



**UNIVERSIDAD DE CARTAGENA  
FACULTAD DE ODONTOLOGIA  
X SEMESTRE**

**Manuscrito**

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

***“Genotoxicity of resin composed of Bis-GMA monomer and UDMA in human oral cavity.”***

***WALDIMIR PAREJA MARQUEZ***

***JANER ALBERTO PEÑA GARRIDO***

*Director:*

*Javier Enrique Méndez Silva*

*Odontólogo, especialista en rehabilitación oral e implantología, magister en genética. Facultad de odontología universidad de Cartagena*

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

*Universidad de Cartagena  
Facultad de odontología  
2019*

## RESUMEN

**Objetivo:** Evaluar la genotoxicidad de una resina dental a base de los monómeros BIS-GMA y UDMA en la cavidad oral de seres humanos. **Metodos:** resinas compuestas realizadas en pacientes pediátricos que se dividieron en dos grupos de estudios: grupo 1 control (no expuestos), grupo 2 (expuestos) y analizados en diferentes tiempos de exposición antes de colocar la restauración en resina compuesta y 15 días después de haber realizado la restauración, medidos por la prueba de genotoxicidad el ensayo de micro-núcleos usando células exfoliadas de mucosa oral. **Resultados preliminares:** se demuestra que existe una diferencia entre los porcentajes de presentaciones de aberraciones cromosómicas del grupo expuesto con el grupo no expuesto por tiempo de exposición; Concluyendo que existe relación directa entre la aparición de aberraciones cromosómicas en pacientes expuestos a resina compuesta en un periodo de 15 días. **Conclusiones:** El estudio de células epiteliales de la mucosa bucal a partir de la prueba de micro-núcleos permitió identificar algunas aberraciones cromosómicas como micro-núcleos, células binucleadas, células con yemas nucleares y puentes nucleo-plasmáticos en pacientes expuestos a la restauración en resina compuesta.

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

## **ABSTRACT**

**Objective:** To evaluate the genotoxicity of a dental resin based on the BIS-GMA and UDMA monomers in the oral cavity of humans. **Methods:** resins placed in human beings that are divided into two groups: group 1 control (0 resin - no exposure), group 2 (patients with exposed resin) and analyzed at different exposure times before placing the resin and 15 days after performing the restoration, measured by the genotoxicity test the micronucleus assay using exfoliated oral mucosa cells. **Preliminary results:** it is demonstrated that there is a difference between the means of the group with the group not exposed by the time of exposure; which led us to infer that there is a direct relationship between the appearance of chromosomal aberrations in patients exposed to this dental resin in a period of 15 days. **Conclusions:** The study of epithelial cells of the buccal mucosa from the micronucleus test allows the identification of chromosomal aberrations such as micronuclei, binucleate cells, nuclear bud cells and nucleoplasmatic bridges in patients submitted to resin restoration.

**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(1).

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 (1). 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 relativamente corta debido a su alta acidez, la cual trajo como consecuencia un daño a la pulpa dental (2).

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 (3).

Los primeros 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). 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 (4). Por lo tanto el objetivo del proyecto será Evaluar la genotoxicidad de una resina dental a base de los monómeros BIS-GMA y UDMA en la cavidad oral de seres humanos.

## **MATERIALES Y METODOS**

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 fue desarrollado en laboratorio de genética de la universidad de Cartagena con una profundidad experimental puesto que se hizo el control de las variables, colocando resina compuesta Tetric N-Ceram (ivoclar vivadent) en dientes cariados luego de retirar con una fresa de carburo y tungsteno el tejido infectado por caries dejando la cavidad aséptica y lista para obturar permanentemente con el material, esto fue realizado por el mismo grupo de investigación, y tomando muestras a diferentes periodos de tiempo, tiempo 0 antes de colocar la restauración en resina compuesta y 15 días después de haber realizado la restauración, 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 un alcance temporal longitudinal porque los datos serán tomados en diferentes periodos de tiempo.

