

**MICRONÚCLEOS EN MUCOSA ORAL EN INDIVIDUOS CON APARATOLOGÍA
ORTODÓNICA EN LA UNIVERSIDAD DE CARTAGENA**

Autores

ANA CRISTINA GONZÁLEZ MARTÍNEZ

ESTEPHANIA MORA SOLANO

UNIVERSIDAD DE CARTAGENA

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

CARTAGENA-BOLIVAR

2013

**MICRONÚCLEOS EN MUCOSA ORAL EN INDIVIDUOS CON APARATOLOGÍA
ORTODÓNCICA EN LA UNIVERSIDAD DE CARTAGENA**

Investigador principal

ANTONIO JOSÉ DÍAZ CABALLERO

Odontólogo, especialista en Periodoncia

Docente Facultad de Odontología Universidad de Cartagena

Coinvestigadores

ANA CRISTINA GONZÁLEZ MARTÍNEZ

ESTEPHANNIA MORA SOLANO

Estudiante de X Semestre

UNIVERSIDAD DE CARTAGENA

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

CARTAGENA-BOLIVAR

2013

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	8
INTRODUCCION	10
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	12
2. JUSTIFICACIÓN.....	15
3. OBJETIVOS.....	17
3.1 OBJETIVO GENERAL	17
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	17
4. MARCO TEORICO	18
4.1 ABERRACIONES CROMOSOMALES	20
4.2 MICRONÚCLEOS	21
4.3 MICRONÚCLEOS Y CÁNCER	23
4.4 ORTODONCIA Y MICRONÚCLEOS.....	25
5. METODOLOGÍA	28
5.1 TIPO DE ESTUDIO.....	28
5.2 POBLACIÓN Y MUESTRA	28

5.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN.....	28
5.4 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.....	29
5.4.1 Variables dependientes.....	29
5.4.2 Variables independientes.....	30
5.5 PLAN DE RECOLECCIÓN DE DATOS.....	30
5.6 INSTRUMENTO Y PRUEBA PILOTO.....	32
5.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	32
5.8 CONSIDERACIONES ETICAS.....	33
6. RESULTADOS.....	34
6.1 COMPARACIÓN DE LA PRESENCIA DE MICRONÚCLEOS.....	35
6.2 COMPARACIÓN DEL CONTEO CELULAR Y DE MICRONÚCLEOS.....	37
7. DISCUSIÓN.....	38
8. CONCLUSIÓN.....	43
RECOMENDACIONES.....	44
BIBLIOGRAFÍA.....	45
ANEXOS.....	55

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Descripción de la población de estudio	34
Tabla 2. Comparación de la presencia de micronúcleos	36
Tabla 3. Comparación del conteo celular y de micronúcleos	37

ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Consentimiento informado	55
Anexo 2. Formato para los criterios de selección	56
Anexo 3. Instrumento de identificación de micronúcleos	57
Anexo 4. Tabla matriz	58

AGRADECIMIENTOS

A Dios padre todopoderoso, nuestro guía y esperanza.

A nuestros padres por su amor, apoyo y fortaleza en cada paso dado.

A los docentes tutores por su dedicación y por interés de enriquecer con sus conocimientos a los investigadores y brindar todo su apoyo para superar los diversos inconvenientes durante la investigación.

Al Grupo interdisciplinario de investigaciones y tratamientos odontológicos Universidad de Cartagena (GITOUUC) por el apoyo logístico brindado a los investigadores en el transcurso de todas las actividades realizadas dentro de la investigación.

A los auxiliares de los laboratorios de histopatología de la Universidad de Cartagena y a el Laboratorio Clínico Myrna de Mora & CIA. LTDA, por prestarnos sus instalaciones y permitir el desarrollo del estudio.

RESUMEN

PROBLEMA. El daño genético es probablemente la causa más importante para el desarrollo de anomalías y enfermedades degenerativas pero son pocos los estudios que se centran en la medición y evaluación de los efectos genotóxicos de los productos que día a día van adquiriendo una mayor utilidad en la sociedad, como es el caso de la ortodoncia fija. Por estos motivos surge la utilización de ensayos a corto plazo que nos brinden información acerca de la actividad mutagénica de estas sustancias, sumándole el hecho de que la toxicología es actualmente un elemento cada vez más importante de la salud ambiental.

OBJETIVO. Determinar la presencia de micronúcleos en células de la mucosa oral de individuos con aparatología ortodóntica fija y sujetos sin tratamiento ortodóntico.

METODOLOGÍA. Se implementó un estudio descriptivo comparativo sobre 20 muestras de mucosa yugal de individuos con ortodoncia fija (Grupo A) y 20 muestras de individuos sin ortodoncia (Grupo B). Todas las muestras fueron tomadas mediante citocepillos y procesadas a través de tinción de giemsa. Bajo microscopía óptica (40x y 100x) se realizó recuento celular y de micronúcleos presentes. Los datos fueron analizados mediante el software estadístico SPSS vs20, teniendo en cuenta datos significativos con un valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS. El uso de aparatología ortodóntica representado por el Grupo A se asoció significativamente con la presencia de micronúcleos tanto en células mononucleas como binucleadas ($p=0.048$ y $p=0.048$). Esta asociación también se observó con un número significativamente mayor de micronúcleos en células mononucleas y binucleadas a diferencia del Grupo B (media= 18 Vs 0.4; $p=0.008$) y (media= 3.2 Vs 0.4; $p=0.032$) respectivamente.

CONCLUSIONES. A partir de los hallazgos obtenidos se concluye que el uso de aparatología ortodóntica fija puede inducir daño genotóxico caracterizado por la aparición de micronúcleos en células epiteliales de la cavidad oral. Sin embargo, estos resultados son preliminares y por lo tanto es necesario aumentar el número de muestras para ambos grupos.

INTRODUCCION

Las aleaciones metálicas que componen la aparatología ortodóntica fija provocan una liberación de iones que causan cierta cantidad de corrosión, lo que da origen a inquietudes en cuanto a su biocompatibilidad a nivel genético, debido a las reacciones adversas y daño que puede causar en las células mucosas orales en pacientes portadores de estos, provocando mutaciones del DNA y otras aberraciones cromosómicas, que pueden desencadenar procesos como carcinogénesis, afectando la salud oral de cada individuo.¹

El estudio del daño del DNA a nivel cromosomal es una parte importante en la toxicología genética ya que la mutación es fundamental en el proceso de carcinogénesis, como es el caso de las aleaciones de níquel y cromo de los aparatos de ortodoncia, los cuales, emiten iones metálicos en cantidades suficientes para inducir efectos genotóxicos localizados, pero estos cambios revierten en la eliminación de los aparatos.²

Varios estudios han evaluado el desempeño de los iones metálicos de los aparatos de ortodoncia en los líquidos biológicos, y la mayoría han concluido que no alcanzan las concentraciones tóxicas. Sin embargo, no puede excluirse que incluso concentraciones no tóxicas podría ser suficiente para producir cambios

¹ NATARAJAN, MADHUMITHA, *et al.* Evaluation of the genotoxic effects of fixed appliances on oral mucosal cells and the relationship to nickel and chromium concentrations: An in-vivo study. En: American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics. 2011, vol. 140 no. 3, p. 383-388.

² ANGELIERI, F., *et al.* Biomonitoring of mutagenicity and cytotoxicity in patients undergoing fixed orthodontic therapy. En: Am J Orthod Dentofacial Orthop. Apr, 2011, vol. 139, no. 4 Suppl, p. e399-404.

biológicos en la mucosa oral. Además de los efectos citotóxicos de los iones metálicos, los efectos físicos y mecánicas de los aparatos ortodóncicos también podrían inducir cambios en la mucosa oral.³

En la cavidad oral existe un proceso constante de recambio celular, con muchos factores que ayudan la biodegradación de elementos de ortodoncia. La saliva actúa como un electrolito para la conducción de electrones, iones, fluctuación de pH, temperatura, la actividad enzimática, microbiana y los diversos productos químicos introducidos en la cavidad oral a través de alimentos y bebidas son los conductores de la corrosión.⁴

Por ende, los cambios citogenéticos en respuesta a los aparatos fijos son una causa de preocupación, y unos pocos estudios han evaluado los cambios en la respuesta a aparatos de ortodoncia con el ensayo cometa y el ensayo de MN, y han encontrado evidencia de daño en el ADN en las células de la mucosa bucal. El objetivo de este estudio fue establecer los niveles de daño del DNA en células de la mucosa oral de pacientes con aparatología ortodóncica que acuden a la clínica odontológica de la Universidad de Cartagena.

