



## Efecto genotóxico del níquel en células de la mucosa bucal de pacientes con tratamiento de ortodoncia (*In vitro*)

M. G. Zapata Moreno<sup>a</sup>, C. Hernández Morales<sup>b</sup>, J. A. Meza Velázquez<sup>c</sup>, J. G. Rodríguez González<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Coahuila, jrgg\_o@hotmail.com

<sup>b</sup> Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de Coahuila, cehm@yahoo.com

<sup>c</sup> Facultad de Ciencias Químicas, UJED, jameza20002000@yahoo.com.mx

### RESUMEN

Existe evidencia de que el níquel libera iones en el medio bucal, con la posible generación de daño al ADN en células bucales. La exposición al Ni (II) puede conducir a la fragmentación significativa del ADN y a la muerte celular. El objetivo fue evaluar el efecto genotóxico del níquel procedente de aparatos fijos de ortodoncia utilizando ensayo de micronúcleos y determinación de níquel en saliva por absorción atómica. Se estudiaron 40 pacientes, 20 con brackets de aleación de Níquel-Titanio (Ni-Ti) y 20 con aleación de acero inoxidable, a los cuales se les tomó una muestra de la pared interna bucal para el ensayo de micronúcleos y se determinó la concentración de Ni(II) en saliva, a los tiempos de 0 y 6 meses de tratamiento. Los resultados no muestran una diferencia significativa en la concentración de níquel a los tiempos estudiados y en los diferentes tipos de materiales con que están elaborados los brackets. Sin embargo, en cuanto a la genotoxicidad en las células se encontró una diferencia significativa en la toma 0 y la toma de 6 meses, considerando a las células con micronúcleos y en apoptosis que son las que no se regeneran naturalmente en el organismo. Lo anterior indica que el tratamiento de ortodoncia, a los tiempos estudiados, no es una amenaza para el cuerpo humano en cuanto a la liberación de iones níquel, sin embargo se recomienda tener precaución porque en el medio bucal sí causa alteración genética en las células.

### 1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, la integridad genética de la población humana se ha visto comprometida por la exposición a productos químicos y agentes genotóxicos, generados por la gran actividad industrial<sup>1,6</sup>, por lo que en la actualidad es de gran importancia realizar ensayos de genotoxicidad de manera rutinaria y monitorizar aquellos individuos que, por su ocupación laboral o estilo de vida, se encuentran con mayor riesgo de sufrir alteraciones capaces de modificar su estabilidad genética<sup>1</sup>. Para analizar este efecto se desarrolló el ensayo citogenético de micronúcleos, capaz de detectar indirectamente la rotura o pérdida cromosómica *in vitro* para conocer el efecto genotóxico de agentes ambientales, así como del ámbito sanitario por la utilización de nuevas drogas citostáticas en tratamientos antitumorales y del uso de biomateriales en los tratamientos de ortodoncia<sup>7</sup>. Un biomaterial es un material aplicado, por indicación médica, que se encuentra en contacto con los tejidos humanos ya sea en forma temporal o permanente<sup>10</sup>.

En Odontología los biomateriales utilizados pueden ser cerámicos, poliméricos o metálicos, entre los metálicos los más comunes son aquellos formados por aleaciones. De las aleaciones con níquel, fundamentalmente pueden diferenciarse los siguientes tipos: aleaciones *níquel-cromo* para prótesis fija (técnicas ceramometálicas) donde el níquel está presente en proporciones altas, *aceros inoxidables* para aparatos de ortodoncia convencionales fijos o removibles donde el níquel está presente en proporciones muy bajas, y nuevas aleaciones *Níquel-Titanio* (Ni-Ti), súper elásticas, con memoria de forma, con níquel presente en proporciones intermedias. El daño genético por exposición a aleaciones con Níquel puede conllevar a la manifestación de eventos



genotóxicos y citotóxicos en las células epiteliales, que constituyen la primera barrera frente a agentes carcinogénicos por vía digestiva e inhalatoria. Algunos de los eventos genotóxicos o aberraciones más frecuentes son las células binucleadas (BN), los micronúcleos (MN), yemas nucleares (NBUD) y puentes nucleoplasmáticos (NPB) o dicéntricos, mientras que los derivados de fenómenos citotóxicos conllevan a muerte celular como en el caso de apoptosis, kariólisis, picnólisis y necrosis<sup>6</sup>.

