



Universidad Autónoma del Estado de México  
Facultad de Odontología  
Centro de Investigación y Estudios Avanzados en  
Odontología  
“Dr. Keisaburo Miyata”  
Doctorado en Ciencias de la Salud

**“GENOTOXICIDAD, CITOTOXICIDAD Y  
DIFERENCIACIÓN ODONTOBLÁSTICA ASOCIADAS AL  
USO DE APARATOLOGÍA ORTODÓNICA FIJA:  
EVALUACIONES IN VITRO E IN VIVO”**

TESIS

Que para obtener el Grado de  
Doctor en Ciencias de la Salud

Presenta

M. en C.O. David Bautista Martínez

Director

Dr. en O. Rogelio J. Scougall Vilchis

Co-Director

Dra. en O. Rosalía Contreras Bulnes

Tutor

Dr. en C.S. René García Contreras

Toluca, Estado de México, agosto de 2024.



2022-2026

## ÍNDICE

<b>1. Resumen</b> .....	<b>5</b>
1.1. Fase 1.....	5
1.2. Fase 2.....	6
<b>2. Introducción</b> .....	<b>7</b>
<b>3. Antecedentes</b> .....	<b>9</b>
3.1. Resinas en ortodoncia .....	9
3.1.1. Matriz de resina orgánica .....	9
3.1.2. Relleno inorgánico.....	10
3.1.3. Agentes de acoplamiento .....	10
3.1.4. Grado de curado.....	11
3.1.5. Liberación de bisfenol-A .....	13
3.2. Genotoxicidad.....	14
3.2.1. Ensayo de micronúcleos (MN) .....	15
3.2.2. Anormalidades nucleares .....	16
3.3. Antioxidantes .....	18
3.3.1. Estrés oxidativo .....	19
3.3.2. Ácido fólico .....	20
3.3.3. Usos y eficacia .....	21
3.3.3.1. Defectos del tubo neural .....	21
3.3.3.2. Cáncer .....	22
3.3.3.3. Enfermedad cardíaca y accidente cerebrovascular .....	23
3.3.3.4. Demencia y función cognitiva.....	24
3.3.3.5. Depresión.....	24
<b>4. Planteamiento del problema</b> .....	<b>25</b>
<b>5. Justificación</b> .....	<b>27</b>
<b>6. Hipótesis</b> .....	<b>29</b>
6.1. Fase 1.....	29
6.1.1. Hipótesis de investigación (H <sub>1</sub> ).....	29
6.1.2. Hipótesis nula (H <sub>0</sub> ).....	29
<b>7. Objetivos</b> .....	<b>30</b>
7.1. Fase 1.....	30
7.1.1. Objetivo general .....	30

7.1.2. Objetivos específicos.....	30
<b>8. Materiales y métodos.....</b>	<b>31</b>
8.1. Fase 1.....	31
8.1.1. Diseño del estudio.....	31
8.1.2. Población y universo de estudio.....	31
8.1.3. Muestreo.....	31
8.1.4. Criterios de selección.....	32
8.1.4.1. Inclusión.....	32
8.1.4.2. Exclusión.....	32
8.1.4.3. Eliminación.....	32
8.1.5. Variables de estudio.....	33
8.1.5.1. Variables dependientes.....	33
8.1.5.2. Variables independientes.....	34
8.1.6. Procedimiento.....	35
8.1.6.1. Preparación de los discos de resina.....	35
8.1.6.2. Cultivos celulares.....	36
8.1.6.3. Obtención de los monómeros lixiviados.....	37
8.1.6.4. Ensayo de citotoxicidad MTT.....	37
8.1.6.5. Diferenciación odontoblástica.....	39
8.1.6.6. Resistencia al descementado (SBS).....	40
8.1.6.7. Índice adhesivo remanente (ARI).....	41
8.1.6.8. Evaluación de la microdureza.....	42
<b>9. Hipótesis.....</b>	<b>43</b>
9.1. Fase 2.....	43
9.1.1. Hipótesis de investigación ( $H_1$ ).....	43
9.1.2. Hipótesis nula ( $H_0$ ).....	43
<b>10. Objetivos.....</b>	<b>44</b>
10.1. Fase 2.....	44
10.1.1. Objetivo general.....	44
10.1.2. Objetivos específicos.....	44
<b>11. Materiales y métodos.....</b>	<b>45</b>
11.1. Fase 2.....	45
11.1.1. Diseño del estudio.....	45
11.1.2. Población y universo de estudio.....	45

11.1.3. Muestreo .....	45
11.1.4. Criterios de selección .....	45
11.1.4.1. Inclusión.....	45
11.1.4.2. Exclusión.....	46
11.1.4.3. Eliminación.....	46
11.1.5. Variables de estudio .....	47
11.1.5.1. Variables dependientes.....	47
11.1.5.2. Variables independientes .....	48
11.1.6. Procedimiento.....	49
11.1.6.1. Selección de los participantes.....	49
11.1.6.2. Genotoxicidad medida por el ensayo de micronúcleos (MN) en células orales exfoliadas .....	51
11.2. Consideraciones bioéticas.....	55
11.2.1. Fase 1 .....	55
11.2.2. Fase 2 .....	56
11.3. Análisis estadístico .....	57
11.3.1. Fase 1 .....	57
11.3.2. Fase 2 .....	57
<b>12. Resultados.....</b>	<b>58</b>
12.1. Primer artículo. Carta de aceptación .....	58
12.2. Segundo artículo. Carta de envío .....	58
<b>13. Discusión.....</b>	<b>59</b>
13.1. Fase 1.....	59
13.2. Fase 2.....	65
<b>14. Conclusiones .....</b>	<b>70</b>
14.1. Fase 1.....	70
14.2. Fase 2.....	70
<b>15. Referencias.....</b>	<b>71</b>
<b>16. Anexos.....</b>	<b>85</b>
16.1. Anexo 1. Consentimiento informado.....	85
16.2. Anexo 2. Asentimiento informado.....	87
16.3. Anexo 3. Cuestionario para pacientes .....	88
16.4. Anexo 4. Aviso de Privacidad UAEMex.....	89

## 1. Resumen

### 1.1. Fase 1

**Objetivo:** Determinar y comparar la citotoxicidad, la diferenciación odontoblástica, la resistencia al descementado (SBS) y la microdureza Vickers de cuatro adhesivos de ortodoncia fotopolimerizables comerciales.

**Materiales y métodos:** Las resinas de ortodoncia seleccionadas fueron Transbond XT – GI, Transbond Plus Color Change – GII (ambas de 3M Unitek), Enlight – GIII y Blugloo – GIV (ambas de Ormco). Se prepararon muestras (discos de resina) y se obtuvieron los monómeros lixiviados. La citotoxicidad fue evaluada utilizando un ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) y el calcio depositado se analizó mediante tinción con rojo de alizarina (ARS). Se utilizaron 120 premolares humanos para probar la SBS y el índice adhesivo remanente (ARI). Se realizó la prueba de microdureza Vickers en discos de resina.

**Resultados:** Todos los adhesivos causaron citotoxicidad de moderada a severa y promovieron una formación similar de depósitos de calcio. Sólo Blugloo presentó una resistencia al descementado entre 6 y 8 MPa, y Enlight mostró la puntuación más baja de dureza Vickers. Transbond Plus Color Change y Blugloo exhibieron mejores puntuaciones en el índice adhesivo remanente en comparación con Transbond XT y Enlight.

**Conclusión:** Blugloo parece ser una mejor opción considerando las propiedades evaluadas.

## 1.2. Fase 2

**Objetivo:** Determinar y comparar la frecuencia de micronúcleos y anomalías nucleares en células de la mucosa oral de un grupo control, un grupo bajo tratamiento de ortodoncia y un grupo con tratamiento de ortodoncia suplementado con ácido fólico (AF).

**Materiales y métodos:** Se incluyeron 30 sujetos sanos en este estudio y fueron divididos en tres grupos: control – GI (n = 10), aparatología fija ortodóncica – GII (n = 10) y aparatología fija de ortodoncia suplementado con ácido fólico – GIII (n = 10). Se colocaron *brackets* y tubos metálicos convencionales en los grupos GII y GIII junto con arcos de níquel-titanio (NiTi) y módulos elásticos. El GIII se suplementó con 400 mcg/día/3 meses de ácido fólico a partir del tercer mes. El grupo control (GI) permaneció sin ninguna intervención. Se tomó una muestra inicial (T0), y posteriormente un mes (T1), tres meses (T2) y seis meses después (T3), y las células se evaluaron mediante un ensayo de micronúcleos.

**Resultados:** Los individuos con aparatos de ortodoncia fijos mostraron una frecuencia mayor de micronúcleos en comparación con el grupo control. El grupo con aparatología fija suplementado con ácido fólico mostró una reducción significativa de los micronúcleos en comparación con el grupo con aparatología fija y una expresión similar al grupo control.

**Conclusión:** La suplementación con ácido fólico en dosis habituales puede ser beneficiosa en pacientes bajo tratamiento de ortodoncia al reducir el daño del ácido desoxirribonucleico (ADN), sabiendo que existe una relación entre el uso de aparatos de ortodoncia y el daño del ADN.

## 2. Introducción

El tratamiento con aparatos fijos de ortodoncia incluye normalmente la colocación de *brackets*, arcos de distintas aleaciones (acero inoxidable [SS], níquel-titanio [NiTi], titanio-molibdeno [TMA], principalmente), y módulos elastoméricos o ligaduras metálicas, y la biocompatibilidad de estos materiales es una de las principales preocupaciones de los ortodoncistas. Las propiedades térmicas, microbiológicas y enzimáticas de la boca ofrecen un ambiente ideal para la biodegradación de los aparatos de ortodoncia, facilitando en consecuencia la liberación de iones metálicos y monómeros residuales que están relacionados con efectos adversos para la salud, como la toxicidad celular y genética, gingivitis, sabor metálico, glositis, eritema multiforme, desprendimiento del tejido labial e hipertrofia gingival<sup>1-3</sup>.

La genotoxicidad comprende procesos mutagénicos o cancerígenos. Así, las propiedades genotóxicas de los metales y otros materiales usados en ortodoncia se establecen como un criterio esencial para elegir estos materiales de forma biológica segura para los pacientes. La evaluación de agentes genotóxicos se puede realizar mediante la aplicación de algunos criterios de valoración bien establecidos, como la frecuencia de micronúcleos (MN) y otras anormalidades nucleares, determinada por el ensayo MN. La terapia con antioxidantes ha sido utilizada en individuos con diabetes, con insuficiencia renal terminal y fumadores<sup>4-6</sup>, entre otros, con resultados beneficiosos disminuyendo la cantidad de alteraciones nucleares, por lo que su uso en ortodoncia podría ser innovador, teniendo en cuenta las alteraciones genotóxicas que se generan en las células de la mucosa bucal en pacientes bajo tratamiento de ortodoncia.

Los sistemas adhesivos de ortodoncia deben reunir propiedades mecánicas y de biocompatibilidad adecuadas, y estas propiedades pueden ser valoradas mediante diversos ensayos como el de MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] para medir la citotoxicidad, la tinción con rojo de alizarina para diferenciación odontoblástica, y otros como el de resistencia al descementado

(SBS), el índice adhesivo remanente (ARI) y la microdureza Vickers para analizar propiedades mecánicas.

No existen estudios que hayan evaluado el efecto de los antioxidantes en pacientes con tratamiento de ortodoncia, y así mismo, faltan propiedades sin explorar en distintas resinas de ortodoncia comerciales. Por tanto, los objetivos de esta investigación fueron evaluar la inestabilidad genómica y genotoxicidad con el uso de aparatología fija y la suplementación con ácido fólico *in vivo*, así como evaluar y comparar la citotoxicidad, diferenciación odontoblástica, resistencia al descementado y microdureza de cuatro resinas de ortodoncia comerciales *in vitro*.

### 3. Antecedentes

#### 3.1. Resinas en ortodoncia

En la odontología actual, los *composites* de resina son quizás los materiales más frecuentes, ya que se emplean en una amplia gama de aplicaciones clínicas, entre ellas como materiales de obturación directa, agentes de cementación, y como restauraciones indirectas, y en el caso específico de ortodoncia para la adhesión de *brackets*, la colocación de retenedores fijos y como *attachments* en alineadores, principalmente.

Las resinas dentales presentan tres componentes principales en su estructura:

- Una matriz de resina orgánica
- Un relleno inorgánico
- Un agente de acoplamiento <sup>7</sup>

La resina forma la matriz del material, uniendo las partículas de relleno individuales a través del agente de acoplamiento. Además, presentan diversas moléculas que promueven o modifican la reacción de polimerización.

##### 3.1.1. Matriz de resina orgánica

La resina es el componente químicamente activo del compuesto, que inicialmente es un monómero fluido y se convierte en un polímero sólido mediante la polimerización. Los monómeros más utilizados son bis-GMA (diglicidil dimetacrilato de bisfenol A) y UDMA (dimetacrilato de uretano), que se diluyen mediante un controlador de viscosidad como TEGDMA (dimetacrilato de trietilenglicol), MMA (metacrilato de metilo) o EGDMA (dimetacrilato de etilenglicol), el primero el más utilizado <sup>8</sup>. La matriz de resina también contiene los activadores/iniciadores para el curado y un inhibidor (como la hidroquinona) para garantizar una vida útil suficientemente larga de la resina. La polimerización de los *composites* dentales se

puede lograr por medios químicos (autocurado) o mediante activación energética externa (calor o luz), o una combinación de activación lumínica y química (curado dual). La eliminación de oxígeno previene la inhibición de la polimerización, los huecos y las inclusiones microscópicas de aire, y por tanto influye en el grado de conversión, la estética, el desgaste y la abrasión <sup>9</sup>.

### **3.1.2. Relleno inorgánico**

El relleno es de naturaleza inorgánica y está formado por cuarzo, borosilicato, vidrios de silicato de litio-aluminio y sílice amorfa. Los rellenos inorgánicos se han empleado para mejorar las propiedades de las resinas. Entre los principales beneficios que aportan, se encuentran la reducción de la contracción al fraguar, reducción del coeficiente de expansión térmica, mejorar la radiopacidad y las propiedades mecánicas, y controlar características como el color, la translucidez y la fluorescencia <sup>10,11</sup>.

A medida que ha avanzado la tecnología, se han producido partículas de relleno mediante el proceso sol-gel, que utiliza precursores de silicato que se polimerizan para formar partículas que varían desde dimensiones nanométricas a micrométricas. Además, la capacidad de producir partículas submicrónicas permite la producción de nanocompuestos en los que los rellenos se aproximan al tamaño de las moléculas de la matriz polimérica. Teóricamente, los nanocompuestos tienen el potencial de exhibir excelentes propiedades mecánicas y físicas con una mayor carga de relleno. Los avances en la tecnología de rellenos son la raíz de muchas de las mejoras que han dado lugar a los *composites* que se utilizan en la actualidad <sup>12</sup>.

### **3.1.3. Agentes de acoplamiento**

Las resinas no tienen una afinidad natural para adherirse a la superficie de relleno, debido a que las resinas son hidrófobas, mientras que las partículas de relleno son en su mayoría hidrófilas. Por tanto, la unión se logra mediante el uso de agentes de

acoplamiento, que se recubren sobre los rellenos y se incorporan a la resina. Este agente de acoplamiento es el silano, el cual es bifuncional y tiene dos grupos reactivos por molécula, por lo tanto, un extremo del agente de acoplamiento puede unirse a una partícula de relleno y el otro extremo a la matriz de resina.

Así mismo, para que una resina dental tenga propiedades mecánicas aceptables, es de suma importancia que exista una unión fuerte y duradera entre la resina y las partículas de relleno <sup>13</sup>. Si no hay una unión adecuada entre la resina y las partículas de relleno la mayor parte de la tensión tendrá que ser soportada por la matriz de resina y provocará desgaste de la restauración, se crearán sitios de inicio de grietas y posterior desintegración del compuesto, y se dará lugar a procesos de microfiltración y degradación.

#### **3.1.4. Grado de curado**

Uno de los parámetros más importantes de un sistema iniciador es el grado de curado resultante. Esta es una medida de cuántos grupos metacrilato se polimerizan, dividido por el número de grupos metacrilato iniciales. Los *composites* fotopolimerizables tienen un grado de curado que oscila entre el 55% y el 75% <sup>14</sup>. En general, cuanto mayor es el grado de curado, mayores son las propiedades mecánicas. Esto es cierto para el módulo elástico, la resistencia a la tracción y otros parámetros físicos como la absorción de agua y el desgaste. Un mayor grado de curado también reduce la cantidad de monómero no polimerizado que puede lixiviarse del compuesto.

Los polímeros dentales no son inertes en el ambiente bucal y pueden liberar varios componentes, inicialmente debido a una polimerización incompleta y, posteriormente, debido a la degradación. En las resinas adhesivas de ortodoncia se utilizan principalmente dos monómeros: diglicidil dimetacrilato de bisfenol A (Bis-GMA) y dimetacrilato de trietilenglicol (TEGDMA). El primero se utiliza en la mayoría de los adhesivos de ortodoncia utilizados actualmente. Estos monómeros de

metacrilato pueden liberarse tras la polimerización, dependiendo de su extensión, incluso después de 1 año.

La eficiencia de polimerización o el grado de curado se considera una propiedad esencial para todos los polímeros. En las resinas compuestas dentales, se ha encontrado que esta variable modula las propiedades físicas, mecánicas y biológicas del material, ya que una red polimérica pobre es susceptible a la liberación de elementos biológicamente reactivos (monómeros y aditivos), predispone a absorción de agua, hinchazón y degradación hidrolítica, y se asocia con propiedades mecánicas reducidas <sup>15</sup>. Además de la liberación de monómeros que no han reaccionado, la degradación de los monómeros libera subproductos metabólicos, incluidos trietilenglicol (TEG), ácido metacrílico (MA), ácido 2,3-epoximetacrílico (2,3-EMA) y formaldehído, que inducen una toxicidad comparable al comonomero crudo. El formaldehído es una sustancia química muy reactiva que posee potencial citotóxico, mutagénico, cancerígeno y proalérgico <sup>16</sup>.

El grado de conversión está estrechamente relacionado con la contracción de polimerización de los compuestos de resina, y ambos mecanismos son manifestaciones del mismo proceso. Lo ideal es que los *composites* dentales muestren un nivel óptimo de conversión y una contracción de polimerización mínima. Se sabe que los monómeros residuales son responsables de fallas de unión y también pueden causar efectos biológicos adversos, mostrando características alérgicas, citotóxicas, mutagénicas y estrogénicas <sup>17</sup>.

El grado de polimerización de monómeros fotopolimerizables depende de varios factores, incluido el tiempo de exposición, la concentración del fotoiniciador, la intensidad de la luz emitida por la unidad de curado en la longitud de onda de absorbancia máxima del fotoiniciador y la fracción de volumen de relleno. Los adhesivos fotopolimerizables de ortodoncia muestran una menor inhibición de la polimerización por oxígeno, una reacción de polimerización más corta y un tiempo de trabajo prolongado, lo que permite un manejo amplio en la colocación de

*brackets*. Otra ventaja de estos adhesivos frente a los sistemas de dos fases es la menor formación de formaldehído. La mezcla y manipulación de los sistemas de 2 fases aumenta la inhibición de oxígeno de la reacción de polimerización y, en consecuencia, los niveles de formaldehído.

Además, se obtiene un mejor sellado periférico del *bracket* con *composites* fotopolimerizables en comparación con los sistemas químicamente polimerizados. El grado de conversión es particularmente importante para los adhesivos utilizados en retenedores fijos, ya que permanecen en la cavidad bucal durante períodos más largos y una superficie mayor queda expuesta. A medida que la lixiviación disminuye al aumentar el contenido de relleno, las resinas compuestas líquidas tienen el mayor potencial de lixiviación, seguidas de los sistemas de pasta líquida y las formulaciones de pasta-pasta. Se ha encontrado, además, que se eluyen concentraciones de monómero más altas de un adhesivo curado químicamente que de un adhesivo de ortodoncia curado con luz, y que la irradiación directa de *brackets* de acero inoxidable adheridos mediante adhesivo fotopolimerizable muestra una mayor elución de monómero que la irradiación indirecta (desde los bordes incisal y cervical del *bracket*)<sup>9</sup>.