³ NATARAJAN, *op. cit.*, pág. 383

⁴ HAFEZ, HEND SALAH, *et al.* Cytotoxicity, genotoxicity, and metal release in patients with fixed orthodontic appliances: a longitudinal in-vivo study. *En*: American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics. 2011, vol. 140, no. 3, p. 298-308.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El ensayo de micronúcleos se puede realizar en células del epitelio bucal y otras células exfoliadas provenientes de la rápida división del tejido epitelial; para el caso de la cavidad bucal su utilidad se basa en estudios citogenéticos resaltando que son mínimamente invasivos al tratarse de células exfoliadas de distintas partes de la cavidad oral permitiendo monitorear el daño genético de las poblaciones humanas.⁵ Este método se usa desde 1980 para demostrar los efectos resultantes de exposiciones ambientales y ocupacionales, estilos de vida, deficiencias alimenticias y otras alteraciones. Las células de la cavidad bucal son la primera barrera en la ruta de inhalación o ingestión y son capaces de metabolizar cancerígenos a productos reactivos. Aproximadamente el 90% del cáncer en humanos se produce a partir de células epiteliales, las cuales además, representan un blanco preferido para los primeros eventos genotóxicos inducidos por agentes cancerígenos que entran al cuerpo por inhalación o ingestión.⁶

En la cavidad bucal, hay muchos factores que trabajan juntos para crear un ambiente en el cual la corrosión acuosa de los metales y aleaciones son más favorables. La descarga de iones de níquel, un sensibilizador inmunológico fuerte, puede resultar en la hipersensibilidad, dermatitis de contacto, el asma, y citotoxicidad. Además del problema alérgico, se ha asignado al níquel y en menor medida al cromo, problemas de toxicidad celular. Sin embargo, varios estudios

⁵ NATARAJAN, *op. cit.*, P. 384

⁶ BAKHOUM, SAMUEL F, *et al.* Deviant kinetochore microtubule dynamics underlie chromosomal instability. *En*: Current Biology. 2009, vol. 19, no. 22, p. 1937-1942.

han evaluado el desempeño de los iones metálicos de los aparatos de ortodoncia en los líquidos biológicos, y la mayoría han concluido que no alcanzan las concentraciones tóxicas.

Varios autores en la última década se han centrado en la conveniencia de utilizar el ensayo de MN en diversas situaciones clínicas, como un método no invasivo para el control biológico: por ejemplo, como fuente de ADN para estudiar stress oxidativo y las asociaciones de micronúcleos en cáncer y enfermedades degenerativas. También se ha utilizado para evaluar los efectos de los agentes genotóxicos, como el humo del tabaco, el alcohol, el pesticidas, y formaldehido.

Para el análisis de alteraciones cromosomales se utiliza ensayo de aberración crómica y ensayo de MN. Ésta es la técnica más usada por su sensibilidad y sencillez.⁷

La mutación de células germinales es importante para la salud pública porque los aumentos en las mutaciones hereditarias pueden resultar en un aumento en la tasa de enfermedades genéticas en generaciones posteriores⁸.

La presencia y liberación de iones metálicos en los aparatos ortodóncicos fijos, utilizados como mecanismo de protección contra la corrosión, ha sido origen de inquietud para todas las disciplinas odontológicas, debido a las reacciones

⁷ TITENKO-HOLLAND, NINA, *et al.* Measurement and characterization of micronuclei in exfoliated human cells by fluorescence in situ hybridization with a centromeric probe. En: Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects. 1994, vol. 312, no. 1, p. 39-50.

⁸ MARCHETTI, FRANCESCO, *et al.* Sidestream tobacco smoke is a male germ cell mutagen. En: Proceedings of the National Academy of Sciences. 2011, vol. 108, no. 31, p. 12811-12814.

adversas y al daño que esto puede causar en las células mucosas orales en pacientes portadores de aparatos fijos.⁹

La implementación de este estudio va a representar una nueva forma de diagnóstico, al mostrar resultados certeros de los cambios que están ocurriendo genéticamente y de ésta manera evitar patologías que puedan presentarse en un futuro según el potencial cancerígeno de las células estudiadas y los factores de riesgo que estén relacionados con el mismo.

Con los resultados obtenidos de este proyecto esperamos que se aumente el uso de los ensayos a corto plazo como el ensayo de micronúcleos, con el cual es posible identificar el daño en el ADN y/o aberraciones cromosómicas como resultado de la exposición, a demás, la información obtenida puede ser utilizada como una alerta temprana del riesgo potencial de desarrollar a largo plazo problemas de salud.

Por lo cual surge la pregunta: ¿Puede la aparatología ortodóncica fija causar aberraciones cromosomales en células de mucosa oral?

⁹ NATARAJAN, *op. cit.*, pág.

2. JUSTIFICACIÓN

El estudio del daño del DNA a nivel cromosomal es una parte importante en la toxicología genética ya que la mutación es fundamental en el proceso de carcinogénesis. El nivel de integridad genética humana está cada vez más amenazado por la actividad industrial que da lugar a exposiciones a genotoxinas químicas y físicas. El daño genético es probablemente la causa más importante para el desarrollo de anomalías y enfermedades degenerativas pero son pocos los estudios que se centran en la medición y evaluación de los efectos genotóxicos de los productos que día a día van adquiriendo una mayor utilidad en la sociedad¹⁰, las sustancias que hacen parte del ambiente, procedimientos médicos como radiación y agentes químicos, deficiencia de nutrientes como el ácido fólico, hábitos como alcoholismo, tabaquismo, drogadicción, stress, estilos de vida, al igual que factores genéticos tales como alteraciones en el metabolismo y/o reparación del DNA¹¹. Existen tres razones fundamentales que justifican la preocupación por la exposición del hombre a los agentes mutagénicos. Primero, el incremento en el grado de mutación de las células germinales¹² (óvulos, espermatozoides y sus precursores) lo cual puede provocar un aumento de la incidencia de las enfermedades genéticas en futuras generaciones. Segundo, la presencia de una estrecha relación entre la inestabilidad genómica de células

¹⁰ ROCCO, LUCIA, *et al.* Micronucleus test and comet assay for the evaluation of zebrafish genomic damage induced by erythromycin and lincomycin. *En:* Environmental toxicology. 2012, vol. 27, no. 10, p. 598-604.

¹¹ RICKES, LN, *et al.* Increased micronucleus frequency in exfoliated cells of the buccal mucosa in hairdressers. *En:* Genetics and Molecular Research. 2010, vol. 9, no. 3, p. 1921-1928.

¹² GHANAYEM, BURHAN I, *et al.* Comparison of germ cell mutagenicity in male CYP2E1-null and wild-type mice treated with acrylamide: evidence supporting a glycidamide-mediated effect. *En:* Biology of reproduction. 2005, vol. 72, no. 1, p. 157-163.

somáticas con el cáncer y las enfermedades degenerativas crónicas¹³. Tercero, el origen ambiental del cáncer¹⁴. Por estos motivos surge la utilización de ensayos a corto plazo que nos brinden información acerca de la actividad mutagénica de estas sustancias, sumándole el hecho de que la toxicología es actualmente un elemento cada vez más importante de la salud ambiental.

¹³ FENECH, MICHAEL. The in vitro micronucleus technique. En: Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 2000, vol. 455, no. 1, p. 81-95.

¹⁴ MORETTI, MASSIMO, *et al.* A study protocol for the evaluation of occupational mutagenic/carcinogenic risks in subjects exposed to antineoplastic drugs: a multicentric project. En: BMC public health. 2011, vol. 11, no. 1, p. 195.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Establecer los niveles de daño del DNA, determinando la presencia de micronúcleos en células de la mucosa oral de pacientes con aparatología ortodóncica fija y compararlas con células de mucosa de pacientes sin aparatología ortodóncica fija, que acuden a la clínica odontológica de la Universidad de Cartagena.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ✓ Describir las características sociodemográficas de los pacientes incluidos en el estudio.
- ✓ Determinar la presencia de micronúcleos en células de la mucosa oral de pacientes con aparatología ortodóncica fija.
- ✓ Determinar la presencia de binucleación de las células de la mucosa oral de pacientes con aparatología ortodóncica fija.
- ✓ Determinar la presencia de picnosis en células de la mucosa oral de pacientes con aparatología ortodóncica fija.
- ✓ Determinar la presencia de cariólisis en células de la mucosa oral de pacientes con aparatología ortodóncica fija.

4. MARCO TEORICO

Durante la división celular el material genético que está en el núcleo, se replica y divide equitativamente dando lugar a dos células hijas idénticas. Múltiples factores pueden afectar este proceso, como errores en la replicación, roturas cromosómicas y efectos genotóxicos, el resultado será una división del material genético no equitativo y pérdida cromosómica. El material genético que se desprende queda excluido del núcleo de la célula hija, formando un nuevo núcleo de menor tamaño que el principal, llamado micronúcleo, el cual es fácilmente visible al microscopio óptico.¹⁵

El epitelio oral está compuesto por 4 estratos de poblaciones celulares estructurales, progenitoras y de maduración, incluyendo la lámina propia o tejido conectivo, las células basales o lámina basal, capa o estrato espinoso y una capa superficial de queratina. Una serie de estructuras parecidas a dedos, conocidas como “rete pegs” proyectados desde el tejido conectivo hacia la capa epidérmica produciendo un efecto ondulante de las células de la capa basal.