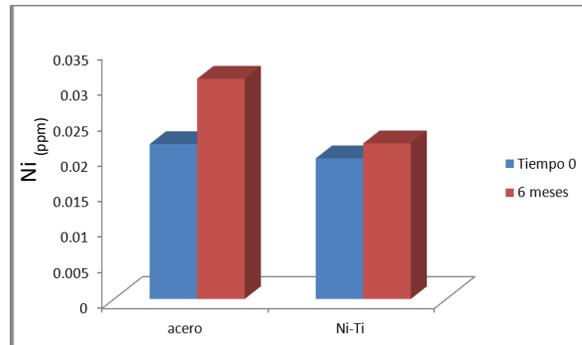
La prueba de micronúcleos está validada internacionalmente como bioensayo para evaluar genotoxicidad de sustancias, por exposiciones ambientales y ocupacionales, y es una de las más usadas para identificar agentes cancerígenos<sup>4</sup>. Los micronúcleos son fragmentos de cromosomas o cromosomas completos que quedan fuera del núcleo en la mitosis, su presencia se traduce en el ámbito celular como una pérdida de ADN, esta técnica es entonces una alternativa muy eficaz para el monitoreo de genotóxicos de manera fácil, sencilla, rápida y con resultados contundentes<sup>3</sup>. Esta información es fundamental para determinar el riesgo a padecer cáncer u otras alteraciones en poblaciones expuestas a metales pesados por tratamientos odontológicos, por lo que en el presente trabajo de investigación se evaluó el efecto genotóxico del níquel en células epiteliales de la mucosa bucal por la técnica de micronúcleos, monitoreo que permitirá obtener estimaciones de alteraciones en su material genético.

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

Se estudiaron 40 pacientes de la clínica de la Facultad de Odontología, UA de C, en Torreón, Coah., con edades entre 13 y 20 años, no fumadores, y se verificó que no presentaran ningún tipo de enfermedad crónica degenerativa y/o alguna otra prótesis bucal, 20 pacientes con brackets Ni-Ti y 20 pacientes con brackets acero inoxidable. Las muestras se tomaron por duplicado a los 0 y 6 meses. Para la determinación de níquel, se tomaron muestras de saliva directamente del paciente en un recipiente estéril. La muestra se calcinó a 420°C durante 7 horas; a las cenizas se les agregó ácido nítrico al 50% y se evaporó a 150°C; sometió nuevamente a 400°C por 30 minutos y finalmente se diluyó con 5 ml de ácido nítrico al 5%.<sup>2</sup> Para el análisis por Absorción Atómica, se agregó a la muestra tratada un modificador de matriz compuesto de Nitrato de Magnesio y Nitrato de Paladio 1:1, se inyectó la mezcla en el tubo de horno de grafito y se tomó la lectura a una longitud de onda de 232 nm. Ensayo de micronúcleos. La cuantificación de micronúcleos, se realizó obteniendo una muestra por raspado de la pared interna de cada mejilla con un hisopo, que se introdujo en una solución buffer de fosfatos pH 7.0, agitando para liberar las células epiteliales de la mucosa bucal. Se centrifugó durante 15 min a 3000 rpm a temperatura ambiente, el sobrenadante se desechó, y se realizó un lavado a las células epiteliales con buffer de fosfatos pH 7.0, centrifugando bajo las mismas condiciones. El paquete celular obtenido se mezcló con dimetil sulfóxido (DMSO). Para el análisis microscópico, la muestra con DMSO se dejó secar en un portaobjetos por 24 horas a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo se sumergió en metanol al 80% y se almacenó a -4°C durante 20 minutos. La tinción de la muestra se efectuó con colorante de Giemsa al 4%, durante 10 minutos<sup>9</sup>.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al analizar las muestras de saliva por absorción atómica, se observó que las concentraciones de níquel en los pacientes con brackets de Ni-Ti fueron más bajas comparadas con las concentraciones de níquel en pacientes con brackets de acero inoxidable en los dos tiempos estudiados (Gráfica 1). Sin embargo el análisis de varianza arroja que no existe diferencia significativa entre los tiempos probados y el material con que están hechos dicho brackets. Estos resultados coinciden con lo reportado por Weinhold Elkis (2010), quien además menciona que este nivel de concentración de níquel no es dañino para el organismo<sup>5</sup>.



Grafica 1. Comparación de la cantidad de níquel encontrada en muestras de saliva a los diferentes tiempos y materiales probados.

### Ensayo de Micronucleos

En la muestra tomada por medio del raspado interno a los 6 meses de exposición, se observó la presencia de diferentes malformaciones genéticas como células binucleadas, mononucleadas, con puente nucleoplásmico (fig. 1), en apoptosis y con micronúcleos (fig. 2). La mayor parte de este daño celular puede ser restaurado de una manera natural por el cuerpo humano excepto las células con micronúcleos y en apoptosis<sup>6</sup>, las cuales cuando se encuentran en exceso pueden producir una metástasis en el medio bucal, por este motivo nos enfocamos a este tipo de células.