El experimento se diseñó siguiendo el criterio de Montgomery et al, 2005 (5) para Bloques Aleatorizados (Diseño latino), cada bloque será en un tiempo de muestreo. Siendo del siguiente modo: Participaron 16 pacientes de la ciudad de Cartagena que asistieron a la facultad de odontología de los cuales 4 cumplieron los criterios de inclusión (población infantil con caries que necesitaron operatoria sin antecedentes de restauraciones del cualquier tipo, pacientes no tratados medicamente) Se llevó a cabo una toma de muestra inicial  $[t_0]$  que fue antes de realizar la restauración en resina compuesta lo cual fue 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 ya que son sustancias que causan daño celular, ya que podría causar un sesgo; se esperó un periodo de 15 días después de haber colocado la resina compuesta en los pacientes  $[t_1]$ . La recolección de muestras se realizó 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 ejemplar serán marcadas con el número del 0 en los pacientes antes de realizarse la restauración (tinta negra) y 1 en pacientes que se les haya colocado resina (tinta roja) en tubos falcón con 5 centímetros cúbicos de PBS (buffer de fosfato salino) una solución buffer con pH de 7 (cloruro de sodio al 0.9%). La recolección de células exfoliadas se realizó con hisopos previo enjuague con agua de la boca de cada ejemplar. 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 compuesta a base de Bis-Gma y UDMA.

Las muestras fueron tomadas por un operador mediante un raspaje de la mucosa bucal en contacto con los dientes que serán restaurados con la resina compuesta y se almacenaron en tubos falcón tapa azul con 5cc de PBS y conservadas en neveras a 4 ° C durante 24 horas. Previo a la recolección de células bucales, el paciente realizo 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 aumentara 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 colocaran 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 serán 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 sulfoacido al 5 % para preservar las células durante el extendido, posteriormente



se realizara el extendido celular sacando el precipitado de los tubos y colocándolo en las láminas portaobjetos previamente rotuladas y se dejaron secar en la cabina durante 24 horas a temperatura de ambiente; Pasadas las 24 se fijaran con etanol al 80% (refrigerado) durante 25 minutos(6).

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 se marcó con las iniciales de cada paciente en 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), donde se esperó a que se sequen las muestras a temperatura ambiente para luego ser teñidas con giemsa al 4% sumergiendo las láminas durante 7 minutos, posteriormente fueron lavadas con agua destilada y se colocaron inclinadas para eliminar el exceso de giemsa y facilitar su secado(6).

Una vez secas las láminas se observan al microscopio ZEISS PRIMO STAR 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 (7).

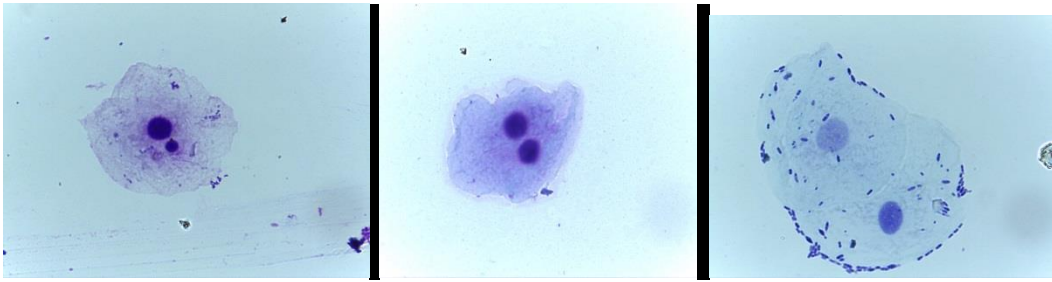
Para la identificación de los micro núcleos se utilizaran los criterios de Tolbert *et al.* 1991(8) También se analizaran las siguientes anomalías nucleares según la clasificación de Tolbert *et al.* 1991(8). Células bi-nucleadas, células con núcleo en “broken eggs”, células con núcleo picnótico, células 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 micro-núcleos (8).

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%.

## **RESULTADOS PRELIMINARES**

Las anomalías después de la exposición encontradas fueron micronúcleos (MN), Células binucleadas (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.



*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	

Se hallaron micro-núcleos con un promedio de 0.25%. Esto demuestra que no existe una diferencia considerable entre las medias pero si existió leves diferencias, pero sin significancia estadística, entre las medias de ambos grupos donde está claramente evidenciada en la presencia de BN, CR y CL del grupo expuesto con respecto a el no expuesto.

## **DISCUSION**

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)(9). 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 (10). Así mismo cabe destacar que la eficiencia de estos métodos no solo viene dada en la 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 (11).