En el epitelio oral se produce una constante renovación de células, en el cual las células que se desprenden son reemplazadas por nueva células resultantes de la mitosis que se produce en la capa basal. Es en la capa basal donde se encuentran las células madre capaces de expresar alteraciones genéticas durante la división

¹⁵ ZALACAIN, M, *et al.* The cytogenetic assay as a measure of genetic instability induced by genotoxic agents]. In *Anales del sistema sanitario de Navarra*. 2005, vol. 28, p. 227.

celular tales como micronúcleos. Las células hijas, que pueden o no incluir micronúcleos, se diferencian en la capa espinosa y la queratinizada para luego exfoliar en la cavidad bucal. Algunas de estas células pueden degenerar en células con cromatina condensada, núcleos fragmentados, núcleos pignóticos o pueden perder por completo su material nuclear. Estos biomarcadores de daño genético y muerte celular se pueden observar tanto en linfocitos como en células de la cavidad bucal proporcionando mayor información sobre el daño del genoma.¹⁶

Actualmente hay muchas pruebas tanto de modelos *in vivo* como *in vitro*, por lo cual los organismos estudiados pueden ser virus, hongos, plantas, bacterias, insectos y mamíferos, incluidos los humanos. El ensayo de micronúcleos es uno de los estudios de preferencia para la determinación de riesgo potencial de daños en el DNA relacionado con la exposición a agentes genotóxico. Esta prueba es la más frecuentemente usada para detectar rupturas cromosomales o interferencias en el proceso de mitosis y puede ser aplicada a células de diversos tejidos como por ejemplo linfocitos de sangre periférica o células de la mucosa bucal humana, proporcionando información sobre el daño citogenético de tejidos y especialmente permitiéndonos evaluar aquellos lugares blanco de los agentes carcinogénicos humanos donde se podrían desarrollar neoplasias o carcinomas logrando acceder a la adecuada y suficiente toma de muestras sin causar incomodidad.¹⁷

¹⁶ THOMAS, PHILIP, *et al.* Buccal micronucleus cytome assay. En: Nat Protoc. 2009, vol. 4, no. 6, p. 825-837.

¹⁷ BONASSI, STEFANO, *et al.* The HUman MicroNucleus project on eXfoLiated buccal cells (HUMAN XL) The role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. En: Mutation Research/Reviews in Mutation Research. 2011, vol. 728, no. 3, p. 88-97.

4.1 ABERRACIONES CROMOSOMALES

Las aberraciones cromosomales consisten en anomalías en los cromosomas respecto al número (aploipode, poliploide) o cambios estructurales (translocación, duplicación). Se interpreta entonces la presencia de aberraciones cromosomales como una respuesta frecuente e importante a la exposición ante agentes mutagénicos físicos o químicos. Su importancia se basa en la relación con enfermedades genéticas hereditarias y su participación en la carcinogénesis. Los defectos segregacionales son una de las causas de inestabilidad cromosomal, cuando se forman núcleos céntricos y acéntricos durante la telofase, lo cual es de gran relevancia en los procesos oncogénicos. Las posibles consecuencias de esta inestabilidad son: alteración del número de copias de uno o más genes, un cambio en la expresión genética o cambio en la estructura genética de tal manera que la proteína es alterada, lo cual a su vez puede conducir tanto al aumento como a la disminución de la actividad de dicha proteína. Las aberraciones cromosómicas están relacionadas con un aumento del riesgo de cáncer.¹⁸

La mutación cromosómica se identifica básicamente mediante ensayos citogenéticos que consisten en exponer células animales o humanas a la sustancia química en placas de cultivo, teñir cromosomas y luego visualizar directamente en el microscopio los cromosomas para detectar alteraciones en estructura o número, entre los cambios más significativos y aceptados

¹⁸ THOMAS, PHILIP, *et al. op. cit.* P.826

actualmente están las aberraciones cromosomales y como una subcategoría, los micronúcleos.¹⁹

4.2 MICRONÚCLEOS

Éstos son cuerpos pequeños, extranucleares que aparecen durante el proceso de división celular, principalmente provienen de fragmentos de cromosomas acéntricos, fragmentos de cromátidas acéntricas o cromosomas completos que no se incluyen exitosamente en el núcleo de las células hija en la etapa de telofase por defectos en el proceso de segregación durante la anafase.²⁰

Se produce la formación de micronúcleos a partir de fragmentos de cromátidas y cromosomas cuando las rupturas del DNA de doble cadena, sin reparación, pueden producir cromátidas simétricas y asimétricas e intercambio de cromosomas al igual que fragmentos tanto de cromátidas como de cromosomas, pero esto es solo posible cuando el nivel de daño del DNA supera la capacidad reparativa de la célula en un periodo de tiempo determinado. Otro mecanismo consiste en la escisión simultánea de la reparación de los daños del DNA o incorporación inapropiada de bases al DNA en lugares opuestos de la doble hélice.²¹ La formación de micronúcleos a partir de mal segregación de cromosomas completos se produce cuando se detectan micronúcleos en células

¹⁹ DÍAZ CABALLERO, A, *et al.* Presencia de micronúcleos en células epiteliales de encías, como marcador de inestabilidad cromosomal: Revisión sistemática. *En: Avances en Odontostomatología*. 2013, vol. 29, no. 2, p. 95-102.

²⁰ DÍAZ CABALLERO, A, *et al. op. cit.* p.97

²¹ *Ibid.* . p,98

sin previa exposición a genotoxinas se deduce que son originados a partir de fragmentos de cromosomas acéntricos o pérdida de cromosomas completos en una proporción de 30% y 70% respectivamente, dependiendo de la edad y el género, siendo mayor en mujeres que en hombres.²² Los cromosomas sexuales contribuyen a la mayoría de los eventos de pérdida cromosomal con relación al incremento de la edad. En las mujeres, el cromosoma X se puede relacionar con el 72% de los micronúcleos observados, de los cuales un 37% parecen carecer de un cinetocoro funcional, lo cual sugiere que el defecto puede ser a nivel del ensamblaje del cinetocoro debido a la inactivación del cromosoma X. Hay una serie de posibles mecanismos que conducen a la formación de micronúcleos a partir de cromosomas completos, por defectos en la segregación durante la etapa de anafase. Uno de ellos es la hipometilación de citosina, el proceso normal de metilación consiste en transferencia de grupos metilos a algunas de las bases citosinas situadas previa y contiguamente a una guanina; el grado de transcripción es inversamente proporcional a la metilación. Al producirse errores en la transcripción genética se altera la secuencia del DNA, la pérdida de metilación o hipometilación se asocia al riesgo de cáncer. Otra posibilidad para la formación de micronúcleos se da cuando se pierden los cromosomas debido a mutaciones producidas por defectos en la dinámica de interacción entre el cinetocoro y los microtúbulos. Otra variable que probablemente aumente la incidencia de micronúcleos por pérdida cromosomal son los defectos en el ensamblaje del huso mitótico, defectos en el punto de verificación y amplificación anormal de los

²² EL-ZEIN, RANDA A, *et al.* Cytokinesis-blocked micronucleus cytome assay biomarkers identify lung cancer cases amongst smokers. *En: Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2008, vol. 17, no. 5, p. 1111-1119

cormosomas. Un estudio reciente, sugiere que los cromosomas dicéntricos resultantes de las fusiones finales de los telómeros pueden estar involucrados en los eventos de malsegregación; esto puede ocurrir cuando los centrómeros del cromosoma dicéntrico son atraídos hacia los polos opuestos de la célula durante la anafase con tal fuerza que separan el cromosoma del huso.²³

4.3 MICRONÚCLEOS Y CÁNCER

La relación entre la presencia de micronúcleos y el desarrollo del cáncer está soportada por múltiples estudios, la mayoría de los argumentos incluyen la alta frecuencia de este biomarcador en pacientes con cáncer sin tratamiento, individuos con enfermedades congénitas que predisponen al cáncer²⁴, la presencia de alta frecuencia de micronúcleos en la mucosa oral, usado como biomarcador de cáncer en ensayos clínicos de quimioprevención²⁵, la correlación existente entre los agentes genotóxicos inductores de micronúcleos y la carcinogénesis²⁶, la relación inversa entre la frecuencia de micronúcleos y la

²³ DÍAZ CABALLERO, A, *et al. op. cit.* p.98

²⁴ FENECH, MICHAEL. Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. *En: Drug Discovery Today.* 2002, vol. 7, no. 22, p. 1128-1137.

²⁵ VAN SCHOOTEN, FREDERIK JAN, *et al.* Effects of Oral Administration of N-Acetyl-L-cysteine A Multi-Biomarker Study in Smokers. *En: Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention.* 2002, vol. 11, no. 2, p. 167-175.