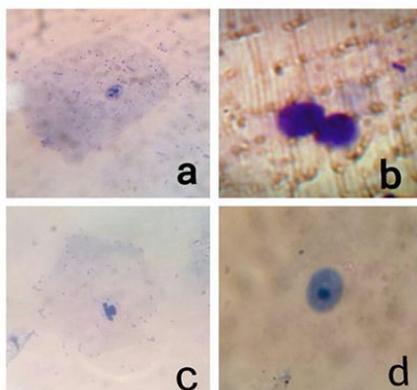


Figura 1. Célula en apoptosis (a), célula binucleada (b), célula con núcleo fragmentado (c) y célula mononucleada (d)

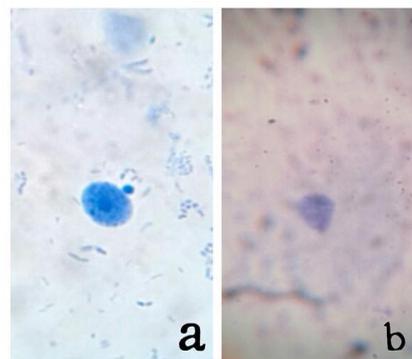


Figura 2. Célula epitelial de la mucosa bucal con micronúcleos (a), célula epitelial de la mucosa bucal sana (b)

La diferencia entre los tiempos 0 y 6 meses con tratamiento en células dañadas contando solamente los micronúcleos y las células apoptóticas, nos indican que no hubo diferencia estadística entre las aleaciones de acero inoxidable y de Ni-Ti, sin embargo si existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) referente al tiempo de exposición, esto indica que la proliferación de células dañadas genéticamente está directamente relacionada con el tiempo<sup>8</sup>.



#### 4. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio no se encontró un incremento significativo en la concentración de níquel a los seis meses de tratamiento tanto en brackets de níquel-titanio, como los de acero inoxidable.

En cuanto a la genotoxicidad de las células se encontró una diferencia significativa entre los tiempos de tratamiento, considerando a las células con micronúcleos y en apoptosis que son las que no se regeneran naturalmente en el organismo. Se establece que hasta los 6 meses de tratamiento los niveles de células están dentro del rango no dañino para la salud, pero es importante considerar que el tratamiento de ortodoncia tiene una duración promedio de 2 años.

Estos resultados preliminares indican que el tratamiento de ortodoncia no presenta algún tipo de amenaza al cuerpo humano en cuanto a la liberación de iones níquel, sin embargo es necesario realizar estudios a tiempos mas prolongados por la alteración genética que se observó en las células del medio bucal.

#### 5. BIBLIOGRAFÍA

1. A. Domínguez Odio, E. I. Rojas Vázquez, I. García Lázaro, Jose C. Rodríguez Tito, A. Pérez, "Lesiones genéticas y citológicas inducidas por la exposición a químicos en centros de trabajo" Salud de los trabajadores. Vol. 14, 1, 2006, pp 51-59
2. B. Marinka, M. S. Marinka, A. Stanimirović, B. Maja, K. Josipa, L. Božana, A. Andabak, D. Baričević, "Salivary Concentrations of Nickel and Chromium in Patients with Burning Mouth Syndrome" Acta Dermatovenerol Croat 2010. 2011;19 (1):2-5.
3. Belinda C. Gómez Meda y Guillermo M. Zúñiga González, "Genotoxicidad y potencial teratígeno" Revista de divulgación científica y tecnológica de la universidad veracruzana. Vol. XX N. 3, 2007
4. E. Castillo, Maria L. Guevara-Fujita y R. Fujita, "Optimización del test de micronúcleos en linfocitos cultivados usando una metodología de gradientes y frotis" Rev. peru. biol. 18(2): 261 - 263 Agosto 2011. ISSN 1561-0837
5. E. Weinhold, "Liberación de iones metálicos en el medio bucal por fenómenos de corrosión de aleaciones" Departamento de Materiales Dentales, Universidad de los Andes. 2010.
6. Isidro A. Tejedor Cassiani, "Biomonitoreo de células bucales a partir de micronúcleos en soldadores de metales en Cartagena" Tesis doctorado, Universidad Nacional de Colombia, 2011
7. M. Zalacain, L. Sierrasésúмага, A. Patiño, "El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos" An. Sist. Sanit. Navar. 2005, Vol. 28, N° 2, mayo-agosto
8. N. Holland, D. Bolognesi, M. Kirsch-Volders, S. Bonassi, E. Zeiger, S. Knasmueller, M. Fenech 2008. "The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps" Mutation Research/Reviews in Mutation Research, pp. 93-108. Published by Elsevier B.V. 2008
9. O. Torres-Bugarín, M. Gpe. Zavala-Cerna, N. Macriz-Romero, A. Flores-García, M. Luisa Ramos-Ibarra, "Procedimientos básicos de la prueba de micronúcleos y anomalías nucleares en células exfoliadas de mucosa oral" El Residente, Vol. 8,1, pp. 4-11.
10. S. Barruso Gómez, "Modificación superficial de biomateriales metálicos (316 LVM y Ti6Al4V) mediante granallado, agua a alta presión y laser peening: efecto en la microestructura, las propiedades mecánicas y la liberación de iones" Tesis Doctorado, Universidad Complutense de Madrid, 2014.