### **3.1.5. Liberación de bisfenol-A**

El bisfenol-A (BPA) es un compuesto sintético utilizado en el proceso de fabricación de algunos sistemas de monómeros de resina de ortodoncia. Recientemente, la liberación de BPA en la cavidad bucal ha recibido un gran interés en la literatura de ortodoncia<sup>7</sup>. Se han demostrado sus efectos hormonales, pero no hay estudios de alto nivel disponibles y la evidencia se basa en estudios observacionales *in vivo* e *in vitro*. Esto vuelve a ser más crítico en el uso de retenedores fijos, cuando la resina compuesta permanece expuesta a la cavidad bucal durante más tiempo que un adhesivo de fijación de *brackets*. Algunas de las recomendaciones que se han sugerido con respecto a la práctica clínica son:

- Irradiación indirecta (alrededor de los bordes del *bracket*) en lugar de irradiación directa (a través del *bracket*).
- La punta de fotopolimerización debe mantenerse lo más cerca posible del adhesivo.
- La profilaxis con piedra pómez después de la cementación podría reducir la posibilidad de liberación de BPA.
- Los pacientes deben enjuagarse la boca durante la primera hora después de la cementación, para evitar la exposición al peligro potencial de lixiviación de monómeros.
- Utilizar adhesivos especialmente diseñados para retenedores fijos.

### **3.2. Genotoxicidad**

La genotoxicidad se define como un efecto destructivo que afecta la integridad del material genético de las células (ácido desoxirribonucleico [ADN] y ácido ribonucleico [ARN]) <sup>18</sup>. Así mismo, se refiere a la capacidad de un nuevo compuesto químico de causar alteraciones a nivel genético. Las pruebas de toxicidad genética se realizan para identificar y caracterizar las sustancias químicas que causan la genotoxicidad responsable de diversas enfermedades o alteraciones <sup>19</sup>. La identificación de posibles mutágenos tiene una importancia crucial en la evaluación general de riesgos de medicamentos, ingredientes cosméticos, aditivos alimentarios, insecticidas y otros agentes utilizados en aplicaciones industriales y de consumo.

La genotoxicidad es un criterio de valoración toxicológico importante que debe evaluarse adecuadamente durante todo el proceso de evaluación de la seguridad. Varios ensayos *in vitro* e *in vivo* actuales proporcionan herramientas para examinar agentes con el fin de identificar este peligro. Las pruebas de toxicología genética se han convertido en un requisito reglamentario para todas las nuevas sustancias químicas y muchos otros materiales en todos los países desarrollados del mundo debido a la carcinogenicidad y los efectos heredados de estas sustancias químicas

que se consideran una preocupación pública importante <sup>20</sup>.

La genotoxicidad de diversos agentes químicos se ha evaluado mediante varias pruebas *in vitro* e *in vivo*. Los ensayos *in vitro* son adecuados para evaluar la genotoxicidad primaria, mientras que el enfoque *in vivo* puede proporcionar información sobre los efectos genotóxicos secundarios a través de la inflamación y el estrés oxidativo principalmente. Estas pruebas tienen sus propios criterios de valoración y especificidades para examinar la actividad genotóxica causada por diversas sustancias tóxicas en niveles biológicamente diferentes, pero muchas de ellas presentan sus propias limitaciones específicas. Los ensayos de Ames y el linfoma de ratón (MLA) o el análisis de mutaciones de HPRT en diferentes células y el uso de roedores transgénicos brindan la posibilidad de detectar mutagenicidad, en cambio, otros ensayos, incluidos el análisis de aductos de ADN o de rotura de cadena, el de micronúcleos (MN), el de intercambio de cromátidas hermanas (SCE), el de aberraciones cromosómicas, y la síntesis no programada de ADN (UDS), tienen la capacidad de detectar genotoxicidad, pero no mutagenicidad.

### **3.2.1. Ensayo de micronúcleos (MN)**

El ensayo de micronúcleos (MN) se considera el método más validado para monitorear la exposición reciente de individuos a agentes genotóxicos, ya sean químicos o físicos <sup>21</sup>. El ensayo MN también se propuso como marcador de riesgo de desarrollar cáncer y otras enfermedades crónicas. Diversos estudios han mostrado una mayor frecuencia de MN en pacientes no tratados con cáncer, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades cardiovasculares, y diabetes <sup>22–24</sup>. Además, se ha demostrado que las frecuencias elevadas de MN en linfocitos periféricos de sujetos sanos reflejan inestabilidad genómica y un mayor riesgo de desarrollar cáncer en el futuro, lo que sugiere un papel predictivo del ensayo.

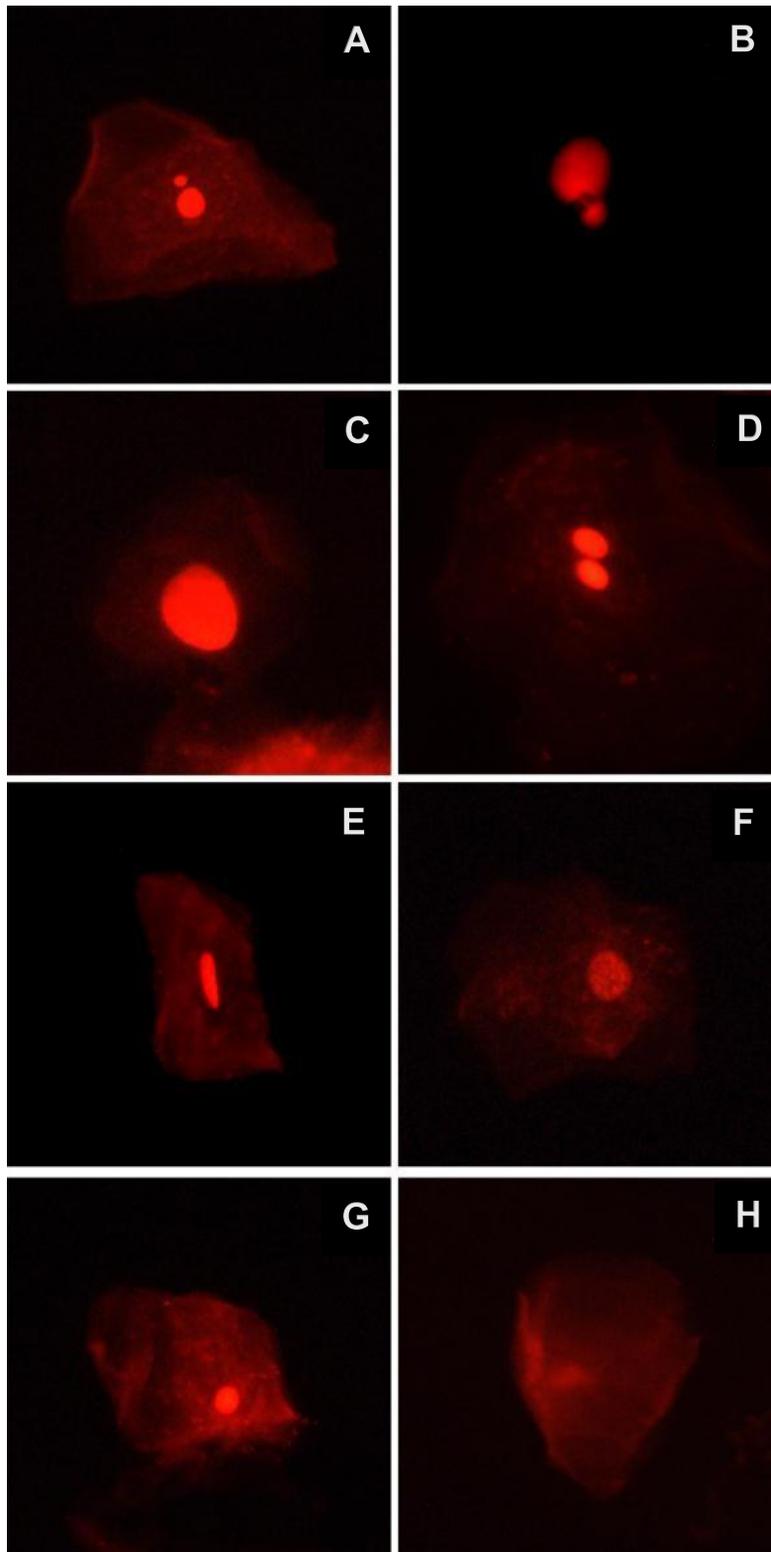
Es bien sabido que el MN se forma principalmente durante la anafase a partir de cromosomas completos o fragmentos cromosómicos que no se incorporan en los

núcleos hijos debido a que no se unen correctamente al huso durante la segregación<sup>25</sup>. Estos fragmentos de cromosomas dislocados o cromosomas eventualmente se cubren con una membrana nuclear y son morfológicamente similares al núcleo, excepto en tamaños más pequeños. La puntuación de los resultados del ensayo MN es una técnica fácil y rápida. Los ensayos de MN *in vitro* e *in vivo* son rápidos, altamente confiables y es posible identificar una amplia gama de daños en el ADN a nivel cromosómico, en particular para la evaluación del riesgo de daños genotóxicos.

Varios estudios han informado que la frecuencia de micronúcleos en las células bucales puede servir como un marcador pronóstico para enfermedades bucales y cáncer oral<sup>26</sup> y parece ser un buen candidato para el biomonitoreo del cáncer oral. Algunas de las lesiones orales, como la leucoplasia, el liquen plano oral y la fibrosis de la submucosa oral, se definieron como premalignas y se asociaron con un mayor riesgo de desarrollar carcinoma de células escamosas de la boca<sup>27</sup>.

### **3.2.2. Anormalidades nucleares**

Las distintas anomalías nucleares asociadas con la muerte celular y las indicativas de inestabilidad cromosómica o daño en el ADN se clasifican, de acuerdo con Bolognesi *et al.*<sup>28</sup>, en las siguientes (Fig. 1): células con micronúcleos (MN), células con núcleo lobulado (NL), células basales (CB), células binucleadas (BN), células picnóticas (PC), células con cromatina condensada (CC), cariorrexis (CR), y cariólisis (CL).



**Fig. 1.** Anormalidades nucleares. **A.** micronúcleo (MN). **B.** núcleo lobulado (NL). **C.** célula basal (CB). **D.** binucleada (BN). **E.** cromatina condensada (CC). **F.** cariorrexis (CR). **G.** picnosis (PC). **H.** cariólisis (CL). **Fuente:** Idolo *et al.* <sup>29</sup>

### 3.3. Antioxidantes

Los antioxidantes son sustancias que previenen la oxidación. La oxidación es una reacción química que puede generar radicales libres, desencadenando una serie de reacciones que pueden dañar las células de los organismos. Los antioxidantes, como los tioles o el ácido ascórbico (vitamina C), detienen estas reacciones en cadena. Tanto las plantas como los animales mantienen sistemas complejos de antioxidantes para equilibrar el estado oxidativo, que incluyen el glutatión y varias enzimas producidas internamente, así como antioxidantes provenientes de la dieta, como las vitaminas C y E <sup>30</sup>. La inducción de defensas antioxidantes o la reducción de los niveles endógenos de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS) es un rápido y claro indicador de estrés oxidativo. De hecho, la producción y acumulación de ROS/RNS es un denominador común en muchos trastornos y agresiones ambientales, al mismo tiempo que pueden causar un daño celular grave que conduce a una disfunción fisiológica y muerte celular en casi todos los aerobios <sup>31</sup>.

El cuerpo humano cuenta con sistemas antioxidantes tanto enzimáticos como no enzimáticos que regulan el equilibrio entre ROS y antioxidantes, y entre estos se encuentran la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPX), la superóxido dismutasa (SOD), la vitamina E soluble en lípidos, los carotenos y la vitamina C soluble en agua. Por otro lado, los antioxidantes de la dieta, obtenidos en su mayoría del consumo de frutas y verduras, también se han asociado con un gran equilibrio entre los radicales libres y el estado antioxidante, lo que ayuda a minimizar el estrés oxidativo y reducir el riesgo de cáncer, enfermedades cardiovasculares y envejecimiento <sup>32</sup>. De hecho, los antioxidantes dietéticos comprenden un amplio grupo de moléculas responsables de múltiples efectos bioactivos, y a través de su mezcla también se pueden alcanzar todas las ventajas de consumo y beneficios para la salud, ya que actúan sinérgicamente. Por ejemplo, algunos antioxidantes muestran un papel más significativo en la prevención de ciertos padecimientos, como el cáncer, mientras que otros funcionan mejor combatiendo enfermedades degenerativas. Los cánceres inducen estrés oxidativo al cambiar con la progresión

y el estado antioxidante resultante difiere de un paciente a otro. En los cánceres de pulmón “tempranos”, las especies reactivas secundarias de oxígeno son comparables o inferiores a las de las personas sanas.

La función de los antioxidantes puede ser clasificada según sus mecanismos de acción de la siguiente manera:

- a) Agentes preventivos: Estos suprimen la formación de nuevos radicales. Incluyen enzimas como SOD, CAT y GPX, proteínas que se unen a metales como ferritina y ceruloplasmina, y minerales como selenio (Se), cobre (Cu) y zinc (Zn).
- b) Agentes eliminadores de radicales: Estos inhiben el inicio y/o la propagación de cadenas de radicales. Se cuentan entre ellos el glutatión, la albúmina, las vitaminas C y E, los carotenoides y los flavonoides.
- c) Enzimas reparadoras y de novo: Estas enzimas reparan y reconstituyen membranas celulares. Incluyen lipasas, proteasas, enzimas reparadoras del ADN, transferasas y metionina-sulfóxido reductasas.
- d) Agentes de adaptación: Estos generan enzimas antioxidantes apropiadas y las transfieren al sitio de acción esencial<sup>33,34</sup>.

### **3.3.1. Estrés oxidativo**

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son moléculas altamente reactivas y tóxicas que se generan de forma continua en el cuerpo, principalmente a través de la cadena de transporte de electrones en las mitocondrias, el metabolismo oxidativo y la actividad del sistema inmunitario<sup>35</sup>. En condiciones normales, las ROS son neutralizadas por un complejo sistema de defensa antioxidante que consta de grupos enzimáticos como catalasa, superóxido dismutasa (SOD), glutatión reductasa (GR), glutatión peroxidasa (GPx) y grupos no enzimáticos, incluidos glutatión reducido (GSH), carotenoides, ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol y ácido úrico<sup>36,37</sup>.

El estrés oxidativo se define como un desequilibrio en la relación entre los compuestos prooxidantes y antioxidantes, lo que resulta en una acumulación excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) y, en última instancia, ocasiona daño celular <sup>38</sup>. Se ha establecido que el estrés oxidativo tiene un papel primordial en el inicio y/o la progresión de una amplia variedad de enfermedades, incluidas las enfermedades cardiovasculares, las enfermedades inflamatorias de las articulaciones, el cáncer y la diabetes <sup>39-42</sup>. Desde entonces, el estrés oxidativo se ha convertido en un área importante y contemporánea de interés científico. La evidencia sugiere que varios factores y estrategias dietéticos tienen la capacidad de modular el estrés oxidativo. El folato y el ácido fólico, en particular, han recibido un interés considerable en este contexto <sup>43-46</sup>.

### **3.3.2. Ácido fólico**

El ácido fólico (AF), también conocido como vitamina B9, es la forma sintética de folato y está incluido en los alimentos y suplementos fortificados <sup>47</sup>, ya que los mamíferos no pueden sintetizarlo y debe obtenerse a través de fuentes dietéticas <sup>48</sup>. El ácido fólico actúa como coenzima en importantes reacciones metabólicas de un solo carbono que son necesarias para la síntesis de ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN), y diversas reacciones de metilación. Por ejemplo, es un cosustrato esencial en la remetilación de la homocisteína (HCY) al aminoácido metionina <sup>49</sup>. También se ha informado que el ácido fólico tiene efectos antioxidantes, anticancerígenos, cardiovasculares y neuroprotectores <sup>47</sup>. La actividad antioxidante del ácido fólico está mediada por múltiples mecanismos, incluida una reducción en las concentraciones plasmáticas de HCY, lo que puede aumentar la capacidad antioxidante total (TAC) y reducir la formación de ROS <sup>50</sup>.

De acuerdo con el National Institutes of Health (NIH) <sup>51</sup>, las cantidades promedio de folato recomendadas varían de acuerdo con la edad o el periodo de vida que se esté experimentando (Tabla 1). Generalmente, se recomienda que las mujeres en edad reproductiva consuman suplementos, alimentos fortificados, o ambos, que

proporcionen un contenido diario de 400 mcg de ácido fólico, además del folato que obtienen naturalmente a través de su alimentación. Así mismo, continuar el patrón durante la lactancia.

**Tabla 1. Cantidad de folato diario recomendado de acuerdo con la edad.**

<b>Etapas de la vida</b>	<b>Cantidad recomendada</b>
Del nacimiento a los 6 meses de edad	65 mcg DFE
Bebés de 7 a 12 meses de edad	80 mcg DFE
Niños de 1 a 3 años	150 mcg DFE
Niños de 4 a 8 años	200 mcg DFE
Niños de 9 a 13 años	300 mcg DFE
Adolescentes de 14 a 18 años	400 mcg DFE
Adultos mayores de 19 años	400 mcg DFE
Mujeres y adolescentes embarazadas	600 mcg DFE
Mujeres y adolescentes en período de lactancia	500 mcg DFE

\*Las cantidades promedio diarias recomendadas están expresadas en microgramos (mcg) de equivalentes dietéticos de folato (Dietary Folate Equivalents DFE, por sus siglas en inglés).<sup>51</sup>

Los alimentos ricos en folato natural incluyen hígado de res, vegetales como espárragos y coles de Bruselas, así como verduras de hojas verdes intensas como la espinaca. También son fuentes importantes de folato las frutas y jugos cítricos, como las naranjas, junto con frutos secos, legumbres y chícharos. Por otro lado, el ácido fólico se añade a alimentos como pan, harina de trigo, harina de maíz, pasta, arroz y cereales fortificados para asegurar un adecuado aporte de esta vitamina.

### **3.3.3. Usos y eficacia**

Los estudios sobre el uso de suplementos orales de folato y ácido fólico para condiciones específicas han proporcionado la siguiente evidencia.

#### **3.3.3.1. Defectos del tubo neural**

Las enfermedades del tubo neural resultan en malformaciones de la columna vertebral (espinas bífidas), el cráneo y el cerebro (anencefalia). Son las malformaciones congénitas mayores más comunes del sistema nervioso central y

resultan de una falla del cierre del tubo neural en cualquiera de sus extremos entre los días 21 y 28 después de la concepción. Debido a su papel en la síntesis de ADN y otros componentes celulares críticos, el folato es especialmente importante durante las fases de crecimiento celular rápido. Aunque el mecanismo no ha sido completamente establecido, la evidencia de ensayos clínicos muestra que el consumo adecuado de ácido fólico periconcepcional por parte de las mujeres previene una proporción sustancial de enfermedades del tubo neural <sup>52-54</sup>.

### **3.3.3.2. Cáncer**

El folato juega un papel clave en el crecimiento celular y la construcción del ADN, la molécula compleja que forma nuestro modelo genético. Se cree que el folato puede desempeñar un papel tanto en la supresión de algunos tipos de cáncer temprano como en la progresión de los cánceres establecidos <sup>55-57</sup>.

Los estudios observacionales indican que las personas que consumen cantidades de folato por encima del promedio a través de su dieta o mediante suplementos de ácido fólico durante 15 años o más tienen un menor riesgo de desarrollar cáncer de colon y cáncer de mama <sup>58,59</sup>.