²⁶ BETTEGA, D, *et al.* Differential effectiveness of solar UVB subcomponents in causing cell death, oncogenic transformation and micronucleus induction in human hybrid cells. *En: International journal of radiation biology.* 2003, vol. 79, no. 3, p. 211-216.

concentración sanguínea y/o ingesta de los micronutrientes asociados a la prevención del cáncer como calcio, vitamina E, entre otros²⁷.

El ensayo de micronúcleos se puede realizar en células del epitelio bucal y otras células exfoliadas provenientes de la rápida división del tejido epitelial; para el caso de la cavidad bucal su utilidad se basa en estudios citogenéticos resaltando que son mínimamente invasivos al tratarse de células exfoliadas de distintas partes de la cavidad oral y nos permite monitorear el daño genético de las poblaciones humanas²⁸. Este método se usa desde 1980 para demostrar los efectos resultantes de exposiciones ambientales y ocupacionales, estilos de vida, deficiencias alimenticias y otras alteraciones²⁹. Las células de la cavidad bucal son la primera barrera en la ruta de inhalación o ingestión y son capaces de metabolizar cancerígenos a productos reactivos³⁰. Aproximadamente el 90% del cáncer en humanos se produce a partir de células epiteliales, las cuales además, representan un blanco preferido para los primeros eventos genotóxicos inducidos por agentes cancerígenos que entran al cuerpo por inhalación o ingestión³¹.

²⁷ Op. Cit. DÍAZ CABALLERO, A, *et al.* Presencia de micronúcleos en células epiteliales de encías, como marcador de inestabilidad cromosomal p.98

²⁸ RICKES, LN, *et al. op. cit.* P.

²⁹ HOLLAND, NINA, *et al. op. cit.* P.

³⁰ VONDRACEK, MARTIN, *et al.* Cytochrome P450 expression and related metabolism in human buccal mucosa. *En: Carcinogenesis*. 2001, vol. 22, no. 3, p. 481-488.

³¹ *Ibid.* HOLLAND, NINA, *et al.* P. 96

4.4 ORTODONCIA Y MICRONÚCLEOS

Durante un tratamiento de ortodoncia, los objetivos principales son proporcionarle al paciente los resultados estéticos que él espera en su imagen y sonrisa, sin dejar de tomar en cuenta los aspectos de una oclusión ideal, todo esto tratamos de hacerlo con la mejor comodidad, es decir sin provocar el más mínimo dolor ni reacciones adversas, pero en ocasiones esto no es posible. En gran parte por que los elementos que utilizamos dentro de ésta área de la odontología son aparatos de metal, de acrílico o combinados, que nos pueden ocasionar lesiones por fricción o por traumatismos externos contra estos aparatos, así como por mal aplicación de éstos o falta de cuidados del paciente. Además, que se catalogarían como un cuerpo extraño en contacto con los tejidos y pueden ser parte importante de algunos accidentes y desencadenantes de lesiones en tejidos blandos o duros³².

Existe un factor en este tipo de aparatología que puede causar alteraciones a nivel génico, como lo es la liberación de iones metálicos proveniente de los mismos, como aleaciones de níquel y cromo en los pacientes que lo portan. Por lo tanto, es posible que estas aleaciones de níquel y cromo de los aparatos de ortodoncia, en cantidades suficientes, puede inducir efectos genotóxicos localizados, pero estos cambios revierten en la eliminación de los aparatos³³.

³² RODRIGUEZ, JOSÉ VICTOR AVALOS. Lesiones fáticas por tratamiento ortodóntico. *En*: Virtual Journal of Orthodontics [serial online]. 2004, vol. 6, no. 3, p. 49-54.

³³ NATARAJAN, MADHUMITHA, *et al. op. cit.* P. 383

Aparatos ortodóncicos fijos que consisten en bandas, soportes y cables se hacen comúnmente de austenítico acero inoxidable (SS) que contiene 18% de cromo y 8% de níquel. La descarga de iones de níquel, un fuerte sensibilizador inmunológico, puede provocar hipersensibilidad, dermatitis de contacto, asma, y citotoxicidad³⁴.

La corrosión de una aleación es de fundamental importancia para su biocompatibilidad porque la liberación de elementos de la aleación es casi siempre necesaria para efectos adversos biológicos tales como toxicidad, alergia, mutagenicidad y carcinogenicidad. Aleación y corrosión proporciona iones libres que afectan a los tejidos alrededor de ella. Hay poca evidencia de que los elementos liberados de aleaciones de fundición contribuyen significativamente a la toxicidad sistémica. La causa de esto podría ser explicado por la baja liberación de iones a través del tiempo. La tolerancia de metal y las cantidades que causan toxicidad no son muy claras. Los metales no son biodegradables, y su liberación sostenida puede producir efecto tóxico irreversible de su acumulación en los tejidos. Además, la mayor exposición podría limitar el tiempo de recuperación necesario para la reparación celular. La toxicidad del metal se rige por múltiples factores, por lo que es difícil evaluar realmente los niveles que puede producir daño celular³⁵.

La literatura en la investigación del cáncer y toxicología de los metales incluyen muchos informes de los peligros de diversos iones metálicos. Iones de Níquel y

³⁴ ANGELIERI, F., *et al. op. cit.* P. 400

³⁵ HAFEZ, HEND SALAH, *et al. op. cit.* P. 298

cromo, que son abundantes componentes de la mayoría de las aleaciones de ortodoncia, se clasifican como carcinógenos químicos. El conocimiento reciente en los mecanismos celulares y moleculares de la toxicidad de metales podría producir cierta preocupación cuando se trata de aparatología ortodóncica. Esto es debido al contacto directo, exposición prolongada con los tejidos orales y la corrosión, lo que resulta en la liberación de varios tipos y cantidades de iones metálicos³⁶.

³⁶ Ibid. P. 299

5. METODOLOGÍA

5.1 TIPO DE ESTUDIO

Se realizó estudio tipo descriptivo, comparativo.

5.2 POBLACIÓN Y MUESTRA

La muestra obtenida estuvo constituida por 20 pacientes que se encontraban en tratamiento con aparatología ortodóncica fija durante un mínimo de 18 meses que asistieron al postgrado de ortodoncia de la facultad de odontología de la Universidad de Cartagena y 20 que nunca recibieron tratamiento con aparatología ortodóncica fija atendidos en la clínica integral del adulto de la facultad de odontología de la Universidad de Cartagena. El tamaño de la muestra fue calculado a partir de la tendencia histórica^{37,38,39}, los cuales se dividieron en dos grupos; uno para los pacientes expuestos y otro para los pacientes no expuestos.

5.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Como criterios de inclusión para los pacientes elegidos se exigió haber tenido ortodoncia fija con un mínimo de 18 meses para el grupo A y nunca haber tenido ortodoncia fija para el grupo B, así como no haber padecido infecciones

³⁷ ANGELIERI, F, *et al.* Mutagenicity and cytotoxicity assessment in patients undergoing orthodontic radiographs. En: Dentomaxillofacial Radiology. 2010, vol. 39, no. 7, p. 437-440.

³⁸ FENECH, M., *et al.* Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. En: Mutagenesis. Jan, 2011, vol. 26, no. 1, p. 125-132.

³⁹ HAFEZ, HEND SALAH, *et al.* Cytotoxicity, genotoxicity, and metal release in patients with fixed orthodontic appliances: a longitudinal in-vivo study. En: American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics. 2011, vol. 140, no. 3, p. 298-308.

bacterianas o virales las últimas cuatro semanas ni haber recibido radiaciones de cabeza o cuello los últimos tres meses previos al estudio, presentar dentición permanente, no haber recibido tratamiento rehabilitador con amalgama o restauraciones metálicas. Como criterios de exclusión, se exigió no padecer ningún tipo de síndromes, peligros mutagénicos no conectados con la ocupación (fumar, beber, drogas al consumo) y enfermedades relacionadas con cualquier daño genético, diabetes, anemia o cualquier enfermedad debilitante.

Los sujetos fueron inicialmente evaluados con un cuestionario para comprobar si se ajustan a los criterios del estudio.

5.4 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

La variable principal que se evaluó fue la presencia de micronúcleos en células de mucosa oral en pacientes con aparatología ortodóncica fija, la cual se define como una variable tipo cuantitativa asumiendo un valor numérico y tiene lógica aritmética, presentando un nivel de medición de tipo razón ya que se midió plenamente como se obtiene.

5.4.1 Variables dependientes

- ✓ Presencia de micronúcleos (cualitativo)
- ✓ Conteo de micronúcleos en células mononucleadas (cuantitativo)
- ✓ Conteo de micronúcleos en células binucleadas (cuantitativo)

5.4.2 Variables independientes

Presencia de aparatología ortodóncica fija

5.5 PLAN DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Se calibró a dos operadores para la realización de recolección de muestras y demás procedimientos de laboratorio necesarios para la determinación de micronúcleos y otras aberraciones cromosomales presentes en cada una de las placas a analizar.