Se ha propuesto el uso del ensayo in vivo de genotoxicidad, por hallazgos reportados por la prueba de MN en otros, ya que este ensayos 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 (12).

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 (13). 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 regenerativo del tejido de la mucosa oral (14). 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, donde el periodo de quince días es más que suficiente para evidenciar cambios, partiendo de la premisa que el recambio de células a nivel de la mucosa oral se produce en un periodo de siete días (15). Este resultado es similar con los hallazgos de Azhar *et al.* 2013 (16), 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 (17); además las células del epitelio bucal se encuentran sometidas a constante exfoliación. Por su parte Antonija *et al.* 2013 (18) 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 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 nano-partículas, 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 (19). De acuerdo a Gociu *et al.* 2013 (20) 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 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 (21).

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(22). 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 cambios en la química del ambiente bucal (23). 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 (24).

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 (25) quien reportó al utilizar MN presencia de daño genético evidenciable por medio de la variación del %ADNT.

## Conclusión

El estudio de células epiteliales de la mucosa bucal a partir de la prueba de micronúcleos, permite identificar algunas aberraciones cromosómicas como micronúcleos, células binucleadas, células con yemas nucleares y puentes nucleoplasmáticos en pacientes sometidos a la restauración en resina. Existen un leve incremento, pero sin significancia estadística, entre el grupo expuesto con respecto al grupo control, para células con cariorresis, binucleadas, mientras que para micro-núcleos no.



## REFERENCIAS BIBLIOGRAFIA

1. Bates MN. Mercury amalgam dental fillings: an epidemiologic assessment. *International journal of hygiene and environmental health*. 2006 Jul;209(4):309-16.
2. Ferracane JL. Resin composite--state of the art. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*. 2011 Jan;27(1):29-38.
3. Schweikl H, Spagnuolo G, Schmalz G. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *Journal of dental research*. 2006 Oct;85(10):870-7.
4. 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.
5. García-Perdomo H.A., Jiménez-Mejías E., López-Ramos H. efficacy of antibiotic prophylaxis in cystoscopy to prevent urinary tract infection: a systematic review and meta-analysis *Int Braz J Urol*, 41 (2015), pp. 412-424
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. Demarini DM. Genotoxicity biomarkers associated with exposure to traffic and near-road atmospheres: a review. *Mutagenesis*. 2013 Sep;28(5):485-505.
12. 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.
13. 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.
14. Luzhna L, Kathiria P, Kovalchuk O. Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond. *Frontiers in genetics*. 2013;4:131.

15. 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
16. 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.
17. Thomas P, Fenech M. Buccal micronucleus cytome assay. *Methods Mol Biol*. 2011;682:235-48
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular biotechnology*. 2004 Mar;26(3):249-61.
26. TORRES-BUGARÍN, O. & RAMOS-IBARRA, M. L. Utilidad de la prueba de micronúcleos y anormalidades nucleares en células
27. exfoliadas de mucosa oral en la evaluación de daño genotóxico y citotóxico. *Int. J. Morphol.*, 31(2):650-657, 2013.
28. HERNÁNDEZ GONZÁLEZ D\*, MÉNDEZ SILVA J\*\*, DÍAZ CABALLERO A\*\*\*. Efectos genotóxicos de las resinas en odontología: Revisión de literature. *Genotoxic effect of composites resins in dentistry: A review*
29. IRAWATI SIREGAR1, RIZA PERMITASARI1, KAMIZAR2\*, ANGGRAINI Margono2 Comparison of the Potential Genotoxicities of Resin-, Silicone-, and Bioceramic-based Root Canal Sealers against Human Lymphocytes

30. SILVA GO, CAVALCANTI BN, OLIVEIRA TR, BIN CV, CAMARGO SE, CAMARGO CH. Cytotoxicity and Genotoxicity of Natural Resin- Based Experimental Endodontic Sealers. Clin Oral Investig 2015;20(4):815-9.
31. RÍOS, M1, CEPERO, J2, KRAEL, R3, DAVIDENKO, N3, GONZÁLEZ, A2. Estudio in vitro de la actividad citotóxica de resinas dentales tipo BIS-GMA. Biomecánica, 11, 2003, pp. 3-9.

### **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  
\_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_ Día/mes/año

---

**NOMBRE Y FIRMA DEL INVESTIGADOR PRINCIPAL**