Varios estudios epidemiológicos han sugerido una asociación inversa entre la ingesta y el estado de folato y el riesgo de cáncer colorrectal, de pulmón, de páncreas, de esófago, de estómago, cervical, de ovario, de mama, de vejiga y otros cánceres. La investigación no ha establecido la naturaleza precisa del efecto del folato en la carcinogénesis, pero los científicos hipotetizan que el folato podría influir en el desarrollo del cáncer a través de su papel en el metabolismo del carbono único y los efectos subsiguientes en la replicación del ADN y la división celular. Además, la evidencia también indica que el folato podría desempeñar un papel dual en la iniciación y progresión del cáncer. Es decir, el folato podría suprimir algunos tipos de cáncer durante las etapas tempranas de desarrollo, mientras que dosis altas de ácido fólico tomadas después de que se hayan establecido lesiones preneoplásicas

podrían promover el desarrollo y la progresión del cáncer. La investigación más exhaustiva se ha centrado en el efecto del folato en el desarrollo del cáncer colorrectal y su precursor, el adenoma. Varios estudios epidemiológicos han encontrado asociaciones inversas entre altas ingestas de folato en la dieta y el riesgo de adenoma y cáncer colorrectal <sup>60-62</sup>.

En general, la evidencia hasta la fecha indica que una ingesta adecuada de folato en la dieta podría reducir el riesgo de algunas formas de cáncer. Sin embargo, los efectos de la suplementación con ácido fólico sobre el riesgo de cáncer no están claros, especialmente entre individuos con antecedentes de adenomas colorrectales u otras formas de cáncer. Se necesita más investigación para comprender completamente cómo la ingesta de folato en la dieta y la suplementación con ácido fólico afectan el riesgo de cáncer y si sus efectos difieren según el momento de la exposición.

### **3.3.3.3. Enfermedad cardíaca y accidente cerebrovascular**

Un nivel elevado de homocisteína se ha asociado con un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular. El folato y otras vitaminas B participan en el metabolismo de la homocisteína, y los investigadores han planteado la hipótesis de que estos micronutrientes reducen el riesgo de enfermedad cardiovascular al reducir los niveles de homocisteína. Los suplementos de ácido fólico (y vitamina B12) reducen los niveles de homocisteína. Sin embargo, estos suplementos en realidad no disminuyen el riesgo de enfermedad cardiovascular, aunque parecen brindar protección contra el accidente cerebrovascular. <sup>63,64</sup>.

En general, la evidencia disponible sugiere que la suplementación con ácido fólico solo o en combinación con otras vitaminas B reduce el riesgo de accidente cerebrovascular, especialmente en poblaciones con niveles bajos de folato, pero no afecta otros criterios de valoración cardiovasculares.

#### **3.3.3.4. Demencia y función cognitiva**

Los estudios observacionales han encontrado una asociación entre los niveles altos de homocisteína y una mayor incidencia de demencia y enfermedad de Alzheimer <sup>65,66</sup>. La homocisteína puede afectar negativamente al cerebro al provocar una falta de sangre en el cerebro y las células nerviosas. Algunos estudios observacionales han encontrado una relación entre los niveles bajos de folato en la sangre y un mayor riesgo de demencia. Sin embargo, los ensayos clínicos no han encontrado que la suplementación con ácido fólico prevenga el desarrollo de demencia o mejore la función cognitiva incluso si reduce los niveles de homocisteína <sup>66</sup>. Se necesitan más ensayos clínicos de mayor duración para ver los efectos de la suplementación con ácido fólico y las dosis efectivas en la función cognitiva.

#### **3.3.3.5. Depresión**

Los niveles bajos de folato se han relacionado con la depresión y la mala respuesta a los antidepresivos en algunos estudios, pero no en todos. Los posibles mecanismos no están claros, pero podrían estar relacionados con el papel del folato en las reacciones de metilación en el cerebro, la síntesis de neurotransmisores y el metabolismo de la homocisteína. Sin embargo, los factores secundarios relacionados con la depresión, como los patrones de alimentación poco saludables y el trastorno por consumo de alcohol, también podrían contribuir a la asociación observada entre los niveles bajos de folato y la depresión <sup>67</sup>. Otros estudios han examinado los efectos de la suplementación con 5-MTHF como tratamiento adyuvante de los antidepresivos, y los resultados sugieren que podría ser más prometedor que el ácido fólico <sup>68</sup>.

Se necesita investigación adicional para comprender completamente la asociación entre el nivel de folato y la depresión. Aunque la evidencia limitada sugiere que la suplementación con ciertas formas y dosis de folato podría ser un tratamiento adyuvante útil para los trastornos depresivos, se necesita más investigación para confirmar estos hallazgos.

#### 4. Planteamiento del problema

Los aparatos de ortodoncia ya sean fijos o removibles, constan de componentes metálicos, cerámicos y poliméricos y se consideran no citotóxicos en la mayoría de las condiciones. Sin embargo, durante el uso clínico puede producirse una alteración de las propiedades biológicas y pueden surgir efectos adversos, incluida la liberación de iones metálicos y monómeros residuales, subproductos de degradación y aditivos de polímeros. Varios estudios han investigado los efectos citotóxicos y genotóxicos de pacientes bajo tratamiento de ortodoncia <sup>69-71</sup>, y entre los hallazgos más importantes se encuentra el aumento de micronúcleos y anomalías nucleares presentes en las células exfoliadas de la mucosa oral, sin embargo, ningún estudio ha evaluado el uso de antioxidantes como terapia para la prevención o reducción de la frecuencia de anomalías nucleares en estos pacientes.

Los sistemas adhesivos de ortodoncia son un elemento clave para mantener exitosamente los *brackets* y accesorios adheridos a los dientes durante un largo período, por lo que es fundamental investigar las propiedades de estos materiales. Actualmente, los sistemas adhesivos fotopolimerizables son el estándar, ya que ofrecen ventajas como mayor tiempo de trabajo, tolerancia a la humedad y cambio de color para mejorar el posicionamiento de *brackets* y otros accesorios. Entre los compuestos contenidos en las resinas dentales, incluidos los adhesivos de ortodoncia, se encuentran los monómeros Bis-GMA (Bisfenol-A glicidil-metacrilato), TEGDMA (dimetacrilato trietilenglicol) y UDMA (dimetacrilato de uretano) <sup>72</sup>. Diferentes autores han informado previamente sobre los potenciales efectos citotóxicos de los monómeros lixiviados, tanto los liberados a corto plazo durante la conversión monómero-polímero como los excretados por erosión y degradación a lo largo del tiempo.

Existe una variedad creciente de adhesivos de ortodoncia disponibles en el mercado, por lo que es necesario evaluar las propiedades mecánicas y tóxicas de

estos materiales para discernir entre las mejores opciones.

De acuerdo con lo anterior, surgen las siguientes preguntas de investigación,

*¿La suplementación con ácido fólico modifica la frecuencia de los bioindicadores de inestabilidad genómica y genotoxicidad en pacientes con el uso de aparatología fija? y*

*¿Distintas resinas de ortodoncia comerciales presentan el mismo nivel de citotoxicidad, diferenciación odontoblástica, resistencia al descementado y microdureza?*

## 5. Justificación

En los últimos años, ha aumentado el número de pacientes que buscan tratamiento de ortodoncia por diversas razones, principalmente estéticas y funcionales. Así mismo, los materiales, técnicas y opciones de tratamiento ortodóncicos han aumentado y con ello la necesidad de evaluarlos objetivamente para ofrecer a los pacientes las mejores opciones en términos de calidad, biocompatibilidad y eficiencia.

Entre los materiales más usados en ortodoncia, como se mencionó antes, se encuentran los sistemas adhesivos. Algunos estudios se han centrado en añadir materiales a los adhesivos de ortodoncia para mejorar algunas propiedades, principalmente mecánicas, sin embargo, los fabricantes comerciales no parecen estar interesados en utilizar esos componentes, por lo que probablemente sería recomendable centrarse en las propiedades de los productos disponibles que derive en tomar decisiones más informadas al elegir un adhesivo de ortodoncia. Un *composite* de ortodoncia ideal para usar en los pacientes debe reunir propiedades mecánicas adecuadas en combinación con una buena respuesta biológica de los tejidos bucales y un fácil manejo clínico.

Por otra parte, se ha reportado con anterioridad que los materiales usados en los aparatos fijos de ortodoncia, especialmente los metales y los monómeros derivados de los sistemas adhesivos, causan alteraciones genotóxicas en las células orales. El uso de antioxidantes, tales como la vitamina C y el ácido fólico, como terapia para inhibir o reducir la formación de radicales libres (FR) y especies reactivas de oxígeno (ROS) se ha empleado en diversos contextos médicos con resultados prometedores<sup>4-6</sup>. En el campo odontológico y específicamente en el de la ortodoncia, dicha terapia no ha sido explorada, por lo cual resulta muy interesante y de gran importancia investigar sobre los probables efectos benéficos en pacientes con tratamiento de ortodoncia, teniendo en cuenta además que la suplementación con antioxidantes, y en especial con ácido fólico, está muy disponible y de fácil acceso en términos

económicos.

Aunque en esta investigación se plantean dos temas distintos, ambos se relacionan de manera intrínseca. Conocer más sobre las propiedades citotóxicas y mecánicas de resinas ortodóncicas comerciales aporta a elegir aquellas más adecuadas para los pacientes y en este sentido sabiendo que las resinas, en conjunto con otros materiales que se colocan en los tratamientos con aparatos fijos de ortodoncia, causan alteraciones en las células bucales, cobra importancia explorar alternativas que prevengan y/o reduzcan estos efectos indeseables.

Tanto los estudios *in vitro* como los *in vivo* contribuyen a entender mejor el comportamiento de los materiales y sustancias usados en ortodoncia, los primeros al poder medir propiedades previo a su uso clínico y los segundos siendo muy beneficiosos al estimar el impacto de los aparatos de ortodoncia, y en este caso del ácido fólico, en el entorno natural, sabiendo que los estudios *in vitro* no simulan las condiciones de la cavidad bucal debido a que es un ambiente complejo acompañado de factores como temperatura, pH, higiene, dieta, etc. Considerando los puntos mencionados, es fundamental que los ortodoncistas estén bien informados sobre las ventajas, beneficios, limitaciones y posibles riesgos asociados al uso de estos materiales, así como sobre la aplicación de una terapia con ácido fólico.

## 6. Hipótesis

### 6.1. Fase 1

*¿Distintas resinas de ortodoncia comerciales presentan el mismo nivel de citotoxicidad, diferenciación odontoblástica, resistencia al descementado y microdureza?*

#### 6.1.1. Hipótesis de investigación ( $H_1$ )

- Las resinas de ortodoncia estudiadas presentan el mismo nivel de citotoxicidad, diferenciación odontoblástica, resistencia al descementado y microdureza.

#### 6.1.2. Hipótesis nula ( $H_0$ )

- Las resinas de ortodoncia estudiadas presentan distintos niveles de citotoxicidad, diferenciación odontoblástica, resistencia al descementado y microdureza.

## **7. Objetivos**

### **7.1. Fase 1**

#### **7.1.1. Objetivo general**

- Evaluar y comparar la citotoxicidad, diferenciación odontoblástica, resistencia al descementado y microdureza de cuatro resinas de ortodoncia.

#### **7.1.2. Objetivos específicos**

- Establecer cultivos de células madre de pulpa dental humana (hDPSC).
- Obtener los extractos adhesivos de cuatro resinas de ortodoncia (Transbond XT, Transbond Plus Color Change, Enlight y Blugloo).
- Evaluar y comparar la citotoxicidad de las resinas sobre células madre de pulpa dental humana (hDPSC).
- Evaluar y comparar la formación de depósitos de calcio mediante tinción con rojo de alizarina.
- Determinar y comparar la resistencia al descementado, así como el índice adhesivo remanente (ARI) de las cuatro resinas.
- Determinar y comparar la microdureza Vickers de las cuatro resinas de ortodoncia mencionadas.

## 8. Materiales y métodos

### 8.1. Fase 1

#### 8.1.1. Diseño del estudio

**Tipo de estudio:** experimental *in vitro*, prospectivo y comparativo.

#### 8.1.2. Población y universo de estudio

**Universo de estudio:**

- Número de células orales cultivadas.
- Discos de cuatro tipos de resinas compuestas fotopolimerizables para ortodoncia (Transbond XT, Transbond Plus Color Change, Enlight and Blugloo).
- Premolares extraídos por razones ortodóncicas.

#### 8.1.3. Muestreo

**Muestra:** Probabilística.

**Método de muestreo:** Aleatorio simple.

**Tamaño:**

- $n = 9$  platos de 96 pocillos a densidades de  $4 \times 10^5$  células/ml. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado, realizando tres experimentos independientes para asegurar la reproducibilidad de los resultados ( $n = 9$ ).
- $n = 40$  discos de 10 mm de diámetro y 1 mm de espesor ( $n = 10$  de cada tipo de resina).
- $n = 120$  premolares ( $n = 30$  para cada tipo de resina).

#### **8.1.4. Criterios de selección**

Los platos de pocillos con contenido celular, discos de resina y premolares fueron seleccionados tomando en cuenta las siguientes características.

##### **8.1.4.1. Inclusión**

- Platos de 96 pocillos a densidades de  $4 \times 10^5$  células/ml.
- Discos de resina de 10 mm de diámetro y 1 mm de espesor.
- Premolares con corona intacta extraídos por razones ortodóncicas.

##### **8.1.4.2. Exclusión**

- Platos de cultivo que presentaran defectos de fabricación.
- Discos de resina que presentaran superficies irregulares o espacios por falta de material.
- Premolares con hipomineralización o hipoplasia del esmalte.

##### **8.1.4.3. Eliminación**

- Platos de cultivo que durante su manipulación tuvieran pérdida del contenido.
- Platos de cultivo que presentaran contaminación.
- Platos de cultivo en los que se agregaran cantidades inadecuadas de monómeros lixiviados o se realizara una disolución incorrecta.
- Discos de resina que se fracturaran o contaminaran durante su manipulación.
- Premolares que sufrieran fractura durante la manipulación.

## 8.1.5. Variables de estudio

### 8.1.5.1. Variables dependientes

**Tabla 4.** Definición conceptual y operacional de variables dependientes.

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición
Citotoxicidad	Daño celular provocado por la acción de anticuerpos específicos y complemento o por células citotóxicas <sup>73</sup>	Se emplearán células madre de pulpa dental humana (hDPSC) en contacto con los extractos adhesivos de las resinas. Se utilizará ensayo MTT para el análisis de viabilidad celular	Cuantitativa continua	De razón 0-n cel (%)
Diferenciación odontoblástica	Capacidad de las células madre de pulpa dental humana (hDPSC) para diferenciarse en odontoblastos. Fuente propia.	Se utilizará medio de diferenciación odontoblástico para inducir dicho cambio y se evaluará la formación de depósitos de calcio mediante tinción con rojo de alizarina	Cuantitativa continua	De razón 0-n depósitos de calcio (%)
Resistencia al descementado	Fuerza máxima que la unión adhesiva puede tolerar antes de fracturarse <sup>74</sup>	Se utilizará un minimolde en forma de <i>bracket</i> con una superficie de base de 17.5 mm <sup>2</sup> para adherir cada tipo de resina a la superficie bucal de los premolares y se realizará el ensayo de resistencia al descementado con una máquina de ensayos universales con una velocidad de cruceta de 0,5 mm/min hasta que se produzca la falla	Cuantitativa continua	De razón 0-n megapascales (MPa)
Índice adhesivo remanente	Cantidad de adhesivo remanente después de despegar un <i>bracket</i> /aditamento. Fuente propia.	Después del ensayo de resistencia al descementado, se examinará la superficie de los dientes con un estereomicroscopio con un aumento de x10 para evaluar la cantidad de adhesivo restante en el esmalte	Cualitativa	Ordinal Politémica 0 = no queda adhesivo en el esmalte 1 = queda menos del 50 % de adhesivo en el esmalte 2 = queda más del 50 % de adhesivo en el esmalte 3 = todo el adhesivo que queda en el esmalte
Microdureza Vickers	Método para medir la dureza de los materiales. Fuente propia.	Se aplicará una carga constante de 9.8 N a la superficie de los discos de resina durante 10 s, y los valores serán registrados	Cuantitativa continua	De razón 0-n Dureza Vickers (HV)

### 8.1.5.2. Variables independientes

**Tabla 5.** Definición conceptual y operacional de variables independientes.

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición
Dilución	Reducción de la concentración de una sustancia química en una disolución <sup>75</sup>	Se realizarán diluciones del 0-100% de los extractos adhesivos de las resinas en contacto con hDPSC	Cuantitativa	De razón ml
Tiempo de proliferación celular	Incremento del número de células por división celular cuantificadas por medio de conteo celular con hematocitómetro. Fuente propia.	Rango temporal a partir de la incubación con extractos adhesivos de las resinas a las 24 h	Cuantitativa discreta	De razón 0-n h de incubación
Resina ortodóncica	Material usado para unir <i>brackets</i> y otros aditamentos al esmalte dental. Fuente propia.	Se prepararán discos de cuatro resinas distintas para los ensayos de citotoxicidad, diferenciación odontoblástica y microdureza	Cualitativa	Nominal Politómica 0 = Transbond XT, 3M 1 = Transbond Plus Color Change, 3M 2 = Enlight,Ormco 3 = Blugloo, Ormco

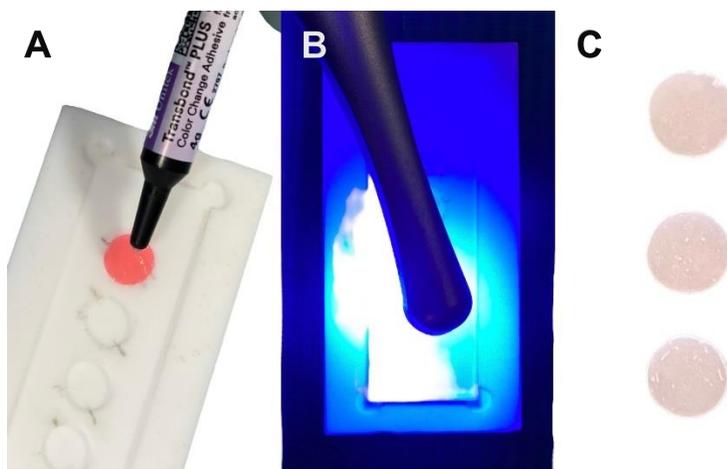
## 8.1.6. Procedimiento

### 8.1.6.1. Preparación de los discos de resina



Fig. 6. Adhesivos de ortodoncia incluidos en el estudio. Fuente: propia.

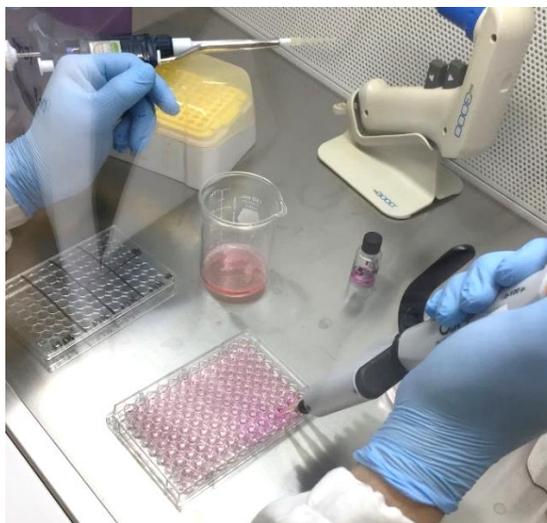
Se evaluaron cuatro adhesivos de ortodoncia fotopolimerizables comerciales (Fig. 6), Transbond XT – GI (3M Unitek, Monrovia, CA, EE. UU.), Transbond Plus Color Change – GII (3M Unitek), Enlight – GIII (Ormco, Brea, CA, EE. UU.) y Blugloo – GIV (Ormco). Se prepararon un total de 60 discos, 15 discos de 10 mm de diámetro y 1 mm de espesor de cada resina de ortodoncia mencionada. Los discos se formaron en un molde de politetrafluoroetileno (PTFE) hecho a medida, se prensaron con una fina lámina de vidrio para eliminar el exceso y se fotopolimerizaron en la superficie superior durante 20 s con una lámpara de polimerización Led Bluephase (Ivoclar Vivadent GmbH, Viena, Austria). Las superficies de los discos se pulieron suavemente con hojas de papel de lija (grano 1000, 2000, 4000). Se utilizaron 5 discos para pruebas de citotoxicidad, 5 para diferenciación de odontoblastos y 5 para pruebas de microdureza, respectivamente. Todas las muestras fueron preparadas por el mismo operador (Fig. 7).