Se realizó una encuesta para verificar si los individuos cumplían con los criterios de selección para el estudio, teniendo en cuenta los criterios de inclusión y exclusión.

Una vez hecho esto y posterior a la realización de un consentimiento informado, la colección de muestras se realizó con cepillo citológico, realizando un frotis suave en la parte interior de los labios y mucosa oral derecha e izquierda de cada paciente. Se introdujo cada muestra en el respectivo eppendorf, los cuales estaban llenos hasta dos tercios del mismo con suero fisiológico, para que no se alterara el equilibrio osmótico de las células y se rotularon respectivamente con la identificación de cada paciente, añadiendo la letra “A” para los pacientes expuestos y “B” para los pacientes no expuestos, organizándolos en una gradilla y almacenados en hielo dentro de un recipiente cerrado y aislado.

Las muestras fueron transportadas a un laboratorio, para seguir con el procedimiento, donde cada cepillo citológico contenido en su respectivo eppendorf se retiró agitándolo para librar las células que se habían adherido a las cerdas y llevado hasta un guardián como sitio de desecho, categorizado en residuos de riesgo biológico, cortopunzantes.

El material obtenido se centrifugó a 1.500 rpm durante 5 minutos con centrifugadora Humax 5000 y con una micropipeta se succionó la muestra centrifugada, obteniendo de esa forma una alta concentración de células y el sobrenadante fue descartado en su respectivo eppendorf.

Posteriormente se transfirió el volumen de líquido obtenido hacia el portaobjeto rotulado con la identificación de cada paciente, completándolos con la letra “A” para los pacientes expuestos y “B” para los pacientes no expuestos. Seguidamente se realizó el extendido de la muestra a través de un portaobjeto y se procedió a fijar la misma con calor, a través de un mechero de laboratorio, durante 3 segundos aproximadamente. Prontamente, se procedió a realizar la tinción con la técnica May Grünwald-Giemsa, reportada por Kashyap & Reddy (2012), a través de un gotero de laboratorio se absorbió tinte Giemsa a una concentración del 5% vertiéndolo gota a gota hasta cubrir la muestra en su totalidad y se esperó un tiempo de 10 minutos aproximadamente esperando el secado de la misma a temperatura ambiente.

Este tinte permitió observar el citoplasma de color rosa y el núcleo de color azul de 10 muestras, 5 del grupo A y 5 del grupo B, bajo la luz de un microscopio óptico de la casa comercial Nikon Eclipse E100, con un aumento de 40x para lograr una adecuada localización de las células.

Una vez hecho esto, se colocó una gota de aceite de inmersión tipo A de la casa comercial Nikon sobre la muestra para visualizar las células con un aumento de 100x, eliminando la desviación de los rayos de luz y aumentando la eficacia del análisis de micronúcleos y atipias nucleares (binucleación, picnosis, cariólisis y cariorrexis), realizado por personal calibrado para este tipo de procedimientos.

5.6 INSTRUMENTO Y PRUEBA PILOTO

La recolección de datos que se utilizó en este estudio estuvo encaminada a recolectar, conservar, e interpretar los datos por lo cual, para ello se contó con fuentes primarias de recolección.

Como fuentes primarias se utilizó la información obtenida a través de encuestas, con el fin de obtener una información veraz y concluyente que permitió el posterior procesamiento y análisis de datos.

5.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estuvo dado por la comparación entre la presencia de micronúcleos en pacientes con aparatología fija y pacientes que nunca han recibido tratamiento

ortodónico fijo en tablas de contingencia. Para esto se realizaron pruebas de χ^2 con test exacto de Fisher para los casos de frecuencias esperadas menor de 5 y la prueba Z de comparación de proporciones con correlación de Bonferroni del valor de p .

Para el caso de las variables cuantitativas: conteo celular y de micronúcleos, se compararon los grupos de estudio mediante la prueba U de Mann-Whitney. Se tuvieron en cuenta como dato significativo valores de $p < 0.05$.

5.8 CONSIDERACIONES ETICAS

Las consideraciones éticas del proyecto estuvieron acorde a todo lo dispuesto en la resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia⁴⁰, título II de la investigación de seres humanos, catalogándola según el artículo 11, inciso b, investigación con riesgo mínimo. Teniendo en cuenta el artículo 14 se cumplió con la realización de un consentimiento informado por escrito por medio del cual se explicó a los participantes el objetivo y el método de recolección de células, autorizando la intervención con pleno conocimiento para poder ser reclutado en la investigación, enfatizando que los resultados obtenidos solo se utilizaron para este estudio, garantizando la confidencialidad y el anonimato de la participación, la cual fue opcional y no obligatoria.

⁴⁰ NORMAS TÉCNICAS Y ADMINISTRATIVAS PARA LA INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS. Resolución 008430. Ministerio de Salud. Republica de Colombia. 1993, p. 53.

6. RESULTADOS

A continuación se describen resultados preliminares con las que se hizo el análisis estadístico, de 10 muestras de mucosa oral, obtenidas mediante el frotis de la misma con cepillo citológico. Estas muestras fueron donadas por individuos con al menos 18 meses de tratamiento ortodóncico fijo para el caso del grupo A comprendido por 5 sujetos y para el grupo B, 5 individuos que nunca recibieron este tipo de tratamiento, que acudieron a la Facultad de Odontología de la Universidad de Cartagena. En la tabla 1 se describen las características generales de los participantes.

Tabla 1. Descripción de la población de estudio

	Frecuencia n= 10	Porcentaje (%)
Grupos		
Grupo A	5	50
Grupo B	5	50
Sexo		
Mujer	6	60
Hombre	4	40
Edad	Media 21.7	DE 3.52

DE = Desviación Estándar

6.1 COMPARACIÓN DE LA PRESENCIA DE MICRONÚCLEOS

Con respecto a la presencia de micronúcleos en células mononucleadas en el grupo A, en el 100% (n=5) de las muestras se observaron micronúcleos, mientras que en el grupo B, solo se presentó en el 20% (n=1); mostrando una asociación estadísticamente significativa ($p=0.048$). De igual forma, el uso de aparatología ortodóntica fija se asoció con la presencia de micronúcleos en células binucleadas, 80% (n=4) para el grupo A y 0% (n=0) para el grupo B; ($p=0.048$). En cuanto al hallazgo de necrosis celular no se observó una asociación significativa con el uso de aparatología ortodóntica fija (Tabla 2).

Tabla 2. Comparación de la presencia de micronúcleos

	Grupo A		Grupo B		Valor de P
	Frecuencia n=5	Porcentaje (%)	Frecuencia n=5	Porcentaje (%)	
Micronúcleos	células				
Mononucleadas					
Ausentes	0	0	4	80	0.048*
Presentes	5	100	1	20	
Micronúcleos					
células					
Binucleadas					
Ausentes	1	20	5	100	0.048*
Presentes	4	80	0	0	
1 micronúcleo en					
células					
Binucleadas					
Ausente	3	60	5	100	0.44
Presente	2	40	0	0	
2 micronúcleo en					
células					
Binucleadas					
Ausente	4	80	5	100	1.00
Presente	1	20	0	0	
3 micronúcleo en					
células					
Binucleadas					
Ausente	3	60	5	100	0.44
Presente	2	40	0	0	
Necrosis celular					
Ausente	1	20	1	20	1.00
Presente	4	80	4	80	

Test Chi-cuadrado

Test exacto de Fisher por frecuencia esperada < 5

Prueba Z de comparación de proporciones con corrección de Bonferroni del valor de p

Grupo A= expuestos a ortodoncia Grupo B= no expuestos a ortodoncia

6.2 COMPARACIÓN DEL CONTEO CELULAR Y DE MICRONÚCLEOS

Se observó en los análisis ejecutados una diferencia significativa teniendo en cuenta que las muestras del grupo A presentaron mayor número de micronúcleos en células mononucleadas en relación con las muestras del grupo B (media= 18 Vs 0.4; $p=0.008$). En el conteo de micronúcleos en células binucleadas también se observó asociación estadísticamente significativa entre el grupo A y un mayor número de micronúcleos ($p=0.032$) (Tabla 3).

Tabla 3. Comparación del conteo celular y de micronúcleos

	Grupo A		Grupo B		Valor de P
	Media	DE	Media	DE	
Células mononucleadas	433	151.09	685.6	517.35	0.841
Micronúcleos en células mononucleadas	18	8.87	0.4	0.89	0.008*
Células binucleadas	9.4	10.59	5.2	5.89	0.690
Micronúcleos en células binucleadas	3.2	3.76	0	0	0.032*
Células necróticas	23	23.6	15.4	9.5	1.00

Prueba U de Mann-Whitney

* valor de $p < 0.05$

7. DISCUSIÓN

Cuando los aparatos de ortodoncia están presentes en la cavidad oral por lo general están sujetos a procesos de corrosión, que conducen a la liberación de metales. Algunos de los elementos metálicos presentes en los aparatos de ortodoncia, tales como el níquel y el cromo, son conocidos por ser agentes carcinógenos y potenciales mutágenos⁴¹.

