cual consiste en la realización de restauraciones en resina en dientes y exfoliación de células de mucosa oral, que serán sometidas a una prueba de MICRO-NUCLEO con el fin de determinar daño genético a causa de las resinas, esta investigación incluirá únicamente obturación en resina en uno a mas dientes, Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria. Usted puede elegir participar o no hacerlo. Tanto si elige participar o no, continuarán todos los servicios que reciba en esta clínica y nada cambiará. Usted puede cambiar de idea más tarde y dejar de participar aun cuando haya aceptado antes. Si usted participa en esta investigación, tendrá los siguientes beneficios: cualquier enfermedad oral en el intervalo será tratada sin costo. Puede que no halla beneficio para usted, pero es probable que su

participación nos ayude a encontrar una respuesta a la pregunta de investigación. Puede que no haya beneficio para la sociedad en el presente estado de la investigación, pero es probable que generaciones futuras se beneficien. Nosotros no compartiremos la identidad de aquellos que participen en la investigación. La información que recojamos por este proyecto de investigación se mantendrá confidencial. La información acerca de usted que se recogerá durante la investigación será puesta fuera de alcance y nadie sino los investigadores tendrán acceso a verla.

Solo los investigadores sabrán cuál es su número y se mantendrá la información encerrada en cabina con llave.

El conocimiento que obtengamos por realizar esta investigación se compartirá con usted antes de que se haga disponible al público. No se compartirá información confidencial. Usted no tiene por qué participar en esta investigación si no desea hacerlo y el negarse a participar no le afectara en ninguna forma a que sea tratado en esta clínica.

He leído la información proporcionada o me ha sido leída. He tenido la oportunidad de preguntar sobre ella y se me ha contestado satisfactoriamente las preguntas que he realizado. Consiento voluntariamente participar en esta investigación como participante y entiendo que tengo el derecho de retirarme de la investigación en cualquier momento sin que me afecte en ninguna manera mi cuidado médico. Nombre del Participante\_\_\_\_\_ Firma del Participante \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Día/mes/año  
Fecha

---

**NOMBRE Y FIRMA DEL INVESTIGADOR PRINCIPAL**

## ANEXO 4. FOTOGRAFIAS INTERVENSION Y LABORATORIO



Identificación de caries.



Toma de muestra.



Almacenamiento de muestra.



Estandarizando protocolo.