**Fig. 7.** A. Molde de politetrafluoroetileno (PTFE) empleado para la conformación de los discos de resina. B. Fotopolimerización de la resina. C. Discos de resina conformados. **Fuente:** propia.

#### 8.1.6.2. Cultivos celulares

Se utilizaron células madre de pulpa dental humana (hDPSC) para el ensayo de citotoxicidad y la diferenciación de odontoblastos. Las hDPSC se obtuvieron del banco de células del Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria, Área de Nanoestructuras y Biomateriales de la ENES León, UNAM, y se establecieron y caracterizaron como se informó anteriormente <sup>76</sup>. Las células se inocularon en placas de cultivo con medio de cultivo Minimum Essential Medium (MEM) (Gibco, Carlsbad, CA, EE. UU.), suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% (Gibco), glutamina al 1% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EE. UU.), y penicilina/estreptomicina al 1% (Sigma-Aldrich) y se incubaron a 37°C con 95% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>, cambiando el medio de cultivo cada dos días hasta alcanzar una confluencia celular superior al 80%. Luego las células se subcultivaron en placas estériles de 96 pocillos a concentraciones de 1.7x10<sup>6</sup> células/ml, incubando en las mismas condiciones de cultivo, antes de los ensayos de citotoxicidad y diferenciación (Fig. 8).



**Fig. 8.** Células subcultivadas en placas estériles de 96 pocillos. **Fuente:** propia.

### **8.1.6.3. Obtención de los monómeros lixiviados**

Para la citotoxicidad y la diferenciación odontoblástica, se expusieron 10 discos de cada resina a luz ultravioleta durante un total de 60 min (30 min por lado) para evitar la contaminación bacteriana. Para obtener las sustancias lixiviadas de las resinas adhesivas de ortodoncia, cada disco se sumergió en 1 ml de MEM estéril y se incubó a 37°C y 95% de humedad durante 24 h. Usando la fórmula  $2\pi rh + 2\pi r^2$ , la relación entre el área de superficie y el volumen se calculó en 1.88 cm<sup>2</sup>/ml, siguiendo las directrices de la Organización Internacional de Normalización (ISO) para materiales médicos y dentales sólidos, que recomiendan una relación entre el área de superficie y el volumen de 0.5 a 6.0 cm<sup>2</sup>/ml que generan extractos para pruebas en células cultivadas. Los extractos se filtraron para eliminar las partículas sólidas y se almacenaron hasta su uso posterior.

### **8.1.6.4. Ensayo de citotoxicidad MTT**

Los efectos citotóxicos de los extractos adhesivos se determinaron utilizando un ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich). Las células de las placas de 96 pocillos se trataron con 100 µl de los extractos adhesivos de cada resina y se realizaron diluciones del 100% al 0% (Fig.

9). Como control negativo, las líneas celulares se mantuvieron únicamente en medio de cultivo. Los extractos y los controles se incubaron durante 24 h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se eliminaron los sobrenadantes y las células se incubaron con 100 µl de MTT (0.2 mg/ml en MEM fresco) durante 7 h. El formazán se disolvió con 100 µl de dimetilsulfóxido DMSO (JT Baker, Phillipsburg, NJ, EE. UU.) y las densidades ópticas (OD) se midieron a 570 nm utilizando un espectrofotómetro (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, EE. UU.). La viabilidad celular se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula: viabilidad celular (%) = (OD del grupo de prueba/OD del grupo control negativo) × 100. Los datos fueron obtenidos de tres experimentos independientes, cada uno de los cuales se llevó a cabo en triplicado (n = 9).

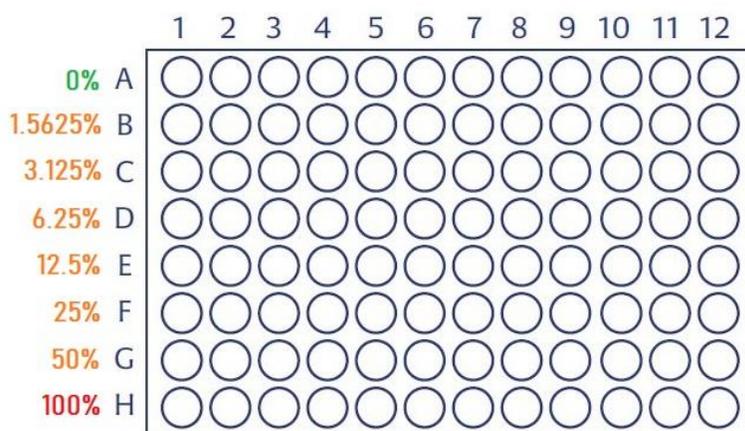


Fig. 9. Esquema que muestra las diluciones realizadas. Fuente: propia.

La citotoxicidad se clasificó según la viabilidad celular, siguiendo la metodología de Sjögren *et al.*<sup>77</sup>, en las siguientes categorías: no citotóxico (>90% de viabilidad celular), ligeramente citotóxico (60–90%), moderadamente citotóxico (30–59%) y severamente citotóxico (<30%). Se determinó la concentración citotóxica del 50% (CC<sub>50</sub>); esta se definió como la concentración de material de prueba necesaria para reducir la viabilidad celular en un 50% en comparación con el control negativo.

### 8.1.6.5. Diferenciación odontoblástica

Se utilizaron placas de 96 pocillos que contenían hDPSC para evaluar la diferenciación odontoblástica. Las células se incubaron en medio de diferenciación de odontoblastos <sup>78,79</sup> ( $\alpha$ -MEM suplementado con FBS al 10%, penicilina/estreptomicina al 1%,  $\beta$ -glicerofosfato 10 mM, ascorbato 2 fosfato 50 mM, dexametasona 0.1 mM, [todo de Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EE. UU.]) con los extractos adhesivos de las resinas en proporción 1:1, a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad. Como control negativo se utilizaron células incubadas en medio de diferenciación de odontoblastos y como control positivo, las células se mantuvieron en medio de cultivo MEM. Para todos los grupos, el medio se renovó cada dos días durante quince días.

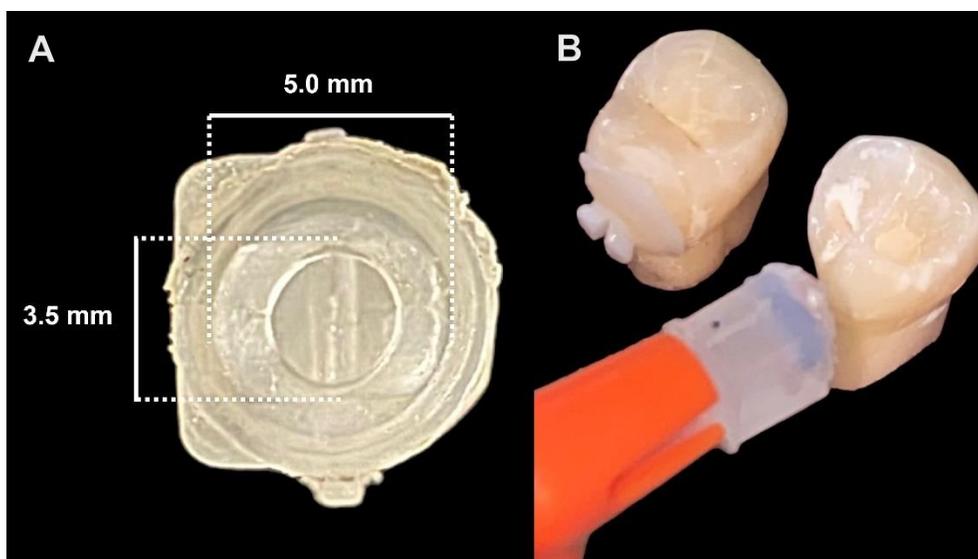
Después de este período, se evaluó la actividad de deposición mineral, que indica una osteogénesis en curso, mediante tinción con rojo de alizarina. Las células teñidas se observaron con un microscopio óptico (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) y se obtuvieron imágenes (20x). Para la cuantificación de las concentraciones de calcio, se extrajo la tinción con rojo de alizarina con 2-isopropanol al 5% y ácido acético al 10% (ambos Sigma-Aldrich) durante 16 h y se midió la absorbancia a 550 nm usando un espectrofotómetro (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, EE. UU.) (Fig. 10).



Fig. 10. Espectrofotómetro para medir la absorbancia. Fuente: propia.

### 8.1.6.6. Resistencia al descementado (SBS)

Se recolectaron 120 premolares extraídos por motivos de ortodoncia, previo consentimiento informado de los pacientes y aprobación del comité de ética de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma Estado de México (UAEMex), Toluca, México (CEICIEAO-2023-019), y se almacenaron en timol al 0.01% hasta su uso. Las superficies bucales de los dientes se limpiaron con una copa de goma y pasta profiláctica sin flúor, se enjuagaron con agua durante 15 s y se secaron con aire comprimido durante 10 s. Los dientes se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos (n = 30) según la resina ortodóncica a probar: Grupo I – Transbond XT, Grupo II – Transbond Plus Color Change, Grupo III – Enlight y Grupo IV – Blugloo, y posteriormente se montaron verticalmente en barras de acrílico de autocurado.



**Fig. 11.** A. Minimolde en forma de *bracket* con un área de base de 17.5 mm<sup>2</sup>. B. Adhesión de las resinas a la superficie dental para prueba de resistencia al descementado (SBS) y posterior evaluación de índice adhesivo remanente (ARI).

Fuente: propia.

Para probar las resinas se utilizó un minimolde con forma de *bracket* con un área de base de 17.5 mm<sup>2</sup> (Fig. 11). Las superficies de los dientes se acondicionaron con gel de grabado de ácido fosfórico al 35% (Scotchbond Universal, 3M ESPE, St Paul, MN, EE. UU.) durante 15 s, se enjuagaron con agua durante 15 s y se secaron con aire comprimido hasta observar una apariencia blanca tiza en la zona tratada de la

superficie. Luego, con un *microbrush* se aplicó el *primer* correspondiente a cada sistema adhesivo, se roció con aire durante 5 s y se fotopolimerizó con una lámpara de polimerización Led Bluephase (Ivoclar) durante 10 s. Con una espátula para resina se colocó cada resina en el minimolde, se presionó sobre la superficie del diente, se eliminó el exceso y se fotopolimerizó durante 20 s. Antes de la prueba de resistencia al descementado, las muestras preparadas se colocaron en agua destilada en una incubadora a 37°C durante 24 h.

La resistencia al descementado de los *attachments* se midió en una máquina de ensayos universales (Autograph AGS-X, Shimadzu, Kioto, Japón) con una velocidad de cruceta de 0.5 mm/min hasta que se produjo la falla (Fig. 12). La fuerza de descementado se registró en Newtons y se convirtió a MPa.



**Fig. 12.** Prueba de resistencia al descementado. **Fuente:** propia.

#### **8.1.6.7. Índice adhesivo remanente (ARI)**

Una vez que se descementaron los *attachments*, se examinó la superficie de los dientes con un estereomicroscopio (Nikon, Tokio, Japón) con un aumento de 10x para evaluar la cantidad de adhesivo remanente en el esmalte. Las puntuaciones del índice adhesivo remanente se consideraron de la siguiente manera:

- 0 = no queda adhesivo en el esmalte.
- 1 = queda menos del 50% de adhesivo en el esmalte.
- 2 = queda más del 50% de adhesivo en el esmalte.
- 3 = todo el adhesivo queda en el esmalte.

#### 8.1.6.8. Evaluación de la microdureza

La microdureza de la superficie se determinó utilizando un microdurómetro Vickers (SINOWON SXHV-1000TA, Dongguan, China) con un indentador de pirámide de diamante alargado Vickers (Fig. 13). Se aplicó una carga constante de 9.8 N a la superficie durante 10 s y se registraron los valores de dureza Vickers (HV). Se realizaron diez indentaciones en cada disco (cinco discos por resina), para un total de 50 indentaciones por resina (n = 50).

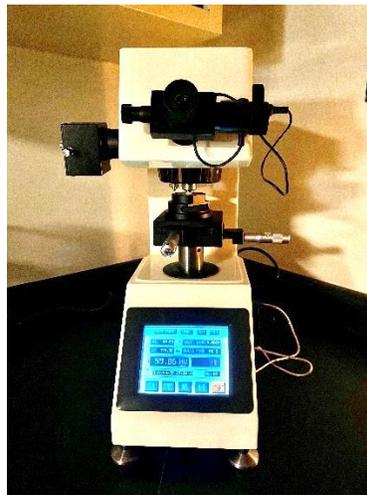


Fig. 13. Microdurómetro Vickers. Fuente: propia.

## 9. Hipótesis

### 9.1. Fase 2

*¿La suplementación con ácido fólico modifica la frecuencia de los bioindicadores de inestabilidad genómica y genotoxicidad en pacientes con el uso de aparatología fija?*

#### 9.1.1. Hipótesis de investigación ( $H_1$ )

- La suplementación con ácido fólico modifica la frecuencia de los bioindicadores de inestabilidad genómica y genotoxicidad en pacientes con el uso de aparatología fija.

#### 9.1.2. Hipótesis nula ( $H_0$ )

- La suplementación con ácido fólico no modifica la frecuencia de los bioindicadores de inestabilidad genómica y genotoxicidad en pacientes con el uso de aparatología fija.

## **10. Objetivos**

### **10.1. Fase 2**

#### **10.1.1. Objetivo general**

- Evaluar la inestabilidad genómica y genotoxicidad con el uso de aparatología fija y la suplementación con ácido fólico.

#### **10.1.2. Objetivos específicos**

- Evaluar la frecuencia de los biomarcadores de genotoxicidad y citotoxicidad en un grupo control.
- Evaluar la frecuencia de los biomarcadores de genotoxicidad y citotoxicidad antes y durante el uso de aparatología fija metálica.
- Evaluar la frecuencia de los biomarcadores de genotoxicidad y citotoxicidad antes y durante el uso de aparatología fija metálica con y sin la suplementación con ácido fólico.

## 11. Materiales y métodos

### 11.1. Fase 2

#### 11.1.1. Diseño del estudio

**Tipo de estudio:** experimental *in vivo*, prospectivo y comparativo.

#### 11.1.2. Población y universo de estudio

**Universo de estudio:**

- Pacientes de nuevo ingreso a tratamiento de ortodoncia, en consulta privada.
- Pacientes de nuevo ingreso a consulta odontológica, en consulta privada.

#### 11.1.3. Muestreo

**Muestra:** No probabilística.

**Método de muestreo:** Por conveniencia.

**Tamaño:** n = 30 pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión.

#### 11.1.4. Criterios de selección

La selección de los pacientes se realizó considerando las siguientes características.

##### 11.1.4.1. Inclusión

- Necesidad de tratamiento de ortodoncia para los grupos II y III.
- No fumador.
- Sin enfermedades orales o sistémicas.
- Sin restauraciones o prótesis bucales metálicas.
- Sin tratamiento de ortodoncia previo.

- Sin exposición ocupacional a metales.
- No recibir medicamentos o suplementos.
- Ninguna alergia conocida a la bisutería, relojes o fuentes de níquel y cromo.
- Ausencia de *piercings* en la boca.
- Firmar el informe de consentimiento.
- Firmar el informe de asentimiento.

#### **11.1.4.2. Exclusión**

- Pacientes embarazadas.
- Pacientes con cáncer o consumiendo antineoplásicos.
- Pacientes menores de 12 años.
- Pacientes menores de edad que desearan participar en el estudio, pero cuyos padres no otorgaron el consentimiento informado, o menores de edad que no estuvieran de acuerdo en participar y por tanto no dieran el asentimiento informado.

#### **11.1.4.3. Eliminación**

- Pacientes que abandonaran el estudio.
- Pacientes que dejaran de tomar la suplementación con ácido fólico.

## 11.1.5. Variables de estudio

### 11.1.5.1. Variables dependientes

**Tabla 2.** Definición conceptual y operacional de las variables dependientes.

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición
Genotoxicidad	Capacidad relativa de un agente de ocasionar daño en el material genético <sup>80</sup>	<p>Se utilizó tinción de Papanicolaou (PAP) para el ensayo de micronúcleos y anomalías nucleares sobre células bucales exfoliadas de todos los pacientes incluidos en el estudio. Se puntuaron las siguientes anomalías en las laminillas:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Micronúcleos (MN): forma ovalada o redondeada, intensidad de tinción similar al núcleo principal, diámetro entre 1/3 y 1/16 del núcleo principal, deben encontrarse dentro del citoplasma y puntuarse sólo en células basales y diferenciadas.</li> <li>• Núcleo lobulado (NL): el núcleo principal presenta una marcada constricción formando una yema. La yema está adherida al núcleo principal, con tinción similar y un diámetro entre 1/4 y 1/2 del núcleo principal.</li> <li>• Binucleada (BN): la célula contiene dos núcleos en su citoplasma. Los núcleos tienen tamaño e intensidad de tinción similares.</li> <li>• Picnosis (PC): la célula tiene un núcleo contraído y teñido uniformemente. El diámetro del núcleo es de 1/3 a 2/3 de un núcleo normal.</li> <li>• Cromatina condensada (CC): el núcleo muestra áreas de cromatina agregada con un patrón estriado. Algunas áreas del núcleo están teñidas más intensamente.</li> <li>• Cariorrexis (CR): el núcleo muestra cromatina ampliamente condensada y puede ser evidente la fragmentación del núcleo.</li> <li>• Cariólisis (CL): el núcleo está vacío de ADN y no se tiñe.</li> </ul>	Cuantitativa discreta	De razón 0-1000 anomalías nucleares (MN, NL, BN, PC, CC, CR, CL)

### 11.1.5.2. Variables independientes

**Tabla 3.** Definición conceptual y operacional de variables independientes.

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición
Tiempo de exposición a la aparatología fija ortodóncica	Período transcurrido desde la colocación de aparatología fija ortodóncica. Fuente propia.	Periodo transcurrido entre la colocación de aparatología fija ortodóncica y la toma de muestras de células bucales exfoliadas	Cualitativa	Ordinal, Politémica T0 = sin exposición, T1 = 1 mes, T2 = 3 meses, T3 = 6 meses
Suplementación	Aporte de sustancias nutricionales complementarias a la dieta con el fin de mantener una buena salud, así como para prevenir o tratar enfermedades <sup>81</sup>	Se suplementó a un grupo de pacientes con una dosis de 400 mcg/día/3 meses de ácido fólico a partir del tercer mes con aparatología fija ortodóncica	Cualitativa	Nominal, Dicotómica 0 = sin suplementación, 1 = ácido fólico
Edad	Lapso que transcurre desde el nacimiento hasta el momento de referencia <sup>82</sup>	Edad en años	Cuantitativa discreta	De razón 0-100 años
Sexo	Características biológicas y fisiológicas que definen a hombres y mujeres <sup>83</sup>	Hombre, mujer	Cualitativa	Nominal, Dicotómica 0 = femenino, 1 = masculino
Índice de masa corporal (IMC)	Medida de asociación entre el peso y la talla de una persona <sup>84</sup>	Se midieron el peso y la talla y se obtuvo el IMC	Cualitativa	Ordinal, Politémica 0 = Bajo peso <18.5, 1 = Normal 18.5 - 25, 2 = Sobrepeso 25 - 30, 3 = Obesidad >30
Frecuencia de cepillado de dientes	Número de veces que una persona cepilla sus dientes en 24 h. Fuente propia.	Número de veces que reportó el individuo	Cualitativa	Ordinal, Politémica 0 = ninguna, 1 = 1 vez/día, 2 = 2 veces/día, 3 = 3 veces/día
Ocupación	Actividad principal que realiza la persona. Fuente propia.	Actividad principal que reportó el individuo	Cualitativa	Nominal, Dicotómica 0 = estudiante, 1 = otra
Antecedentes familiares de cáncer	Historia heredo-familiar de algún tipo de cáncer. Fuente propia.	Historia positiva o negativa de familiares directos que tengas o hayan tenido algún tipo de cáncer	Cualitativa	Nominal, Dicotómica 0 = sí, 1 = no
Fumador pasivo	Aquella persona que, pese a no ser fumadora, aspira el humo del tabaco involuntariamente de forma habitual <sup>85</sup>	Exposición habitual al humo de tabaco en el entorno familiar	Cualitativa	Nominal, Dicotómica 0 = sí, 1 = no
Consumo de alcohol	Ingesta de bebidas que contienen alcohol. Fuente propia.	Consumo regular de bebidas alcohólicas independientemente de la frecuencia y cantidad	Cualitativa	Nominal, Dicotómica 0 = sí, 1 = no

## 11.1.6. Procedimiento

### 11.1.6.1. Selección de los participantes

Se incluyeron 30 sujetos de ambos sexos, con edades entre 14 y 43 años, que cumplieron con los criterios de inclusión. Los participantes fueron informados sobre las intervenciones según el grupo al que pertenecerían y los procedimientos para la recolección de muestras. Todos los participantes proporcionaron su consentimiento informado por escrito y el estudio se inició después de la aprobación del comité de ética institucional (CEICIEAO-2023-018). El ensayo clínico fue registrado en el University hospital Medical Information Network (UMIN) Center (UMIN), con número de identificación UMIN000053676.