Cuando se produce daño en el ADN, varios mecanismos reparadores se activan regularmente para mantener la integridad del DNA. Sin embargo, la persistencia de daño en el ADN dará lugar a la inestabilidad genética y mutaciones en el mismo. Está documentado que los iones metálicos interfieren con muchas de las vías de protección y reparación que mantienen la homeostasis celular y la integridad del ADN. Con base en los cambios biológicos estudiados, sería prudente reducir cualquier cambio inducido por la aparatología ortodóntica. Esto se puede lograr mediante la adopción de técnicas de tratamiento que reducen la duración del mismo y la aplicación de normas más estrictas para la resistencia a la corrosión del aparato de ortodoncia por el fabricante⁴².

El grado de daño del ADN se considera un biomarcador de proceso carcinogénico y este es investigado en estudios de población utilizando células obtenidas

⁴¹ WESTPHALEN, GH, *et al.* In vivo determination of genotoxicity induced by metals from orthodontic appliances using micronucleus and comet assays. En: Genet Mol Res. 2008, vol. 7, no. 4, p. 1259-1266.

⁴² HAFEZ, HEND SALAH, *et al.* Cytotoxicity, genotoxicity, and metal release in patients with fixed orthodontic appliances: a longitudinal in-vivo study. En: American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics. 2011, vol. 140, no. 3, p. 298-308.

fácilmente, como las de la mucosa bucal, para evaluar la genotoxicidad; siendo un método eficaz y menos invasivo para la medición del daño del DNA⁴³.

Siendo el ensayo de micronúcleos en células bucales exfoliadas una técnica innovadora de genotoxicidad, importante para el estudio e identificación de las aberraciones cromosomales y efectos genotóxicos que pueden causar la aparatología ortodóncica fija, en este estudio, se identificaron estas anomalías a través de esta técnica, debido a la facilidad relativa de puntuación, costos limitados, el tiempo necesario y la precisión obtenida de anotar un gran número de células.

Westphalen y colaboradores (2008)⁴⁴ realizaron un estudio *in vivo* donde determinaron la genotoxicidad inducida por metales contenidos en los aparatos de ortodoncia a través de la determinación de la presencia de micronúcleos y concluyeron que el nivel de daño en el DNA fue baja antes del comienzo del tratamiento con aparatología ortodoncia y durante los diez días después de la colocación de la aparatología ortodóncica; pero hubo un aumento significativo en la frecuencia de micronúcleos treinta días después del comienzo del tratamiento. Sin embargo sugirieron que otras investigaciones eran necesarias con el fin de evaluar el potencial genotóxico de los aparatos ortodóncicos fijos asociados a los estudios a largo plazo sobre estos efectos en los pacientes de ortodoncia.

⁴³ BORTHAKUR, GAYATRI, *et al.* Exfoliated buccal mucosa cells as a source of DNA to study oxidative stress. En: Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention. 2008, vol. 17, no. 1, p. 212-219.

⁴⁴ WESTPHALEN, GH, *et al. op. cit.* P. 1263.

Dichos resultados tienen concordancia con el estudio de Hafez y colaboradores (2011)⁴⁵, quienes en un estudio *in vivo* longitudinal analizaron la citotoxicidad, genotoxicidad, y la liberación de metales en pacientes con aparatos ortodóncicos fijos, en cual concluyeron que las células de la mucosa bucal de los pacientes tratados con aparatos ortodóncicos fijos durante 6 meses mostraron aumentos significativos en el contenido de níquel y cromo con una disminución significativa en la viabilidad y daños en el ADN cuando se compararon estos resultados con los de el grupo de control, los cambios fueron significativos sólo para el contenido de cromo celular y daño en el ADN en 3 meses. Esto podría implicar la recuperación de la primera debido a la tolerancia o la reparación celular y el ADN.

De igual manera, Natarajan y colaboradores (2011)⁴⁶ ultimaron que las células de la mucosa oral mostraron daño genotóxico en pacientes sanos sometidos a un tratamiento de ortodoncia evidenciado por la mayor frecuencia de MN y que estos cambios genotóxicos disminuyeron significativamente en el plazo de un mes después de la eliminación del aparato fijo, sin diferencias significativas entre el grupo experimental y los grupos de control. Por ende, las aleaciones de níquel y cromo en los aparatos de ortodoncias emiten iones metálicos en cantidades suficientes para inducir efectos genotóxicos localizados, los cuales revierten con la eliminación de los mismos⁴⁷.

⁴⁵ HAFEZ, HEND SALAH, *et al. op. cit.* P. 307

⁴⁶

⁴⁷ NATARAJAN, MADHUMITHA, *et al. op. cit.* P. 383

Los resultados anteriores difieren de los encontrados en el estudio de Angelieri y colaboradores (2011)⁴⁸, quienes realizaron un biomonitoreo de la masa hereditaria y citotoxicidad en pacientes sometidos a terapia de ortodoncia fija evaluando el daño del DNA con la determinación de micronúcleos u otras aberraciones cromosomales presentes en células exfoliadas de la mucosa bucal de los adultos después de la terapia de ortodoncia fija. Los resultados indicaron que no hubo diferencias estadísticamente significativas de células de la mucosa bucal micronucleadas. De la misma manera, la terapia de ortodoncia no fue capaz de aumentar otras aberraciones cromosomales estrechamente relacionados con la citotoxicidad como cariorrexis, picnosis y cariólisis. En resumen, estos datos indicaron que el tratamiento de ortodoncia puede no ser un factor que induce daño cromosómico, ni es capaz de promover la citotoxicidad.

En este estudio, se eligió examinar células de mucosa oral en pacientes con tratamiento ortodóncico fijo con un mínimo de 18 meses, en el caso de el grupo expuesto y para el grupo no expuesto, pacientes que nunca hayan recibido tratamiento ortodóncico fijo evaluando los cambios genotóxicos inducidos por este tipo de aparatología comparándolos con el segundo grupo.

La determinación de micronúcleos u otras aberraciones cromosomales se llevó a cabo a través de tinción May–Grunwald Giemsa usada por Kashyap & Reddy

⁴⁸ ANGELIERI, F., *et al. op. cit.* P. 403

(2012)⁴⁹, ya que nos permitió ver e identificar las células fácilmente. La fijación de las muestras se realizó con calor a través de un mechero de laboratorio ya que al realizarla con metanol destruía gran cantidad de células lo que nos dificultaba su localización y conteo para hallar frecuencia de MN.

Los criterios propuestos para la identificación de éstos fueron: un perímetro redondeado suave lo que sugiere una membrana; menos de un tercio del diámetro de la asociada núcleo, pero lo suficientemente grande como para discernir la forma y color, intensidad de la tinción similar a la del núcleo; textura similar a la del núcleo; el mismo plano focal que el núcleo⁵⁰.

En el presente estudio, se observó una diferencia significativa en el conteo de MN, siendo mayor para el grupo expuesto en relación con el grupo no expuesto, por lo que el uso de aparatología ortodóncica fija se asoció con la presencia de micronúcleos en células de mucosa oral expuestas a la misma.

Sin embargo, los resultados del presente estudio al ser obtenidos con un total de 10 muestras, se sugiere aumentar el número de éstas para ambos grupos, con el fin de obtener resultados significativos.

⁴⁹ KASHYAP, BINA, REDDY, PADALA SRIDHAR. Micronuclei assay of exfoliated oral buccal cells: Means to assess the nuclear abnormalities in different diseases. En: Journal of Cancer Research and Therapeutics. 2012, vol. 8, no. 2, p. 184-191

⁵⁰ KASHYAP, BINA, REDDY, PADALA SRIDHAR. *op.cit.* P.188

8. CONCLUSIÓN

A partir de los hallazgos obtenidos se concluye que el uso de aparatología ortodónica fija puede inducir daño genotóxico caracterizado por la aparición de micronúcleos en células epiteliales de la cavidad oral. Sin embargo, estos resultados son preliminares y por lo tanto es necesario aumentar el número de muestras para ambos grupos.

RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar la fijación de las muestras con calor mediante mechero de laboratorio, ya que al realizarlas con metanol, éste provocó la eliminación de gran cantidad de células, lo cual disminuyó la muestra a analizar.

BIBLIOGRAFÍA

AĞAOĞLU, GÜNSELI, et al. Nickel and chromium levels in the saliva and serum of patients with fixed orthodontic appliances. En: The Angle Orthodontist. 2001, vol. 71, no. 5, p. 375-379.

ANGELIERI, F., CARLIN, V., MARTINS, R.A. y RIBEIRO, D.A.. Biomonitoring of mutagenicity and cytotoxicity in patients undergoing fixed orthodontic therapy. En: Am J Orthod Dentofacial Orthop., Abril, 2011. Vol. 139, No. 4, p. 399-404.