La selección de sujetos incluyó los siguientes criterios de elegibilidad:

- Necesidad de tratamiento de ortodoncia para los grupos II y III.
- No fumadores.
- Sin enfermedades orales o sistémicas.
- Sin prótesis o restauraciones bucales metálicas.
- Mucosa oral clínicamente sana.
- Sin tratamiento de ortodoncia previo.
- Ninguna exposición ocupacional a metales.
- No tomar medicamentos o suplementos.
- Sin alergias conocidas a joyas, relojes o fuentes de níquel y cromo.
- Ausencia de *piercings* en la boca.

Los sujetos fueron evaluados inicialmente con un cuestionario para verificar el cumplimiento de los criterios del estudio y luego evaluados clínicamente para confirmar la ausencia de restauraciones metálicas y patologías de la mucosa oral. Se realizó una historia clínica y se consideraron las siguientes variables: edad, sexo, índice de masa corporal (IMC), frecuencia de cepillado de dientes, ocupación (estudiante u otra), antecedentes familiares de cáncer, fumador pasivo y consumo

de alcohol.

Los sujetos incluidos se dividieron en tres grupos (Fig. 2) de la siguiente manera:

- GI - Grupo control sin ninguna intervención (n = 10).
- GII - Grupo con aparatos fijos de ortodoncia (n = 10).
- GIII - Grupo con aparatos fijos de ortodoncia y suplementación con ácido fólico (n = 10).

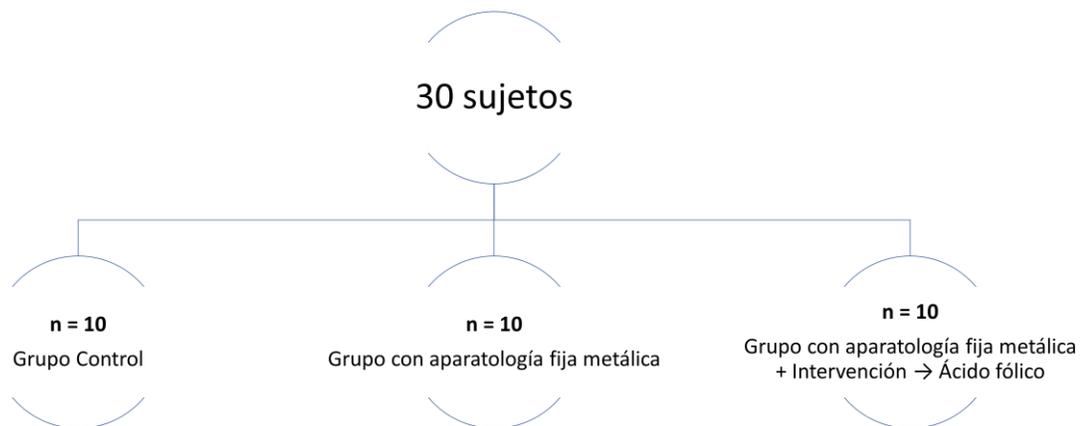


Fig. 2. Diagrama de flujo que muestra el diseño experimental.

Los pacientes fueron asignados aleatoriamente para los grupos GII y GIII. Para los grupos que requirieron tratamiento de ortodoncia (GII, GIII), se colocaron aparatos de ortodoncia fijos en ambas arcadas, consistentes en un juego de *brackets* metálicos con ranura 0.022", tubos directos, arcos de níquel-titanio (NiTi) y módulos elastoméricos (todos American Orthodontics, Sheboygan, WI, EE. UU.). Los pacientes del GIII recibieron suplementación (Fig. 3) de 400 mcg/día/3 meses de ácido fólico (Valdecasas, Ciudad de México, México) a partir del tercer mes. La dosis administrada a cada paciente se determinó en función de la edad y las cantidades diarias promedio recomendadas, expresadas en microgramos (mcg) de equivalentes de folato dietético (DFE) de acuerdo con el National Institutes of Health (NIH) <sup>51</sup>. Para todos los grupos se tomaron un total de cuatro muestras de células orales exfoliadas, al inicio (T0) y posteriormente al mes (T1), tres meses (T2) y seis meses (T3) después del primer muestreo.



Fig. 3. Suplemento de ácido fólico indicado en los sujetos del GIII. Fuente: propia.

#### 11.1.6.2. Genotoxicidad medida por el ensayo de micronúcleos (MN) en células orales exfoliadas

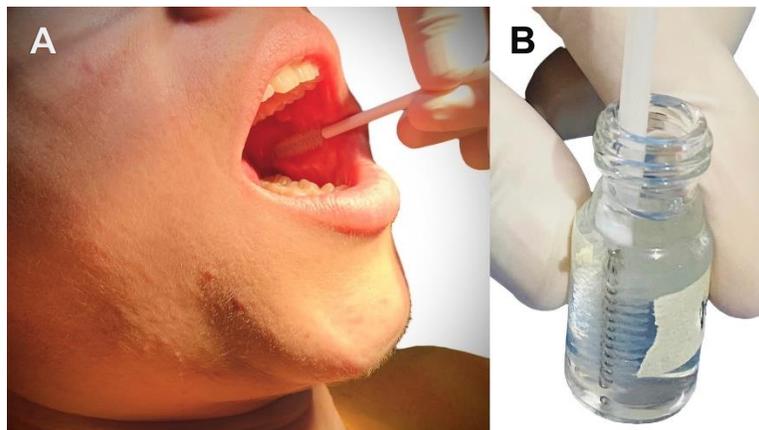


Fig. 4. A. Recolección de células de la mucosa oral mediante cepillo para citología. B. Almacenamiento de células en solución preservadora. Fuente: propia.

Las células de la mucosa oral exfoliadas para análisis de micronúcleos se recolectaron de las mejillas derecha e izquierda. Se pidió a los pacientes enjuagarse la boca minuciosamente 2 veces con 100 ml de agua y la muestra se tomó frotando el interior de cada mejilla con un cepillo para citología sin tocar los dientes ni la lengua durante 10 veces haciendo un movimiento circular, empezando en el medio e incrementando gradualmente la circunferencia para producir un efecto de espiral. Las muestras fueron almacenadas en una solución preservadora de células

(ThinPrep PreservCyt Solution, Hologic Inc., Marlborough, MA, EE. UU.) a 4°C hasta su posterior procesamiento en laboratorio (Fig. 4) mediante la técnica descrita por Carrillo y colaboradores <sup>86</sup>.

Las células bucales exfoliadas se extendieron sobre portaobjetos de vidrio mediante el siguiente protocolo para cada muestra: en un tubo falcón de 15 ml se colocaron 3 ml de solución buffer, y se adicionaron 3 ml de la muestra previamente vortexeada durante 30 s; posteriormente se centrifugó a 2000 rpm durante 5 min, se decantaron 3 ml de sobrenadante y se ajustó al doble del volumen de las células con agua destilada, mezclando de nuevo para obtener una muestra homogénea. En un portaobjetos se colocó 1 gota de solución de adherencia celular, se extendió uniformemente con otra laminilla y se montó sobre un equipo de sedimentación celular (SED-12, Zitobalik, Ciudad de México, México), se adicionaron 2 ml de muestra en el portaobjetos y se dejó sedimentar durante 5 min. Se eliminó el sobrenadante cuidadosamente, se colocó etanol de 96° durante 2 min, se eliminaron los excedentes de alcohol y se dejó secar la laminilla a temperatura ambiente. Una vez secas las muestras se tiñeron utilizando una tinción de papanicolaou PAP (HYCEL, Ciudad de México, México), como ha sido utilizada en otros estudios sobre anomalías nucleares <sup>87-90</sup>, de acuerdo con el protocolo estándar (Fig. 5).



**Fig. 5.** A. Solución de adherencia celular. B. Portaobjetos con muestras en equipo de sedimentación celular. C. Muestras teñidas con tinción de papanicolaou PAP. **Fuente:** propia.

Las laminillas fueron observadas en un microscopio óptico (Nikon, Tokyo, Japón) a 100 aumentos de magnificación. Se evaluaron 1000 células por cada muestra para determinar la frecuencia de células basales y diferenciadas, binucleadas, picnosis, cromatina condensada, cariorrexis y cariólisis. La frecuencia de los biomarcadores de daño del ADN (micronúcleos y núcleo lobulado) se puntuó en 2000 células diferenciadas. Los criterios para la identificación y puntuación de micronúcleos y anomalías nucleares en células basales y diferenciadas se consideraron de acuerdo con lo sugerido por Thomas *et al.*<sup>91,92</sup>, como se describe a continuación:

- **Células basales:** núcleo grande con un radio de citoplasma similar al de las células diferenciadas y se tiñe uniformemente. La célula es más pequeña y oval que una diferenciada.
- **Células diferenciadas:** núcleo redondeado y más pequeño respecto al radio del citoplasma que se tiñe uniformemente. La célula presenta una forma más angular y plana que las células basales.
- **Micronúcleos (MN):** de forma oval o redondeada, con intensidad de la tinción similar a la del núcleo principal, diámetro entre 1/3 y 1/16 del núcleo principal, se deben encontrar contenidos en el citoplasma y se puntúan en células basales y diferenciadas solamente.
- **Núcleo lobulado (NL):** el núcleo principal presenta una constricción marcada formando un brote. El brote se encuentra unido al núcleo principal, tienen una tinción similar y un diámetro entre 1/4 y 1/2 del núcleo principal.
- **Binucleada (BN):** la célula contiene dos núcleos en su citoplasma. Los núcleos presentan similar tamaño e intensidad de la tinción.
- **Picnosis (PC):** la célula presenta un núcleo contraído, uniforme e intensamente teñido. El diámetro del núcleo es de 1/3 a 2/3 de un núcleo normal.
- **Cromatina condensada (CC):** el núcleo muestra áreas de cromatina agregada con un patrón estriado. Algunas áreas del núcleo se muestran más intensamente teñidas.
- **Cariorrexis (CR):** el núcleo presenta cromatina condensada extensamente, y puede ser evidente la fragmentación del núcleo.

- **Cariólisis (CL):** el núcleo se encuentra vacío de ADN y no se tiñe.

Los micronúcleos y las anormalidades nucleares se puntuaron individualmente y también fueron agrupados de acuerdo con el tipo de daño celular: daño del ADN (micronúcleos y núcleo lobulado), citocinesis (binucleada) y muerte celular (picnosis, cromatina condensada, cariorrexis y cariólisis).

## **11.2. Consideraciones bioéticas**

Esta investigación se adhirió a los principios éticos establecidos para la investigación médica en seres humanos según la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial (64ª Asamblea General, octubre de 2013). El Artículo 7 de este documento establece que "la investigación médica está sujeta a normas éticas destinadas a promover y garantizar el respeto por todos los seres humanos y a proteger su salud y sus derechos individuales" <sup>93</sup>.

### **11.2.1. Fase 1**

Se cumplió con las leyes y regulaciones vigentes en México, resaltando las siguientes consideraciones estipuladas en el reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación en Salud. Según lo establecido en el Artículo 17, esta fase de la investigación se considera "de riesgo mínimo", dado que implicó el manejo de células cultivadas en laboratorio y materiales de uso ortodóncico de manera *in vitro*.

Además, se garantizó en todo momento la integridad de los investigadores mediante la implementación de las medidas de seguridad establecidas en el Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria en el área de Nanoestructuras y Biomateriales de la Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES) – Unidad León. Los experimentos que involucraron el manejo de células y organismos biológicos se llevaron a cabo en campanas de flujo laminar, siguiendo los más altos estándares de calidad y bioseguridad (según NOM-010-STPS-2014, NOM-210-SSA1-2014, ISO 10993-5:1999 y CLSI). En cuanto al investigador, se siguieron las normativas establecidas en el reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, específicamente en el título cuarto sobre la bioseguridad de las investigaciones, y en el capítulo I relacionado con la investigación que involucra microorganismos patógenos o material biológico que pueda contenerlos, como se describe en los artículos 75 y 77 <sup>94</sup>.

### 11.2.2. Fase 2

La recolección de células de la mucosa oral exfoliadas, llevada a cabo mediante raspado de las mejillas con cepillo citológico, no ocasionó ningún perjuicio a los participantes en el estudio. Asimismo, se garantizó la protección de los participantes en concordancia con el Artículo 9 de la Declaración de Helsinki, asegurando su integridad, salud, privacidad y dignidad, y manteniendo la confidencialidad de su información personal. La participación en el estudio fue completamente voluntaria, y cada individuo recibió información detallada sobre el proyecto de investigación y su rol en el mismo, en línea con el Artículo 26. Todas las inquietudes relacionadas con los objetivos, métodos, manejo de las muestras, posibles beneficios, entre otros aspectos, fueron abordadas por el investigador o el ortodoncista a cargo, garantizando así una comprensión total de la información por parte de los participantes <sup>93</sup>.

Según lo estipulado en el Artículo 17 de la Ley General de Salud en Materia de Investigación en Salud, esta fase de la investigación fue catalogada como de "riesgo mínimo", dado que implicó la obtención de células de la mucosa oral exfoliadas mediante el uso de un cepillo citológico, así como la suplementación con ácido fólico en el grupo III. Es importante señalar que el ácido fólico no es un medicamento, sino una vitamina B esencial para todos los seres humanos. En el caso de pacientes mayores de edad, se aseguró que firmaran, junto con dos testigos, un documento de consentimiento informado que cumplía con los requisitos establecidos en el Artículo 22. Para los pacientes menores de edad, se obtuvo su firma en un documento de asentimiento informado de acuerdo con lo dispuesto en el Artículo 37, mientras que su representante legal y dos testigos firmaron el consentimiento informado que cumplía con los requisitos del Artículo 22. En cuanto al investigador, se adhirió a las normas descritas en los artículos 75 y 77 <sup>94</sup>, como se mencionó antes.

### **11.3. Análisis estadístico**

#### **11.3.1. Fase 1**

Para todas las pruebas se calcularon las medias y las desviaciones estándar y se realizaron pruebas de normalidad. Un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguido del *post-hoc* de Tukey fue utilizado para comparar los resultados de citotoxicidad, diferenciación odontoblástica y resistencia al descementado. Se utilizó una prueba de chi-cuadrada para determinar diferencias significativas en las puntuaciones del índice adhesivo remanente. Los valores de microdureza se analizaron mediante ANOVA seguido de un *post-hoc* de Scheffé. Se consideró un nivel de significancia de  $p \leq 0.05$  para todas las pruebas estadísticas.

#### **11.3.2. Fase 2**

Se obtuvieron datos descriptivos y se realizaron pruebas de normalidad de Shapiro Wilk. Las diferencias entre los grupos se calcularon mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y *post-hoc* de Dunn con ajuste de Bonferroni comparando cada intervalo de tiempo, T0, T1, T2 y T3. El número de anomalías nucleares se presentó como promedios  $\pm$  desviación estándar. También se empleó un análisis de regresión de Poisson para examinar el impacto de las variables predictoras (edad, sexo, índice de masa corporal, frecuencia de cepillado, ocupación, historia familiar de cáncer, fumador pasivo y consumo de alcohol) sobre las variables dependientes (cantidad total en cada individuo de micronúcleos, núcleos lobulados, células binucleadas, picnosis, células con cromatina condensada, cariorrexis y cariólisis) acumuladas en todos los tiempos de muestreo (T0+T1+T2+T3). Las diferencias se consideraron significativas al nivel de  $p \leq 0.05$ .

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico SPSS 25 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.).

## 12. Resultados

### 12.1. Primer artículo: carta de aceptación.

**Decision Letter (JOS-24-0061.R4)**

**From:** jos@nihon-u.ac.jp  
**To:**  
**CC:**  
**Subject:** Journal of Oral Science - Decision on Manuscript ID JOS-24-0061.R4  
**Body:** 18-Jun-2024

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Assessment of cytotoxicity, odontoblast-like differentiation, shear bond strength, and microhardness of four orthodontic adhesive composites" for publication in the Journal of Oral Science.

A copyright form is included in this letter. Please return the completed and signed form to the editorial office.

Copyright Transfer Agreement: <https://mc.manuscriptcentral.com/societyimages/josnusd/Transfer%20Copyright%20Agreement.docx>

Thank you for your contribution. On behalf of the Editors of the Journal of Oral Science, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,

Editor-in-Chief, Journal of Oral Science  
jos@nihon-u.ac.jp

### 12.2. Segundo artículo: carta de envío.

[KJO-24-101] Your manuscript has been admitted for review.

**De:** The Korean Journal of Orthodontics <office@e-kjo.org>

**Fecha:** 29 de mayo de 2024, 8:09:08 p.m. GMT-6

**Asunto:** [KJO-24-101] Your manuscript has been admitted for review.

**Responder-Para:** office@e-kjo.org

Your manuscript has been admitted for review.

You can check the status of the manuscript at the KJO homepage Manuscript Submission System. If you have any further question, please contact the KJO office via email [office@e-kjo.org](mailto:office@e-kjo.org) or call .

Thank you.

- **Manuscript ID :** KJO-24-101
- **Manuscript Title :** Effect of folic acid supplementation on the frequency of micronuclei and nuclear anomalies in oral mucosa cells in patients undergoing fixed orthodontic treatment
- **Abstract**  
Objective: To determine and compare the frequency of micronuclei and nuclear anomalies in buccal mucosa cells in patients undergoing fixed orthodontic treatment supplemented with folic acid (FA). Methods: 30 healthy subjects were included in this study and were divided into three groups: GI control (n=10), GII fixed orthodontic appliances (n=10), and GIII fixed orthodontic appliances and folic acid supplementation (n=10). Conventional metal brackets and tubes were placed in groups GII and GIII along with nickel-titanium (NiTi) archwires and elastic modules (all American Orthodontics, Sheboygan, WI, USA). GIII was supplemented with 400 mcg/day/3 months of folic acid starting from the third month. Control group (GI) remained without any intervention. A baseline sample (T0) was taken, and subsequently one month (T1), three months (T2), and six months later (T3), and cells were evaluated using a micronucleus assay. The influence of different predictor variables was also assessed. Results: Individuals with fixed orthodontic appliances exhibited a higher frequency of micronuclei compared to the control group ( $p \leq 0.001$ ). Individuals with fixed orthodontic appliances supplemented with folic acid showed a significant reduction in micronuclei compared to the group with fixed appliances ( $p \leq 0.05$ ) and a similar expression to the control group. Conclusions: Supplementation with folic acid at usual doses may be beneficial in patients undergoing orthodontic therapy by reducing the frequency of micronuclei and other nuclear anomalies.

## 13. Discusión

El objetivo de esta investigación fue evaluar y comparar la citotoxicidad, diferenciación odontoblástica, resistencia al descementado y microdureza de cuatro resinas de ortodoncia, así como evaluar el efecto de la suplementación con ácido fólico en pacientes con aparatos fijos de ortodoncia mediante el ensayo de micronúcleos y anomalías nucleares, el cual no había sido abordado en la literatura, a nuestro mejor entendimiento.

Debido a que el estudio *in vivo* se inició durante el periodo de pandemia y el avance era incierto se decidió además realizar un estudio *in vitro* que explorara las propiedades citotóxicas de resinas de ortodoncia y a la vez diera continuidad al trabajo realizado previamente en maestría sobre citotoxicidad de aparatología fija metálica. Las pruebas de resistencia al descementado, índice adhesivo remanente y microdureza complementaron la temática fundamental, y por tanto no se incluyeron en el título, pero sí enriquecieron la primera publicación.