ÁVALOS, J., RODRÍGUEZ, E. y CASASA, R. Lesiones fáticas por tratamiento ortódontico. En: Virtual Journal of orthodontics, Noviembre, 2004. Vol. 6, No. 3, p. 49-54.

BAKHOUM, S.F., GENOVESE, G. y COMPTON, D.A. Deviant kinetochore microtubule dynamics underlie chromosomal instability. En: Curr Biol., Diciembre, 2009. Vol. 19, No. 22, p. 937-942.

BETTEGA, D., CALZOLARI, P., DONEDA, L., BELLONI, F., TALLONE, L. y REDPATH, J.L. Differential effectiveness of solar UVB subcomponents in causing cell death, oncogenic transformation and micronucleus induction in human hybrid cells. En: Int J Radiat Biol., Marzo, 2003. Vol. 79, No. 3, p. 211-216.

BONASSI, STEFANO, et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. En: Carcinogenesis. 2006, vol. 28, no. 3, p. 625-631.

BORTHAKUR, GAYATRI, et al. Exfoliated buccal mucosa cells as a source of DNA to study oxidative stress. En: Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention. 2008, vol. 17 no. 1, p. 212-219.

BULL, C. y FENECH, M. Genome-health nutrigenomics and nutrigenetics: nutritional requirements or 'nutriomes' for chromosomal stability and telomere maintenance at the individual level. En: Proc Nutr Soc., Mayo, 2008. Vol. 67, No. 2, p. 146-56.

BLOCHING, MARC, et al. Micronucleus rate of buccal mucosal epithelial cells in relation to oral hygiene and dental factors. En: Oral oncology. 2008, vol. 44, no. 3, p. 220-226.

CHATTERJEE, SUMANA, et al. Cytogenetic monitoring in human oral cancers and other oral pathology: the micronucleus test in exfoliated buccal cells. En: Toxicology mechanisms and methods. 2009, vol. 19, no. 6-7, p. 427-433.

DÍAZ CABALLERO, A, et al. Presencia de micronúcleos en células epiteliales de encías, como marcador de inestabilidad cromosomal: Revisión sistemática. En: Avances en Odontoestomatología. 2013, vol. 29, no. 2, p. 95-102.

DONMEZ-ALTUNTAS, H.y BITGEN, N. Evaluation of the genotoxicity and cytotoxicity in the general population in Turkey by use of the cytokinesis-block micronucleus cytome assay. En: Mutat Res. Oct 9, 2012, vol. 748, no. 1-2, p. 1-7.

DUAN, H., et al. Biomarkers measured by cytokinesis-block micronucleus cytome assay for evaluating genetic damages induced by polycyclic aromatic hydrocarbons. En: Mutat Res. Jun-Jul, 2009, vol. 677, no. 1-2, p. 93-99.

FENECH, M., KIRSCH-VOLDERS, M., NATARAJAN, A.T., SURRALLES, J., CROTT, J.W., PARRY, J., NORPPA, H., EASTMOND, D.A., TUCKER, J.D. y THOMAS, P. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. En: Mutagenesis, Junio, 2011. Vol. 26, No. 1, p. 125-32.

FENECH, M. The lymphocyte cytokinesis-block micronucleus cytome assay and its application in radiation biodosimetry. En: Health Phys., Febrero, 2010. Vol. 98, No. 2, p. 234-43.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. En: Nat Protoc., 2007. Vol. 2, No. 5, p. 1084-1104.

FENECH, M., BAGHURST, P., LUDERER, W., TURNER, J., RECORD, S., CEPPI, M. y BONASSI, S. Low intake of calcium, folate, nicotinic acid, vitamin E, retinol,

beta-carotene and high intake of pantothenic acid, biotin and riboflavin are significantly associated with increased genome instability--results from a dietary intake and micronucleus index survey in South Australia. En: Carcinogenesis, Mayo, 2005. Vol. 26, No. 5, p. 991-999.

FENECH, M. In vitro micronucleus technique to predict chemosensitivity. En: Methods Mol Med., Mayo 2005. Vol. 111, p. 3-32.

FENECH, M. Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. En: Drug Discov Today, Noviembre, 2002. Vol. 7, No. 22, p. 1128-1137.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. En: Mutat Res., Noviembre, 2000. Vol. 455, No. 1-2, p. 81-95.

GAJSKI, G., et al. Cytogenetic status of healthy children assessed with the alkaline comet assay and the cytokinesis-block micronucleus cytome assay. En: Mutat Res. Jan 20, 2013, vol. 750, no. 1-2, p. 55-62.

GAJSKI, G., et al. Application of dosimetry systems and cytogenetic status of the child population exposed to diagnostic X-rays by use of the cytokinesis-block micronucleus cytome assay. En: J Appl Toxicol. Oct, 2011, vol. 31, no. 7, p. 608-617.

GHANAYEM, B.I., WITT, K.L., EL-HADRI, L., HOFFLER, U., KISSLING, G.E., SHELBY, M.D. y BISHOP, J.B. Comparison of germ cell mutagenicity in male CYP2E1-null and wild-type mice treated with acrylamide: evidence supporting a glycidamide-mediated effect. En: Biol Reprod., Septiembre, 2005. Vol. 72, No. 1, p. 157-63.

GISSELSSON, D. Classification of chromosome segregation errors in cancer. Chromosoma, Diciembre, 2008. Vol. 117, No. 6, p. 511-519.

GONZALEZ, N. V., et al. A combination of the cytokinesis-block micronucleus cytome assay and centromeric identification for evaluation of the genotoxicity of dicamba. En: Toxicol Lett. Dec 15, 2011, vol. 207, no. 3, p. 204-212.

GURSOY, ULVI KAHRAMAN, et al. The role of nickel accumulation and epithelial cell proliferation in orthodontic treatment-induced gingival overgrowth. En: The European Journal of Orthodontics. 2007, vol. 29, no. 6, p. 555-558.

HAFEZ, H.S., SELIM, E.M., KAMEL, F.H., TAWFIK, W.A. Y AL-ASHKAR, E.A. y MOSTAFA, Y.A. Cytotoxicity, genotoxicity, and metal release in patients with fixed orthodontic appliances: a longitudinal in-vivo study. En: J. Orthod Dentofacial Orthop., Septiembre, 2011. Vol. 140, No. 3, p. 298-308.

HOLLAND, N., BOLOGNESI, C., KIRSCH-VOLDERS, M., BONASSI, S., ZEIGER, E., KNASMUELLER, S. y FENECH, M. The micronucleus assay in human buccal

cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. En: *Mutat Res.*, Julio-Agosto, 2008. Vol. 659, No. 1-2, p. 93-108.

JACOBIUNAS, L. V., et al. Artichoke induces genetic toxicity in the cytokinesis-block micronucleus (CBMN) cytome assay. En: *Food Chem Toxicol.* May, 2013, vol. 55, p. 56-59.

KASHYAP, B. y REDDY, P.S. Micronuclei assay of exfoliated oral buccal cells: means to assess the nuclear abnormalities in different diseases. En: *J Cancer Res Ther.*, Abril, 2012. Vol. 8, No 2, p. 184-91.

LU, Y. Z., et al. [Progress in study and application of cytokinesis-block micronucleus cytome assay]. En: *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi.* Sep, 2008, vol. 26, no. 9, p. 563-566.

MAES, A., et al. Testing chemical agents with the cytokinesis-block micronucleus cytome assay. En: *Folia Biol (Praha).* 2012, vol. 58, no. 5, p. 215-220.

MAJER, BJ, *et al.* 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. En: *Mutation Research/Reviews in Mutation Research.* 2001, vol. 489, no. 2, p. 147-172.

MARCHETTI, F., ROWAN-CARROLL, A., WILLIAMS, A., POLYZOS, A., BERNDT-WEIS, M.L. y YAUK, C.L. Sidestream tobacco smoke is a male germ cell mutagen. En: Proc Natl Acad Sci., Julio, 2011. Vol. 108, No. 31, p. 12811-21814.

MORETTI, M., BONFIGLIOLI, R., FERETTI, D., PAVANELLO, S., MUSSI, F., GROLLINO, M.G., VILLARINI, M., BARBIERI, A., CERETTI, E., CARRIERI, M., BUSCHINI, A., APPOLLONI, M., DOMINICI, L., SABATINI, L., GELATTI, U., BARTOLUCCI, G.B., POLI, P., STRONATI, L., MASTRANGELO, G. y MONARCA, S. A study protocol for the evaluation of occupational mutagenic/carcinogenic risks in subjects exposed to antineoplastic drugs: a multicentric project. En: BMC Public Health., Abril, 2011. Vol. 11, No. 195, 10 p.