### 13.1. Fase 1

Es importante investigar diferentes características de los adhesivos utilizados en ortodoncia. La toxicidad de estos materiales es una de ellas, debido a su proximidad con los tejidos blandos y el esmalte, así como el período prolongado en el cual permanecen en los dientes de los pacientes. Se ha reportado previamente que existe una cantidad variable de monómeros que no polimerizan, y que la elución de estos monómeros residuales causa algún grado de toxicidad <sup>7</sup>. El Bis-GMA es uno de los principales monómeros contenidos en las resinas ortodóncicas y el que más frecuentemente presenta potencial tóxico. En este estudio, se evaluó la citotoxicidad de los extractos adhesivos de cuatro resinas ortodóncicas fotopolimerizables sobre células madre de pulpa dental humana (hDPSC), encontrando que el nivel de citotoxicidad de estas resinas varió de moderado a severo. Ahrari *et al.* <sup>95</sup> reportaron un nivel de citotoxicidad entre no citotóxico y moderadamente citotóxico en tres resinas ortodóncicas (Unite [3M Unitek], Denfil Flow [Vericom Laboratories Ltd.,

Anyang, República de Corea], y Transbond XT [3M Unitek]) sobre fibroblastos orales humanos. Por otro lado, Jonke *et al.*<sup>96</sup> reportaron la citotoxicidad de cuatro sistemas adhesivos ortodóncicos (Light Bond [Reliance Orthodontic Products, Itasca, IL, USA], Enlight [Ormco], Concise y Transbond XT [ambos de 3M Unitek]) en la línea celular de fibroblastos murinos L-929, encontrando un nivel ligero de citotoxicidad, mientras que en este estudio la citotoxicidad estuvo entre moderada y severa para la concentración del 100% de los extractos. Malkoc *et al.*<sup>97</sup> evaluaron cinco *composites* ortodóncicos y reportaron una viabilidad celular entre  $87.03 \pm 10.66\%$  y  $91.94 \pm 11.58\%$  para fibroblastos murinos L-929, lo cual indicaría que van desde ligeramente citotóxicos hasta no citotóxicos. En dicho estudio mencionaron que Transbond XT fue el más citotóxico, en contraste con los resultados de este estudio donde Transbond XT causó la menor citotoxicidad. Heravi *et al.*<sup>98</sup> evaluaron la resina Transbond XT con y sin nanopartículas de dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>) y reportaron una viabilidad celular del  $36 \pm 6.53\%$  y  $63.1 \pm 5.9\%$  para fibroblastos gingivales humanos (HGF) y fibroblastos murinos L-929, respectivamente. Estos resultados son muy similares a los reportados en este estudio para el caso específico de Transbond XT, considerando que la extracción de eluyentes de monómero también corresponde a 24 horas. GIV presentó la mayor citotoxicidad entre los adhesivos evaluados. Según el fabricante, entre sus componentes se encuentra UDMA (dimetacrilato de uretano), uno de los monómeros que previamente se ha reportado como causante de mayor toxicidad<sup>99</sup>. Sin embargo, Transbond XT que contiene Bis-GMA, también mencionado como uno de los monómeros con mayor potencial tóxico, mostró menor citotoxicidad, aunque no hubo diferencias estadísticas entre ellos. Las diferencias en los resultados pueden explicarse por varias razones, entre ellas los diferentes adhesivos estudiados, los períodos de extracción de los eluyentes adhesivos, las concentraciones probadas y las líneas celulares utilizadas. La ISO recomienda una relación de área superficial a volumen entre 0.5 a 6.0 cm<sup>2</sup>/ml para generar extractos para pruebas en células cultivadas, y la relación reportada en cada estudio fue diferente, por lo que la concentración y la citotoxicidad generada podrían ser muy diferentes. Las resinas incluidas en cada estudio tienen diferentes monómeros y por lo tanto los

componentes pueden influir en los resultados; el porcentaje en peso (Wt%) y el tipo de monómeros reportados por los fabricantes de las resinas evaluadas en este estudio varían desde Bis-GMA, PEGDMA (polietilenglicol dimetacrilato), TMSPPMA (3-[trimetoxisilil] metacrilato), GMA (metacrilato de glicidilo) y UDMA, y el Wt% de los monómeros combinados varía de 18 a 30. Una de las principales diferencias de esta investigación con respecto a otras es el uso de células madre de pulpa dental humana (hDPSC); la importancia de evaluar la citotoxicidad en estas células radica en que se ha informado que los eluyentes de monómero tienen la capacidad de difundirse a través de la capa de dentina y llegar a las células pulpares <sup>100-102</sup>, con la probabilidad de causar algún grado de daño pulpar, y prácticamente no existían estudios donde se hubieran considerado las hDPSC para evaluar la citotoxicidad de resinas ortodóncicas.

Se sabe que las hDPSC tienen el potencial de diferenciarse hacia varias líneas celulares; cuando se induce la diferenciación hacia células similares a odontoblastos, secretan matriz extracelular e inician la mineralización. La tinción de rojo alizarina puede detectar la formación de depósitos de calcio y se considera uno de los estándares de diferenciación de células madre de pulpa dental *in vitro*. Los resultados obtenidos en este estudio indican que GI, GII y GIII produjeron más depósitos de calcio en comparación con el control, y solo GIV indujo menos depósitos que el control. Ningún otro estudio ha utilizado este ensayo para evaluar resinas ortodóncicas, sin embargo, los resultados de este estudio pueden ser comparables con los obtenidos en otros estudios <sup>103,104</sup> donde se evaluó el efecto de compuestos de vidrio bioactivo mesoporoso/nanopartículas de óxido de grafeno sobre la mineralización de hDPSC, en los cuales se encontró que las resinas evaluadas produjeron una mayor cantidad de depósitos de calcio en comparación con los controles. Estos resultados sugieren que los *composites* ortodóncicos estudiados pueden promover la mineralización durante la diferenciación de odontoblastos, incluso más que el control, lo cual se consideraría una buena propiedad biológica.

Los *attachments* son pequeños dispositivos de resina que se adhieren a algunos dientes durante un tratamiento con alineadores para tener un mejor control y previsibilidad sobre el movimiento de los dientes. Se han utilizado diferentes tipos de *composites* para fabricar estos *attachments* y es importante evaluar su resistencia de adhesión a la superficie del esmalte, ya que están sujetos a fuerzas de oclusión. En este estudio se evaluaron cuatro resinas ortodóncicas que normalmente se utilizan para adherir *brackets* a la superficie del diente como *attachments* de resina. Su uso en este contexto podría justificarse porque son resinas con una viscosidad y carga de relleno más alta en comparación con las resinas fluidas que se usan frecuentemente para estos propósitos, por lo tanto, resisten mejor las fuerzas a las que están sujetas. La mayoría de los estudios reportan la resistencia al descementado de *brackets* con diferentes *composites*, pero hay poca información sobre la resistencia de adhesión para los *attachments* de resina en terapia con alineadores transparentes, y prácticamente no había estudios donde los *composites* propuestos en este estudio hayan sido evaluados como materiales para *attachments*. En el presente estudio se encontraron diferencias significativas en la resistencia al descementado entre los grupos III y IV. Kircelli *et al.*<sup>105</sup> evaluaron la resistencia al descementado de cinco *composites* utilizados en la producción de *attachments* para alineadores, dos de ellos de alta viscosidad y tres fluidos, y reportaron valores medios de resistencia al descementado que variaron de  $16.6 \pm 3.6$  a  $21.0 \pm 4.0$  MPa, encontrando diferencias significativas entre los grupos, sin embargo, ninguno de esos *composites* evaluados se incluyó en el presente estudio. Arieli *et al.*<sup>106</sup> evaluaron la resistencia al descementado de *brackets* metálicos con cuatro materiales adhesivos, incluido Transbond XT, en diferentes intervalos de tiempo. Para Transbond XT en el intervalo de descementado de 24 horas, se reportó un valor de resistencia al descementado de  $8.1 \pm 2.3$  MPa, siendo mayor al obtenido en este estudio, sin embargo, los otros materiales probados son diferentes. En otro estudio<sup>107</sup>, se evaluó la resistencia al descementado y el índice adhesivo remanente (ARI) de siete *brackets* metálicos diferentes, todos adheridos con Transbond XT, y los resultados variaron de  $3.8 \pm 3.9$  (Morelli, Sorocaba, São Paulo, Brasil) a  $9.8 \pm 5.1$  MPa

(Tecnident, São Carlos, São Paulo, Brasil), y los puntajes de ARI más altos fueron entre 0 y 1. Según lo reportado en múltiples estudios, se puede suponer que hay varios factores que influyen en la resistencia al descementado, como la superficie sobre la cual se prueban los materiales (esmalte, porcelana, materiales cerámicos), los dientes seleccionados (premolares, molares, incisivos), el tipo de material de grabado (grabado ácido, autograbado, abrasión con aire, láseres), los sistemas de curado de luz y los tiempos (luz de alta/baja intensidad, luz halógena), tipos de *brackets* (metálicos, cerámicos), diseño y tamaño de la base del *bracket*, y los adhesivos utilizados (*composites*, ionómeros de vidrio), entre otros. Independientemente de las condiciones de cada estudio, ha sido ampliamente aceptado que clínicamente una resistencia de adhesión ortodóncica apropiada está entre 6 y 8 MPa, como fue propuesto por Reynolds <sup>108</sup>, lo cual se cumplió sólo para Blugloo en este estudio. Los resultados de ARI indicaron que la puntuación 1 (menos del 50% de adhesivo remanente en el esmalte) fue la más frecuente para todos los grupos juntos. Esto podría ser beneficioso ya que significaría que después de despegar los *attachments* habría menos adhesivo remanente en el esmalte para ser removido, previniendo pérdida o daño al esmalte y ahorrando tiempo en el sillón dental.

La evaluación de la dureza Vickers en resinas ortodóncicas es valiosa porque se sabe que valores de dureza más altos están asociados con un mayor contenido de partículas de carga, y a su vez, con una mayor resistencia al desgaste <sup>109</sup>. En cuanto a los resultados de microdureza de esta investigación, se encontraron diferencias significativas entre los adhesivos evaluados, excepto entre GII y GIV. Yilmaz *et al.* <sup>110</sup> estudiaron algunas propiedades físicas y mecánicas de tres adhesivos ortodóncicos (Transbond XT [3M Unitek], Grēngloo [Ormco], y Light Bond Paste [Reliance Orthodontic Products]), curados con diferentes unidades de luz. En el caso de Transbond XT, reportaron niveles de dureza entre  $47.3 \pm 3.6$  HV y  $50.6 \pm 3.2$  HV, mientras que en este estudio la media para el mismo adhesivo fue mayor; en otro estudio <sup>111</sup>, donde evaluaron los efectos de la luz halógena convencional e de alta intensidad sobre la sorción de agua y la microdureza, reportaron un valor

entre  $55.10 \pm 2.46$  HV y  $55.42 \pm 2.70$  HV para la resina mencionada. Las variaciones en los resultados podrían estar relacionadas con el uso de diferentes unidades de luz y al grosor de los discos evaluados, ya que en el primer estudio prepararon especímenes de 5 mm de diámetro y 2 mm de grosor, en el segundo mencionaron 8.5 mm de diámetro y 2 mm de grosor, mientras que en este estudio se probaron discos de resina de 10 mm de diámetro y 1 mm de grosor, por lo que el haz de luz podría haber penetrado más profundamente y producido un mejor nivel de polimerización. Los resultados de dureza de los otros adhesivos evaluados (en este y en otros estudios) pueden no ser comparables dado que son diferentes en composición y características.

En algunos estudios también se ha mencionado que el color de la resina puede influir en el nivel de polimerización y por lo tanto en la microdureza <sup>112</sup>; Jafari *et al.* <sup>113</sup> evaluaron la microdureza de resinas de diferentes colores (azul, verde, limón, dorado, plateado y rosa) y reportaron que el color azul presentó el nivel más bajo de dureza y, por el contrario, el color plateado obtuvo el mayor grado de polimerización, mientras que los otros colores exhibieron valores promedio de microdureza. En el presente estudio se evaluaron dos resinas que cambian de color; Transbond Plus Color Change es un adhesivo rosa que facilita la eliminación del exceso durante la colocación del *bracket* y cambia a un color similar al diente cuando se fotopolimeriza; Blugloo, por su parte, es una resina azul que también mejora la eliminación de excesos durante la adhesión del *bracket*, y además, la eliminación de restos durante el descementado, ya que al ser fotopolimerizada y alcanzar la temperatura del paciente se vuelve transparente y permanece así, y durante el descementado se aplica agua o aire frío y vuelve a cambiar a azul para facilitar la limpieza. La microdureza para GII y GIV fue similar, y solo entre estos dos adhesivos no hubo diferencias significativas. Esta similitud en microdureza podría estar relacionada con la propiedad de cambio de color que poseen ambas resinas.

## 13.2. Fase 2

El objetivo de esta fase fue determinar y comparar la frecuencia de micronúcleos y anomalías nucleares en células de mucosa bucal en pacientes sometidos a tratamiento ortodóncico fijo suplementado con ácido fólico (AF), un aspecto que, según nuestro mejor entendimiento, no había sido abordado previamente en la literatura.

Estudios anteriores han considerado los efectos citotóxicos y genotóxicos de los materiales utilizados en tratamientos ortodóncicos como causas aisladas; sin embargo, la formación de MN y alteraciones nucleares en pacientes con aparatos fijos puede estar relacionada a la combinación de diferentes materiales utilizados, principalmente sistemas adhesivos a través de la excreción de monómeros residuales, y metales contenidos en *brackets* y arcos mediante la liberación de iones metálicos. Además, varios estudios han evaluado los efectos tóxicos de estos materiales *in vitro*, y aunque sus contribuciones son valiosas, no simulan las condiciones de la cavidad oral debido a que es un entorno complejo acompañado de factores como temperatura, pH, higiene, dieta, etc. Por lo tanto, los estudios *in vivo* son muy beneficiosos para estimar el impacto de los aparatos ortodóncicos en el entorno natural, aunque la interpretación de los resultados sigue siendo desafiante debido a muchos factores que pueden modificar la respuesta en cada individuo.

En esta investigación, se comparó la frecuencia de alteraciones nucleares en tres grupos diferentes durante un período de seis meses. Los resultados sobre el daño al ADN en esta investigación son consistentes con lo que otros autores han reportado respecto al aumento de MN y anomalías nucleares en sus estudios. Natarajan *et al.*<sup>114</sup> compararon la frecuencia de MN en un grupo que había recibido tratamiento con aparatos fijos y un grupo control en dos momentos, al momento de la remoción de los aparatos y un mes después, encontrando diferencias significativas en el primer momento, atribuyendo a los efectos genotóxicos de los aparatos ortodóncicos. Faccioni *et al.*<sup>115</sup> informaron daño al ADN en células de

mucosa oral en pacientes que habían recibido tratamiento ortodóncico durante 2-4 años en comparación con sujetos sin tratamiento. Toy *et al.* <sup>116</sup> realizaron un seguimiento de 6 meses en pacientes sometidos a tratamiento ortodóncico para evaluar la formación de MN, BN, CL y CR de tres adhesivos ortodóncicos fotocurados en células epiteliales bucales. Encontraron un aumento entre las etapas de tiempo para MN y CR, aunque no significativo, y para BN y CL encontraron aumentos significativos. Carrillo *et al.* <sup>86</sup> analizaron la frecuencia de anomalías nucleares antes de la colocación de aparatos ortodóncicos, así como a los 25 y 90 días después, encontrando un aumento significativo en MN, NL y CC en diferentes etapas. Westphalen *et al.* <sup>117</sup> reportaron un aumento significativo en MN 30 días después de la colocación de aparatos fijos. Por otro lado, algunos autores han reportado no encontrar cambios significativos en sus estudios; Heravi *et al.* <sup>118</sup> compararon la frecuencia de MN en un grupo de pacientes antes de la colocación de aparatos fijos y 9 meses después y no encontraron diferencias significativas. Angelieri *et al.* <sup>71</sup> evaluaron la cantidad de MN y parámetros de muerte celular (CR, PC, CL) antes, durante y después de la colocación de aparatos fijos y no reportaron cambios significativos entre las mediciones. Flores-Bracho *et al.* <sup>119</sup> reportaron que no hubo diferencias significativas en la cantidad de anomalías nucleares (BN, trinucleadas, CL, PC, NL), excepto para CL al comparar un grupo control sin tratamiento y 4 grupos de pacientes con tratamiento ortodóncico en diferentes tiempos de tratamiento.

Las diferencias entre los resultados pueden explicarse por diferentes factores. Algunos estudios compararon longitudinalmente solo un grupo de pacientes, <sup>71,86,116-118</sup> mientras que otros siguieron dos o más grupos, <sup>114,115,119</sup> y los compararon en diferentes etapas. Además, los diseños de estudio variaron, con recolección de muestras en diferentes tiempos y seguimiento de los grupos que variaron desde aproximadamente un mes después de la colocación de aparatos fijos hasta pacientes con cuatro años de tratamiento. El tamaño de la muestra, las características sociodemográficas y los criterios de inclusión de los sujetos de cada estudio también son variables que pueden afectar la expresión de anomalías

nucleares y, por lo tanto, los resultados. Basado en lo anterior, se puede inferir que la expresión de alteraciones nucleares y su frecuencia resultan de una compleja sinergia entre los aparatos ortodóncicos, incluida la liberación de iones metálicos y monómeros residuales, y la interacción de estos materiales con las condiciones locales, así como otros factores que pueden no haber sido considerados en los estudios.

Anteriormente, se ha estudiado la suplementación con vitaminas como AF, vitamina B12 y vitamina C. Estas vitaminas actúan como sustancias protectoras, limitando o revirtiendo los efectos genotóxicos de agentes como medicamentos anticancerígenos <sup>120</sup> y compuestos tóxicos del tabaco en fumadores, <sup>4</sup> así como en pacientes con insuficiencia renal terminal <sup>5</sup> y diabetes mellitus tipo 2, <sup>6</sup> entre otros. Respecto a la suplementación con AF, varios estudios han reportado su uso en diferentes dosis en pacientes con diversas condiciones de salud con resultados beneficiosos en la reducción de MN y otras alteraciones nucleares, pero no hay informes en pacientes sometidos a tratamiento ortodóncico. Los resultados de esta investigación sobre la reducción de MN después de la suplementación con AF (400 mcg/día/3 meses) son consistentes con los reportados por otros autores sobre el uso de AF en diferentes contextos. Kharisma *et al.* <sup>4</sup> reportaron que la suplementación con AF en dosis habituales (400 mcg y 1000 mcg) durante tres semanas redujo significativamente la cantidad de MN en fumadores. Stopper *et al.* <sup>5</sup> investigaron el efecto de la suplementación con 15 mg de AF tres veces por semana durante 17 semanas en pacientes sometidos a hemodiálisis sobre la frecuencia de MN y observaron una disminución significativa a las 4, 12 y 17 semanas en comparación con el inicio del estudio. En el caso de pacientes diabéticos, varios estudios han reportado el uso de AF. Lazalde-Ramos *et al.* <sup>6</sup> encontraron una disminución significativa en MN y marcadores de estrés oxidativo (8-hidroxi-2'-desoxiguanosina [8-OHdG] y peróxidos lipídicos) en individuos con diabetes mellitus tipo II después de ser suplementados con 5 mg de AF tres veces al día durante 30 días, en comparación con un grupo control. Zúñiga-González *et al.* <sup>121</sup> reportaron una disminución significativa en MN en pacientes diabéticos

después de ser suplementados durante 30 días con 5 mg de AF tres veces al día. Gómez-Meda *et al.*<sup>122</sup> analizaron la frecuencia de anomalías nucleares (MN, BN, PC, CC, CR, CL y NL) en pacientes con diabetes mellitus tipo I y tipo II, tanto controlados como no controlados, antes y después de ser suplementados con 5 mg de AF tres veces al día durante 30 días y reportaron una disminución significativa en anomalías nucleares en general.