NATARAJAN, M., PADMANABHAN, S., CHITHARANJAN, A. y NARASIMHAN, M. Evaluation of the genotoxic effects of fixed appliances on oral mucosal cells and the relationship to nickel and chromium concentrations: An in-vivo study. En: J. Orthod Dentofacial Orthop., Septiembre, 2011. Vol. 140, No. 3, p. 383-388.

NORPPA, H. y FALCK, G.C. What do human micronuclei contain? En: Mutagenesis, Mayo, 2003. Vol. 18, No. 3, p. 221-233.

PAMPALONA, J., SOLER, D., GENESCA, A. y TUSELL, L. Whole chromosome loss is promoted by telomere dysfunction in primary cells. Genes Chromosomes Cancer, Abril, 2010. Vol. 49, No. 4, p. 368-378.

RICKES, L.N., ALVARENGO, M.C., SOUZA, T.M., GARCIAS, G.L. y MARTINO-ROTH, M.G. Increased micronucleus frequency in exfoliated cells of the buccal mucosa in hairdressers. En: Genet Mol Res., Noviembre, 2010. Vol. 9, No. 3, p. 1921-1928.

ROCCO, L., PELUSO, C. y STINGO, V. Micronucleus test and comet assay for the evaluation of zebrafish genomic damage induced by erythromycin and lincomycin. En: Environ Toxicol., Marzo, 2011. Vol. 27, No. 10, p. 598-604.

RODRIGUEZ, JOSÉ VICTOR AVALOS. Lesiones fáticas por tratamiento ortodóntico. En: Virtual Journal of Orthodontics [serial online]. 2004, vol. 6, no. 3, p. 49-54.

ROTH, J.M., RESTANI, R.G., GONCALVES, T.T., SPHOR, S.L., NESS, A.B., MARTINO-ROTH, M.G. y GARCIAS, G.L. Genotoxicity evaluation in chronic renal patients undergoing hemodialysis and peritoneal dialysis, using the micronucleus test. En: Genet Mol Res., Mayo, 2008. Vol. 7, No. 2, p. 433-443.

SAUNDERS, W.S., SHUSTER, M., HUANG, X., GHARAIBEH, B., ENYENIHI, A.H., PETERSEN, I. y GOLLIN, S. Chromosomal instability and cytoskeletal defects in oral cancer cells. En: Proc Natl Acad Sci., Enero, 2000. Vol. 97, No. 1, p. 303-308.

SELLAPPA, S., BALAKRISHNAN, M., RAMAN, S., PALANISAMY, S. Induction of micronuclei in buccal mucosa on chewing a mixture of betel leaf, areca nut and tobacco. *J Oral Sci.*, Junio, 2009. Vol. 51, No. 2, p. 289-292.

SPIVACK, S.D., HURTEAU, G.J., JAIN, R., KUMAR, S.V., ALDOUS, K.M., GIERTHY, J.F. y KAMINSKY, L.S. Gene-environment interaction signatures by quantitative mRNA profiling in exfoliated buccal mucosal cells. En: *Cancer Res.*, Septiembre, 2004. Vol. 64, No. 18, p. 6805-6813.

STICH, H.F. Y ROSIN, M.P. Micronuclei in exfoliated human cells as a tool for studies in cancer risk and cancer intervention. En: *Cancer Lett.*, Abril, 1984. Vol. 22, No. 3, p. 241-253.

TEO, T.y FENECH, M. The interactive effect of alcohol and folic acid on genome stability in human WIL2-NS cells measured using the cytokinesis-block micronucleus cytome assay. En: *Mutat Res.* Nov 17, 2008, vol. 657, no. 1, p. 32-38.

THOMAS, P.y FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay in lymphocytes. En: *Methods Mol Biol.* 2011, vol. 682, p. 217-234.

THOMAS, PHILIP, et al. Buccal micronucleus cytome assay. En: *Nat Protoc.* 2009, vol. 4, no. 6, p. 825-837.

TITENKO-HOLLAND, N., MOORE, L.E. y SMITH, M.T. Measurement and characterization of micronuclei in exfoliated human cells by fluorescence in situ hybridization with a centromeric probe. En: Mutat Res., Febrero, 1994. Vol. 312, No. 1, p. 39-50.

VAN SCHOOTEN, F.J., BESARATINIA, A., DE FLORA, S., D'AGOSTINI, F., IZZOTTI, A., CAMOIRANO, A., BALM, A.J., DALLINGA, J.W., BAST, A., HAENEN, G.R., VAN'T VEER, L., BAAS, P., SAKAI, H. y VAN ZANDWIJK, N. Effects of oral administration of N-acetyl-L-cysteine: a multi-biomarker study in smokers. En: Cancer Epidemiol Biomarkers Prev., Febrero, 2002. Vol. 11, No. 2, p. 167-75.

VONDRACEK, M., XI, Z., LARSSON, P., BAKER, V., MACE, K., PFEIFER A., TJÄLVE, H., DONATO, M.T., GOMEZ-LECHON, M.J. y GRAFSTRÖM, R.C. Cytochrome P450 expression and related metabolism in human buccal mucosa. En: Carcinogenesis, Marzo, 2001. Vol. 22, No. 3, p. 481-488.

WU, J., et al. The effect of selenium, as selenomethionine, on genome stability and cytotoxicity in human lymphocytes measured using the cytokinesis-block micronucleus cytome assay. En: Mutagenesis. May, 2009, vol. 24, no. 3, p. 225-232.

ANEXOS

Anexo 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, _____, identificado tal como aparece al pie de mi firma, expreso mi consentimiento para participar en el proyecto de investigación denominado 'PRESENCIA DE MICRONÚCLEOS EN MUCOSA ORAL DE PACIENTES CON APARATOLOGÍA ORTODÓNICA ATENDIDOS EN CLÍNICA ODONTOLÓGICA DE LA UNIVERSIDAD DE CARTAGENA" dado que he recibido toda la información necesaria por parte del suscrito investigador, de lo que incluiré el mismo y que tuve la oportunidad de formular todas las preguntas necesarias para mi entendimiento, las cuales fueron respondidas con claridad y profundidad, donde además se me explicó que el estudio a realizar no implica riesgo para mi persona ya que se limita a un frotis.

Dejo constancia que mi participación es voluntaria y que puedo dejar de participar en el momento que yo lo decida.

Firma del participante

CC:

Dr. Antonio Díaz

Testigo #1

CC:

Testigo #2

CC:

Anexo 2. FORMATO PARA LOS CRITERIOS DE SELECCIÓN

Nombre _____ Sexo : _____ CC: _____

Edad _____ Dirección _____ Estrato _____ Teléfono _____

Actualmente padece alguna enfermedad sistémica? SI () NO ()

Cuál? _____

Le han realizado radiografía de cabeza o cuello en los últimos 3 meses? SI () NO ()

Ha sufrido alguna infección bacteriana o viral en la cavidad oral o a nivel respiratorio en los últimos tres meses?

SI () NO () Cuál? _____

Fuma? SI () NO () Invertido () Normal ()

Frecuencia: diaria () semanal () mensual ()

Cantidad: _____

Ingiere bebidas alcohólicas? SI () NO ()

Frecuencia: diaria () semanal () mensual ()

Cantidad: _____

Usa crema dental? SI () NO ()

Frecuencia: diariamente () Marca: _____

Usa enjuague bucal? SI () NO ()

Frecuencia: diaria () semanal () Cantidad: _____ Marca: _____

Si es seleccionado, está usted dispuesto a participar en el estudio?

SI () NO ()

ACEPTADO SI NO

Nombre del examinador

Anexo 3. INSTRUMENTO DE IDENTIFICACIÓN DE MICRONÚCLEOS

OBJETIVO: establecer los niveles de daño del DNA en células de la mucosa oral de pacientes con lesiones reactivas asociadas a aparatología ortodóncica.

INSTRUCTIVO: indique con un símbolo (I) la frecuencia hallada para cada ítem y debajo los totales.

MonoN	BiN	Picnosis	Cariólisis	Cariorexis	Necrosis

Frecuencia celular

Frecuencia de Micronúcleos

MonoN	BiN		
	1 Mn	2 Mn	≥ 3 Mn

EXAMINADOR: _____

Anexo 4. TABLA MATRÍZ

PACIENTE	GRUPO	EDAD	SEXO	MONOMN	CANT MONOMN	BINUMN	CANTMNBIN1	BINMN2	CANTMNBIN2	BINMN3	CANTMNBIN3
1	0	24	0	1	25	0	0	0	0	0	1
2	0	13	1	1	11	0	0	1	2	1	3
3	0	23	0	1	25	0	0	0	0	0	0
4	0	24	0	1	25	1	1	0	0	0	0
5	0	23	1	1	7	1	1	0	0	0	0
6	1	24	1	1	2	0	0	0	0	0	0
7	1	22	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	1	23	1	0	0	0	0	0	0	0	0
9	1	18	1	0	0	0	0	0	0	0	0
10	1	23	1	0	0	0	0	0	0	0	0