Los resultados reportados en este estudio y por otros investigadores sobre el uso de AF generalmente indican que puede tener efectos beneficiosos en la reducción de MN y otras alteraciones nucleares en pacientes con diferentes condiciones. Las dosis utilizadas y los tiempos de administración en esta y otras investigaciones son variables; las dosis administradas en este estudio se basaron en las cantidades diarias recomendadas, ya que los participantes eran individuos sistémicamente saludables, y no se justificó la administración de dosis más altas. El uso de dosis más altas en otros estudios puede justificarse por las condiciones de los individuos bajo estudio, sin embargo, el uso de dosis mucho mayores de lo recomendado puede tener efectos adversos, como ocultar una deficiencia de vitamina B12 al corregir la anemia, pero no el daño permanente en el cerebro, la médula espinal o los nervios que también causa la deficiencia. También se sabe que dosis altas de AF pueden aumentar el riesgo de cáncer colorrectal y probablemente otros cánceres.<sup>60-62</sup> Por otro lado, se ha reportado que las personas con niveles bajos de folato pueden ser más propensas a la depresión o pueden no responder adecuadamente al tratamiento antidepresivo por la misma razón.

Respecto a la influencia de las variables predictoras, en general, se identificó una asociación positiva entre algunas anomalías nucleares y ser mujer, tener un IMC >30 (obesidad), tener antecedentes familiares de cáncer y ser fumador pasivo. Por otro lado, no se encontró una asociación entre la expresión de anomalías nucleares y la edad, la frecuencia del cepillado dental, la ocupación y el consumo de alcohol. Al igual que los hallazgos de esta investigación, otros autores han reportado una mayor frecuencia de MN en mujeres.<sup>123,124</sup> La obesidad se considera un factor de

riesgo para el desarrollo de enfermedades como la diabetes mellitus tipo II, hipertensión, accidente cerebrovascular, depresión, apnea obstructiva del sueño, enfermedad coronaria, entre muchas otras.<sup>125</sup> Los resultados respecto a la asociación entre la obesidad y las alteraciones nucleares son consistentes con los reportados en otros estudios.<sup>126</sup> El tabaquismo se ha reportado como inductor de la formación de MN y otras alteraciones nucleares;<sup>127</sup> sin embargo, no se ha explorado extensamente el ser fumador pasivo. Carrillo *et al.* reportaron la ausencia de asociación entre ser fumador pasivo y la frecuencia de alteraciones nucleares,<sup>86</sup> en contraste con lo encontrado en este estudio. En cuanto al consumo de alcohol, no se observó una asociación significativa, consistente con hallazgos previos reportados por Hopf *et al.*<sup>128</sup> Todas estas variables predictoras deben considerarse con precaución, ya que pueden estar influenciadas o relacionadas con otros factores que no se han considerado en este estudio.

## 14. Conclusiones

### 14.1. Fase 1

Dentro de las limitaciones de los estudios llevados a cabo, sobre esta fase, los resultados indican que algunos elementos en la composición de los adhesivos modifican las propiedades evaluadas, pudiendo ser adecuado su uso en determinados casos. Se concluyó que todos los adhesivos causaron citotoxicidad de moderada a severa en hDPSC, y mostraron evidencia comparable de depósitos de calcio cuando se indujo una diferenciación odontoblástica. El valor aceptado de SBS entre 6 y 8 sólo lo obtuvo Blugloo, y Enlight (GIII) mostró la puntuación más baja de microdureza. Transbond Plus Color Change (GII) y Blugloo (GIV) exhibieron un grado similar de microdureza. De acuerdo con estos datos se sugiere que las propiedades evaluadas deben considerarse al seleccionar un adhesivo de ortodoncia, y que Blugloo podría ser una mejor alternativa para la cementación de *brackets* y que podría ser usada para producir *attachments* en la terapia con alineadores, ya que combina un grado adecuado de microdureza, mayor resistencia al descementado, menor remanente de adhesivo en el esmalte y mejor control clínico durante el cementado y descementado, debido al cambio de color que presenta, sin embargo, se recomienda realizar más investigaciones para evaluar el desempeño clínico de estos materiales.

### 14.2. Fase 2

Sobre esta fase los resultados sugieren que los aparatos fijos de ortodoncia causan efectos genotóxicos al aumentar el número de MN y otras alteraciones nucleares en las células bucales exfoliadas, y que la suplementación con ácido fólico en dosis habituales en pacientes con tratamiento de ortodoncia puede disminuir la frecuencia de biomarcadores genotóxicos, sin embargo, se sugiere realizar más investigaciones para confirmar y ampliar estos hallazgos, así como el uso de otras vitaminas, como la vitamina B12 y la vitamina C, y la influencia de otras variables probablemente asociadas.

## 15. Referencias

1. Heravi F, Mokhber N, Shayan E. Galvanic corrosion among different combination of orthodontic archwires and stainless steel brackets. *Journal of Dental Materials and Techniques*. 2014; 3(3): 118-22. doi: 10.22038/jdmt.2014.2970
2. Halițchi L, Darabă O, Merlușcă I, Chirap I, Burlui V. On the cytotoxicity of orthodontic arches in human fibroblast cultures. *International Journal of Medical Dentistry*. 2015;5(4):277–83.
3. Thomas P, Harvey S, Gruner T, Fenech M. The buccal cytome and micronucleus frequency is substantially altered in Down's syndrome and normal ageing compared to young healthy controls. *Mutat Res*. 2008;638(1-2):37-47. doi:10.1016/j.mrfmmm.2007.08.012
4. Kharisma Y, Damayanti MM, Yulianto FA, Rahimah SB, Maharani W, Rachmawati M, et al. Folic acid usual doses decrease the buccal micronucleus frequency on smokers. *Global Medical & Health Communication*. 2019;7(2):131-5. doi:10.29313/gmhc.v7i2.4414
5. Stopper H, Treutlein AT, Bahner U, et al. Reduction of the genomic damage level in haemodialysis patients by folic acid and vitamin B12 supplementation. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23(10):3272-9. doi:10.1093/ndt/gfn254
6. Lazalde-Ramos BP, Zamora-Perez AL, Sosa-Macías M, Guerrero-Velázquez C, Zúñiga-González GM. DNA and oxidative damages decrease after ingestion of folic acid in patients with type 2 diabetes. *Arch Med Res*. 2012;43(6):476-81. doi:10.1016/j.arcmed.2012.08.013
7. Goldberg M. In vitro and in vivo studies on the toxicity of dental resin components: a review. *Clin Oral Investig*. 2008;12(1):1-8. doi:10.1007/s00784-007-0162-8
8. Huang TH, Tsai CY, Chen SL, Kao CT. An evaluation of the cytotoxic effects of orthodontic bonding adhesives upon a primary human oral gingival fibroblast culture and a permanent, human oral cancer-cell line. *J Biomed Mater Res*. 2002;63(6):814-21. doi:10.1002/jbm.10412
9. Jagdish N, Padmanabhan S, Chitharanjan AB, et al. Cytotoxicity and degree of conversion of orthodontic adhesives. *Angle Orthod*. 2009;79(6):1133-8.

doi:10.2319/080808-418R.1

10. Mortier E, Gerdolle DA, Jacquot B, Panighi MM. Importance of water sorption and solubility studies for couple bonding agent--resin-based filling material. *Oper Dent*. 2004;29(6):669-76.

11. Davidson CL, Feilzer AJ. Polymerization shrinkage and polymerization shrinkage stress in polymer-based restoratives. *J Dent*. 1997;25(6):435-40. doi:10.1016/s0300-5712(96)00063-2

12. Moszner N, Klapdohr S. Nanotechnology for Dental Composites. *International Journal of Nanotechnology*. 2004; 1:130-56. doi:10.1504/IJNT.2004.003723

13. Topbaşı NM, Benkli YA. Evaluation of the bond strength of orthodontic brackets and the degree of polymerisation and microhardness of an orthodontic adhesive using polywave light curing unit and varying light densities. *Braz Dent Sci*. 2020;23(4):1–9. doi:10.14295/bds.2020.v23i4.2044

14. Takeshige F, Kawakami Y, Hayashi M, Ebisu S. Fatigue behavior of resin composites in aqueous environments. *Dent Mater*. 2007;23(7):893-9. doi: 10.1016/j.dental.2006.06.031

15. Drummond JL. Degradation, fatigue, and failure of resin dental composite materials. *J Dent Res*. 2008;87(8):710-9. doi: 10.1177/154405910808700802

16. Santerre JP, Shajii L, Leung BW. Relation of dental composite formulations to their degradation and the release of hydrolyzed polymeric-resin-derived products. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2001;12(2):136-51. doi:10.1177/10454411010120020401

17. Xu HH, Weir MD, Sun L, Takagi S, Chow LC. Effects of calcium phosphate nanoparticles on Ca-PO<sub>4</sub> composite. *J Dent Res*. 2007;86(4):378-83. doi:10.1177/154405910708600415

18. Erkan M, Aydin Y, Yilmaz BO, Yildizbayrak N. Protective effects of vitamin C against fluoride toxicity. *Toxicology, Academic Press*. 2021:435–45.

19. Lynch AM, Sasaki JC, Elespuru R, et al. New and emerging technologies for genetic toxicity testing. *Environ Mol Mutagen*. 2011;52(3):205-23. doi:10.1002/em.20614

20. Nersesyan A, Fenech M, Bolognesi C, et al. Use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay in occupational biomonitoring of genome damage caused

by in vivo exposure to chemical genotoxins: Past, present and future. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2016;770(Pt A):1-11. doi:10.1016/j.mrrev.2016.05.003

21. Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, et al. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety. *Mutat Res*. 2000;463(2):111-72. doi:10.1016/s1383-5742(00)00049-1

22. Migliore L, Coppedè F, Fenech M, Thomas P. Association of micronucleus frequency with neurodegenerative diseases. *Mutagenesis*. 2011;26(1):85-92. doi:10.1093/mutage/geq067

23. Andreassi MG, Barale R, Iozzo P, Picano E. The association of micronucleus frequency with obesity, diabetes and cardiovascular disease. *Mutagenesis*. 2011;26(1):77-83. doi:10.1093/mutage/geq077

24. El-Zein R, Vral A, Etzel CJ. Cytokinesis-blocked micronucleus assay and cancer risk assessment. *Mutagenesis*. 2011;26(1):101-6. doi:10.1093/mutage/geq071

25. Fenech M. The lymphocyte cytokinesis-block micronucleus cytome assay and its application in radiation biodosimetry. *Health Phys*. 2010;98(2):234-43. doi:10.1097/HP.0b013e3181b85044

26. Chatterjee S, Dhar S, Sengupta B, et al. Cytogenetic monitoring in human oral cancers and other oral pathology: the micronucleus test in exfoliated buccal cells. *Toxicol Mech Methods*. 2009;19(6-7):427-33. doi:10.1080/15376510903127530

27. Saran R, Tiwari RK, Reddy PP, Ahuja YR. Risk assessment of oral cancer in patients with pre-cancerous states of the oral cavity using micronucleus test and challenge assay. *Oral Oncol*. 2008;44(4):354-60. doi:10.1016/j.oraloncology.2007.05.002

28. Bolognesi C, Knasmueller S, Nersesyan A, Thomas P, Fenech M. The HUMNxl scoring criteria for different cell types and nuclear anomalies in the buccal micronucleus cytome assay - an update and expanded photogallery. *Mutat Res* 2013;753(2):100-13. doi:10.1016/j.mrrev.2013.07.002

29. Idolo A, Grassi T, Bagordo F, et al. Micronuclei in Exfoliated Buccal Cells of Children Living in a Cluster Area of Salento (Southern Italy) with a High Incidence of Lung Cancer: The IMP.AIR Study. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;15(8):1659.

doi:10.3390/ijerph15081659

30. Pawar RK, Bhagure GR, Chavan RP. Antioxidants and their role in nurture human life and industry: A review. *Int J Chem Stud*. 2016;4(3):22-6.

31. Maes M, Landucci Bonifacio K, Morelli NR, et al. Major Differences in Neurooxidative and Neuronitrosative Stress Pathways Between Major Depressive Disorder and Types I and II Bipolar Disorder. *Mol Neurobiol*. 2019;56(1):141-56. doi:10.1007/s12035-018-1051-7

32. Kumar P, Chand S, Maurya PK. Quercetin-modulated erythrocyte membrane sodium-hydrogen exchanger during human aging: correlation with ATPase's. *Arch Physiol Biochem*. 2016;122(3):141-7. doi:10.3109/13813455.2016.1150299

33. Mut-Salud N, Álvarez PJ, Garrido JM, Carrasco E, Aránega A, Rodríguez-Serrano F. Antioxidant Intake and Antitumor Therapy: Toward Nutritional Recommendations for Optimal Results. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:6719534. doi:10.1155/2016/6719534

34. Lawenda BD, Kelly KM, Ladas EJ, Sagar SM, Vickers A, Blumberg JB. Should supplemental antioxidant administration be avoided during chemotherapy and radiation therapy?. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100(11):773-83. doi:10.1093/jnci/djn148

35. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*. 2012;5(1):9-19. doi:10.1097/WOX.0b013e3182439613

36. Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2011;25(3):287-99. doi:10.1016/j.bpobgyn.2010.10.016

37. Mirończuk-Chodakowska I, Witkowska AM, Zujko ME. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Adv Med Sci*. 2018;63(1):68-78. doi:10.1016/j.advms.2017.05.005

38. Sies H. Oxidative Stress: Concept and Some Practical Aspects. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9(9):852. doi:10.3390/antiox9090852

39. Incalza MA, D'Oria R, Natalicchio A, Perrini S, Laviola L, Giorgino F. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascul Pharmacol*. 2018;100:1-19. doi:10.1016/j.vph.2017.05.005

40. Moosavian SP, Paknahad Z, Habibagahi Z. A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial, evaluating the garlic supplement effects on some serum biomarkers of oxidative stress, and quality of life in women with rheumatoid arthritis. *Int J Clin Pract*. 2020;74(7):e13498. doi:10.1111/ijcp.13498
41. Gill JG, Piskounova E, Morrison SJ. Cancer, Oxidative Stress, and Metastasis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2016;81:163-75. doi:10.1101/sqb.2016.81.030791
42. Zhang P, Li T, Wu X, Nice EC, Huang C, Zhang Y. Oxidative stress and diabetes: antioxidative strategies. *Front Med*. 2020;14(5):583-600. doi:10.1007/s11684-019-0729-1
43. Zhang H, Tsao R. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Curr Opin Food Sci*. 2016;8:33–42. doi:10.1016/j.cofs.2016.02.002
44. Heshmati J, Morvaridzadeh M, Maroufizadeh S, et al. Omega-3 fatty acids supplementation and oxidative stress parameters: A systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Pharmacol Res*. 2019;149:104462. doi:10.1016/j.phrs.2019.104462
45. Moosavian SP, Arab A, Paknahad Z, Moradi S. The effects of garlic supplementation on oxidative stress markers: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Complement Ther Med*. 2020;50:102385. doi:10.1016/j.ctim.2020.102385
46. Mutavdzin S, Gopcevic K, Stankovic S, Jakovljevic Uzelac J, Labudovic Borovic M, Djuric D. The Effects of Folic Acid Administration on Cardiac Oxidative Stress and Cardiovascular Biomarkers in Diabetic Rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2019:1342549. doi: 10.1155/2019/1342549
47. Sijilmassi O. Folic acid deficiency and vision: a review. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2019;257(8):1573-80. doi:10.1007/s00417-019-04304-3
48. Asbaghi O, Ashtary-Larky D, Bagheri R, et al. Beneficial effects of folic acid supplementation on lipid markers in adults: A GRADE-assessed systematic review and dose-response meta-analysis of data from 21,787 participants in 34 randomized controlled trials. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2022;62(30):8435-53.

doi:10.1080/10408398.2021.1928598

49. Froese DS, Fowler B, Baumgartner MR. Vitamin B12, folate, and the methionine remethylation cycle-biochemistry, pathways, and regulation. *J Inherit Metab Dis*. 2019;42(4):673-85. doi:10.1002/jimd.12009

50. Bahmani F, Karamali M, Shakeri H, Asemi Z. The effects of folate supplementation on inflammatory factors and biomarkers of oxidative stress in overweight and obese women with polycystic ovary syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2014;81(4):582-7. doi:10.1111/cen.12451

51. Institute of Medicine (US) Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference intakes and its panel on folate, other B vitamins, and choline. dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, and choline. Washington (DC): National Academies Press (US); 1998. doi: 10.17226/6015

52. Pitkin RM. Folate and neural tube defects. *Am J Clin Nutr*. 2007;85(1):285S-8S. doi:10.1093/ajcn/85.1.285S

53. Wilson RD, GENETICS COMMITTEE, MOTHERISK. Pre-conceptional vitamin/folic acid supplementation 2007: the use of folic acid in combination with a multivitamin supplement for the prevention of neural tube defects and other congenital anomalies. *J Obstet Gynaecol Can*. 2007;29(12):1003-13. doi:10.1016/S1701-2163(16)32685-8

54. Ulrich CM, Potter JD. Folate supplementation: too much of a good thing?. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15(2):189-93. doi:10.1158/1055-9965.EPI-152CO

55. Bailey LB, Stover PJ, McNulty H, et al. Biomarkers of Nutrition for Development-Folate Review. *J Nutr*. 2015;145(7):1636S-80S. doi:10.3945/jn.114.206599

56. He H, Shui B. Folate intake and risk of bladder cancer: a meta-analysis of epidemiological studies. *Int J Food Sci Nutr*. 2014;65(3):286-92. doi:10.3109/09637486.2013.866641

57. Kim YI. Will mandatory folic acid fortification prevent or promote cancer?. *Am J Clin Nutr*. 2004;80(5):1123-8. doi:10.1093/ajcn/80.5.1123

58. Giovannucci E, Stampfer MJ, Colditz GA, et al. Multivitamin use, folate, and colon

- cancer in women in the Nurses' Health Study. *Ann Intern Med.* 1998;129(7):517-24. doi:10.7326/0003-4819-129-7-199810010-00002
59. Zhang S, Hunter DJ, Hankinson SE, et al. A prospective study of folate intake and the risk of breast cancer. *JAMA.* 1999;281(17):1632-7. doi:10.1001/jama.281.17.1632
60. Sanjoaquin MA, Allen N, Couto E, Roddam AW, Key TJ. Folate intake and colorectal cancer risk: a meta-analytical approach. *Int J Cancer.* 2005;113(5):825-8. doi:10.1002/ijc.20648
61. Cole BF, Baron JA, Sandler RS, et al. Folic acid for the prevention of colorectal adenomas: a randomized clinical trial. *JAMA.* 2007;297(21):2351-9. doi:10.1001/jama.297.21.2351
62. Kim YI. Folic acid fortification and supplementation--good for some but not so good for others. *Nutr Rev.* 2007;65(11):504-11. doi:10.1111/j.1753-4887.2007.tb00275.x
63. Clarke R, Halsey J, Lewington S, et al. Effects of lowering homocysteine levels with B vitamins on cardiovascular disease, cancer, and cause-specific mortality: Meta-analysis of 8 randomized trials involving 37 485 individuals. *Arch Intern Med.* 2010;170(18):1622-31. doi:10.1001/archinternmed.2010.348
64. Huang T, Chen Y, Yang B, Yang J, Wahlqvist ML, Li D. Meta-analysis of B vitamin supplementation on plasma homocysteine, cardiovascular and all-cause mortality. *Clin Nutr.* 2012;31(4):448-54. doi:10.1016/j.clnu.2011.01.003
65. Ho RC, Cheung MW, Fu E, et al. Is high homocysteine level a risk factor for cognitive decline in elderly? A systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *Am J Geriatr Psychiatry.* 2011;19(7):607-17. doi:10.1097/JGP.0b013e3181f17eed
66. Smith AD, Refsum H, Bottiglieri T, et al. Homocysteine and dementia: an international consensus statement. *J Alzheimers Dis.* 2018;62(2):561-70. doi:10.3233/JAD-171042
67. Morris MS, Fava M, Jacques PF, Selhub J, Rosenberg IH. Depression and folate status in the US Population. *Psychother Psychosom.* 2003;72(2):80-7. doi:10.1159/000068692

68. Papakostas GI, Shelton RC, Zajecka JM, et al. L-methylfolate as adjunctive therapy for SSRI-resistant major depression: results of two randomized, double-blind, parallel-sequential trials. *Am J Psychiatry*. 2012;169(12):1267-74. doi:10.1176/appi.ajp.2012.11071114
69. Hafez HS, Selim EM, Kamel Eid FH, Tawfik WA, Al-Ashkar EA, Mostafa YA. Cytotoxicity, genotoxicity, and metal release in patients with fixed orthodontic appliances: a longitudinal in-vivo study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2011;140(3):298-308. doi:10.1016/j.ajodo.2010.05.025
70. Martín-Cameán A, Jos A, Cameán AM, Solano E, Iglesias-Linares A. Genotoxic and cytotoxic effects and gene expression changes induced by fixed orthodontic appliances in oral mucosa cells of patients: a systematic review. *Toxicol Mech Methods*. 2015;25(6):440-7. doi:10.3109/15376516.2015.1062951
71. Angelieri F, Carlin V, Martins RA, Ribeiro DA. Biomonitoring of mutagenicity and cytotoxicity in patients undergoing fixed orthodontic therapy. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2011;139(4 Suppl):e399-404. doi:10.1016/j.ajodo.2009.06.029
72. Pagano S, Lombardo G, Balloni S, et al. Cytotoxicity of universal dental adhesive systems: Assessment in vitro assays on human gingival fibroblasts. *Toxicol In Vitro*. 2019;60:252-60. doi:10.1016/j.tiv.2019.06.009
73. Clínica Universidad de Navarra. (15 de abril de 2023) Citotoxicidad. <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/citotoxicidad>
74. Shafiei F, Sardarian A, Fekrazad R, Farjood A. Comparison of shear bond strength of orthodontic brackets bonded with a universal adhesive using different etching methods. *Dental Press J Orthod*. 2019;24(4):33.e1-8. doi:10.1590/2177-6709.24.4.33.e1-8.onl
75. Universidad Nacional Autónoma de México, Unidad de Apoyo para el Aprendizaje UAPA. (15 de abril de 2023) Soluciones y Cálculos de Concentración. [https://repositorio-uapa.cuaieed.unam.mx/repositorio/moodle/pluginfile.php/2498/mod\\_resource/content/2/UAPA-Soluciones-Calculos-Concentracion/index.html](https://repositorio-uapa.cuaieed.unam.mx/repositorio/moodle/pluginfile.php/2498/mod_resource/content/2/UAPA-Soluciones-Calculos-Concentracion/index.html)
76. Garcia-Contreras R, Chavez-Granados PA, Jurado CA, Aranda-Herrera B, Afrashtehfar KI, Nurrohman H. Natural bioactive epigallocatechin-gallate promote

- bond strength and differentiation of odontoblast-like cells. *Biomimetics* (Basel). 2023;8(1):75. doi: 10.3390/biomimetics8010075
77. Sjögren G, Sletten G, Dahl JE. Cytotoxicity of dental alloys, metals, and ceramics assessed by millipore filter, agar overlay, and MTT tests. *J Prosthet Dent*. 2000;84(2):229-36. doi:10.1067/mpr.2000.107227
78. Asgharian-Rezaee M, Alipour-Farmad R, Tayarani-Najaran Z. Comparison of Osteogenic Potential of Phenytoin with Dexamethasone in Cultured Dental Pulp Stem Cells. *Rep Biochem Mol Biol*. 2020;9(3):331-7. doi:10.29252/rbmb.9.3.331
79. Bai Y, Cheng X, Liu X, et al. Transforming growth factor- $\beta$ 1 promotes early odontoblastic differentiation of dental pulp stem cells via activating AKT, Erk1/2 and p38 MAPK pathways. *J Dent Sci*. 2023;18(1):87-94. doi:10.1016/j.jds.2022.06.027
80. Abrevaya X. (15 de abril de 2023) ¿Qué es la genotoxicidad? *Intramed*. <https://www.intramed.net/contenidover.asp?contenidoid=47111>
81. National Institutes of Health, Office of Dietary Supplements. (15 de abril de 2023) Suplementos dietéticos: Lo que debe saber. <https://ods.od.nih.gov/factsheets/WYNTK-DatosEnEspanol/>
82. Clínica Universidad de Navarra. (15 de abril de 2023) Edad. <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/edad>
83. Instituto Nacional de Estadística. (15 de abril de 2023) Sexo. <https://www.ine.es/DEFIne/es/concepto.htm?c=4484>
84. Gobierno del Estado de Aguascalientes, ISSEA. (15 de abril de 2023) Calcula tu Índice de Masa Corporal. <https://www.issea.gob.mx/calculaimc.html>
85. Clínica Universidad de Navarra. (15 de abril de 2023) Fumador pasivo. <https://www.cun.es/chequeos-salud/vida-sana/consejos-salud/fumador-pasivo>
86. Carrillo-Novia I, Lara-Carrillo E, Torres-Bugarin O, et al. Use of liquid-based cytology samples reveals genomic instability and cell death in patients undergoing orthodontic treatment. *J Oral Sci*. 2023;65(1):24-8. doi:10.2334/josnusd.22-0235
87. Ayyad SB, Israel E, El-Setouhy M, Nasr GR, Mohamed MK, Loffredo CA. Evaluation of Papanicolaou stain for studying micronuclei in buccal cells under field conditions. *Acta Cytol*. 2006;50(4):398-402. doi:10.1159/000325980
88. Rehani S, Bala J, Bishen KA, Juneja V, Sethi S. Cytomorphometric assessment

and micronuclei assay in iron deficiency anemic females – An exfoliative cytological study. *Res Sq.* 2022. doi: 10.21203/rs.3.rs-2391834/v1.

89. Apiwantanakul N, Chantarawatit PO. Cytotoxicity, genotoxicity, and cellular metal accumulation caused by professionally applied fluoride products in patients with fixed orthodontic appliances: A randomized clinical trial. *J World Fed Orthod.* 2021;10(3):98-104. doi:10.1016/j.ejwf.2021.06.001

90. Naga MB, Gour S, Nallagutta N, Ealla KK, Velidandla S, Manikya S. Buccal Micronucleus Cytome Assay in Sickle Cell Disease. *J Clin Diagn Res.* 2016;10(6):ZC62-4. doi:10.7860/JCDR/2016/19984.7998

91. Thomas P, Holland N, Bolognesi C, et al. Buccal micronucleus cytome assay. *Nat Protoc.* 2009;4(6):825-37. doi:10.1038/nprot.2009.53

92. Bolognesi C, Knasmueller S, Nersesyan A, Thomas P, Fenech M. The HUMNxl scoring criteria for different cell types and nuclear anomalies in the buccal micronucleus cytome assay - an update and expanded photogallery. *Mutat Res.* 2013;753(2):100-13. doi:10.1016/j.mrrev.2013.07.002

93. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA.* 2013;310(20):2191-4. doi:10.1001/jama.2013.281053

94. Gobierno de México. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud.

95. Ahrari F, Tavakkol Afshari J, Poosti M, Brook A. Cytotoxicity of orthodontic bonding adhesive resins on human oral fibroblasts. *Eur J Orthod.* 2010;32(6):688–92. doi: 10.1093/ejo/cjq019

96. Jonke E, Franz A, Freudenthaler J, König F, Bantleon HP, Schedle A. Cytotoxicity and shear bond strength of four orthodontic adhesive systems. *Eur J Orthod.* 2008;30(5):495–502. doi: 10.1093/ejo/cjn042

97. Malkoc S, Corekci B, Ulker HE, Yalçın M, Şengün A. Cytotoxic effects of orthodontic composites. *Angle Orthodontist.* 2010;80(4):759–64. doi: 10.2319/092809-537.1

98. Heravi F, Ramezani M, Poosti M, Hosseini M, Shajiei A, Ahrari F. In Vitro Cytotoxicity Assessment of an Orthodontic Composite Containing Titanium-dioxide

Nano-particles. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 2013;7(4):192–8. doi: 10.5681/joddd.2013.031

99. Schneider TR, Hakami-Tafreshi R, Tomasino-Perez A, Tayebi L, Lobner D. Effects of dental composite resin monomers on dental pulp cells. *Dent Mater J*. 2019;38(4):579–83. doi: 10.4012/dmj.2018-163

100. Tak O, Usumez A. Diffusion of HEMA through human carious and non-carious dentin in vitro. *J Prosthodont*. 2013;22(3):184-9. doi: 10.1111/j.1532-849X.2012.00935.x

101. Putzeys E, Duca RC, Coppens L, Vanoirbeek J, Godderis L, Van Meerbeek B, Van Landuyt KL. In-vitro transdentinal diffusion of monomers from adhesives. *J Dent*. 2018;75:91-7. doi: 10.1016/j.jdent.2018.05.023

102. Cetingüç A, Olmez S, Vural N. HEMA diffusion from dentin bonding agents in young and old primary molars in vitro. *Dent Mater*. 2007;23(3):302-7. doi: 10.1016/j.dental.2005.08.013

103. Wu T, Xu C, Du R, Wen Y, Chang J, Huan Z, et al. Effects of silicate-based composite material on the proliferation and mineralization behaviors of human dental pulp cells: An in vitro assessment. *Dent Mater J*. 2018;37(6):889–96. doi: 10.4012/dmj.2017-328

104. Ahn JH, Kim IR, Kim Y, Kim DH, Park SB, Park BS, Bae MK, Kim YI. The Effect of Mesoporous Bioactive Glass Nanoparticles/Graphene Oxide Composites on the Differentiation and Mineralization of Human Dental Pulp Stem Cells. *Nanomaterials*. 2020;10(4):620. doi: 10.3390/nano10040620

105. Kircelli BH, Kilinc DD, Karaman A, Sadry S, Gonul EY, Gögen H. Comparison of the bond strength of five different composites used in the production of clear aligner attachments. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg*. 2023;124(6):101481. doi: 10.1016/j.jormas.2023.101481

106. Arieli Y, Zembel L, Zilberman U. In Vitro Comparison of Shear Bond Strength (SBS) of Orthodontic Brackets Bonded with 4 Adhesive Materials and Debonded at Different Time Intervals. *J Oral Dent Health*. 2023;7(3):214-7. doi: 10.33140/JODH

107. Henkin F de S, de Macêdo É de OD, Santos K da S, Schwarzbach M, Samuel SMW, Mundstock KS. In vitro analysis of shear bond strength and adhesive remnant

- index of different metal brackets. *Dental Press J Orthod.* 2016;21(6):67–73. doi: 10.1590/2177-6709.21.6.067-073.oar
108. Reynolds IR. A Review of Direct Orthodontic Bonding. *Br J Orthod.* 1975;2(3):171–8. doi: 10.1080/0301228X.1975.11743666
109. Vilchis RJ, Hotta Y, Yamamoto K. Examination of six orthodontic adhesives with electron microscopy, hardness tester and energy dispersive X-ray microanalyzer. *Angle Orthod.* 2008;78(4):655-61. doi: 10.2319/0003-3219(2008)078[0655:EOSOAW]2.0.CO;2
110. Yilmaz B, Bakkal M, Zengin Kurt B. Structural and mechanical analysis of three orthodontic adhesive composites cured with different light units. *J Appl Biomater Funct Mater.* 2020;18. doi: 10.1177/2280800020901716
111. Uysal T, Basciftci FA, Sener Y, Botsali MS, Demir A. Conventional and high intensity halogen light effects on water sorption and microhardness of orthodontic adhesives. *Angle Orthod.* 2008;78(1):134-9. doi: 10.2319/020507-56.1
112. Khodadadi E, Khafri S, Aziznezhad M. Comparison of Surface Hardness of Various Shades of Twinky Star Colored Compomer Light-cured with QTH and LED Units. *Electron Physician.* 2016;8(5):2355–60. doi: 10.19082/2355
113. Jafari Z, Javadinejad S, Mirzakochaki P. Evaluation of colored compomer micro-hardness with different colors in various time curing. *Daneshvar Medicine.* 2015;22(115):17–24.
114. Natarajan M, Padmanabhan S, Chitharanjan A, 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. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2011;140(3):383-8. doi:10.1016/j.ajodo.2010.07.027
115. Faccioni F, Franceschetti P, Cerpelloni M, Fracasso ME. In vivo study on metal release from fixed orthodontic appliances and DNA damage in oral mucosa cells. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2003;124(6):687-94. doi:10.1016/j.ajodo.2003.09.010
116. Toy E, Yuksel S, Ozturk F, Karatas OH, Yalcin M. Evaluation of the genotoxicity and cytotoxicity in the buccal epithelial cells of patients undergoing orthodontic treatment with three light-cured bonding composites by using micronucleus testing.

- Korean J Orthod. 2014;44(3):128-35. doi:10.4041/kjod.2014.44.3.128
117. Westphalen GH, Menezes LM, Prá D, Garcia GG, Schmitt VM, Henriques JAP, et al. In vivo determination of genotoxicity induced by metals from orthodontic appliances using micronucleus and comet assays. *Genet Mol Res.* 2008;7(4):1259-66. doi:10.4238/vol7-4gmr508
118. Heravi F, Abbaszadegan MR, Merati M, Hasanzadeh N, Dadkhah E, Ahrari F. DNA damage in oral mucosa cells of patients with fixed orthodontic appliances. *J Dent (Tehran).* 2013;10(6):494-500.
119. Flores-Bracho MG, Takahashi CS, Castillo WO, Saraiva MCP, Kúchler EC, Matsumoto MAN, et al. Genotoxic effects in oral mucosal cells caused by the use of orthodontic fixed appliances in patients after short and long periods of treatment. *Clin Oral Investig.* 2019;23(7):2913-9. doi:10.1007/s00784-018-02795-8
120. Aly FA, Donya SM, Abo-Zeid MAM. The protective role of folic acid, vitamin B12 and vitamin C on the mutagenicity of the anticancer drug daunorubicin. *Researcher.* 2009;1(6):16-26.
121. Zúñiga-González GM, Batista-González CM, Gómez-Meda BC, et al. Micronuclei in diabetes: folate supplementation diminishes micronuclei in diabetic patients but not in an animal model. *Mutat Res.* 2007;634(1-2):126-34. doi:10.1016/j.mrgentox.2007.06.006
122. Gómez-Meda BC, Zamora-Perez AL, Muñoz-Magallanes T, Sánchez-Parada MG, García Bañuelos JJ, Guerrero-Velázquez C, et al. Nuclear abnormalities in buccal mucosa cells of patients with type I and II diabetes treated with folic acid. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2016;797:1-8. doi:10.1016/j.mrgentox.2015.12.003
123. Iarmarcovai G, Bonassi S, Sari-Minodier I, Baciuchka-Palmaro M, Botta A, Orsière T. Exposure to genotoxic agents, host factors, and lifestyle influence the number of centromeric signals in micronuclei: a pooled re-analysis. *Mutat Res.* 2007;615(1-2):18-27. doi:10.1016/j.mrfmmm.2006.09.005
124. Barale R, Chelotti L, Davini T, Ry S Del, Andreassi MG, Ballardín M, et al. Sister chromatid exchange and micronucleus frequency in human lymphocytes of 1,650 subjects in an Italian population: II. Contribution of sex, age, and lifestyle. *Environ*

Mol Mutagen. 1998;31(3):228-42. doi:10.1002/(sici)1098-2280(1998)31:3<228::aid-em4>3.0.co;2-g

125. Fruh SM. Obesity: Risk factors, complications, and strategies for sustainable long-term weight management. J Am Assoc Nurse Pract. 2017;29(S1):S3-14. doi:10.1002/2327-6924.12510

126. Andreassi MG, Barale R, Iozzo P, Picano E. The association of micronucleus frequency with obesity, diabetes and cardiovascular disease. Mutagenesis. 2011;26(1):77-83. doi:10.1093/mutage/geq077

127. Nersesyan A, Muradyan R, Kundi M, Knasmueller S. Impact of smoking on the frequencies of micronuclei and other nuclear abnormalities in exfoliated oral cells: a comparative study with different cigarette types. Mutagenesis. 2011;26(2):295-301. doi:10.1093/mutage/geq092

128. Hopf NB, Danuser B, Bolognesi C, Wild P. Age related micronuclei frequency ranges in buccal and nasal cells in a healthy population. Environ Res. 2020;180:108824. doi:10.1016/j.envres.2019.108824

## 16. Anexos

### 16.1. Anexo 1. Consentimiento informado (Fase 2)



#### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO



En el cumplimiento de la **Ley General de Salud, Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación**, arts. 3, 13, 14 y 16, **NOM-012-SSA3-2012**, numerales 11 y 12, criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos, **Código Civil Federal**, arts. 1803 y 1812, obligaciones en el consentimiento informado, **Ley Federal de Protección de Datos Personales en Posesión de los Particulares** y **Aviso de Privacidad de la UAEMex**.

**Título** – “Evaluación de la inestabilidad genómica y genotoxicidad con el uso de aparatología fija y consumo de ácido fólico”  
**Investigador principal** – M. en C.O. David Bautista Martínez

**Institución responsable del proyecto de investigación** – Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Odontología (CIEAO), de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMex).

Antes de aceptar la participación en este estudio de investigación, es importante que usted lea y entienda la siguiente información sobre el mismo. Este documento de consentimiento describe el propósito, requisitos, procedimientos, riesgos, costos y precauciones del estudio. El consentimiento se extenderá por duplicado, uno para el investigador y otro para el sujeto de investigación.

**Propósito** – La toma de muestra de células de la mucosa oral exfoliadas mediante cepillo podrá ser donada para la realización del proyecto de investigación antes mencionado.

**De los participantes** – Para participar en esta investigación usted deberá cubrir los siguientes requisitos:

- No fumador
- Sin enfermedades orales o sistémicas
- Sin restauraciones o prótesis bucales metálicas
- Mucosa oral clínicamente sana
- Sin tratamiento de ortodoncia previo
- Sin exposición ocupacional a metales
- No recibir medicamentos o suplementos
- Ninguna alergia conocida a la bisutería, relojes o fuentes de níquel y cromo
- Firmar el presente informe de consentimiento

Si usted califica, podrá ser uno de los participantes que colabore en este estudio.

**De los procedimientos** – A usted se le requerirá:

- Contestar preguntas para determinar si usted califica para participar en este estudio.
- Contestar preguntas acerca de su estado actual de salud.
- Leer y firmar este formulario de informe de consentimiento.

De acuerdo con el grupo de estudio al que se le incluya para participar, las indicaciones serán las siguientes:

- I. **Grupo control** – Se le tomará un total de cuatro muestras de células orales exfoliadas, a saber, una inicial (T1) y posteriormente un mes (T2), tres meses (T3) y 6 meses (T4) después de la primera toma.
- II. **Grupo con aparatos fijos de ortodoncia** – Se le tomará un total de cuatro muestras de células orales exfoliadas, esto durante las visitas regulares de su tratamiento de ortodoncia. Las muestras serán antes de iniciar el tratamiento de ortodoncia (T1), así como, un mes (T2), tres meses (T3) y 6 meses (T4) después de la colocación de brackets.
- III. **Grupo con aparatos fijos de ortodoncia y suplementación con antioxidantes** – Se le tomará un total de cuatro muestras de células orales exfoliadas, esto durante las visitas regulares de su tratamiento de ortodoncia. Las muestras serán





### 16.3. Anexo 3. Cuestionario para pacientes



Universidad Autónoma del Estado de México  
Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Odontología (CIEAO)

**Título** – “Evaluación de la inestabilidad genómica y genotoxicidad con el uso de aparatología fija y consumo de ácido fólico”

**Investigador principal** – M. en C.O. David Bautista Martínez

#### CUESTIONARIO PARA PACIENTES QUE PARTICIPARÁN EN EL ESTUDIO

##### Datos personales

Nombre del paciente \_\_\_\_\_ Edad \_\_\_\_\_  
Fecha de nacimiento \_\_\_\_\_ Sexo M F  
Domicilio \_\_\_\_\_ Teléfono: \_\_\_\_\_  
Escolaridad \_\_\_\_\_ Ocupación \_\_\_\_\_

##### Antecedentes no patológicos

Zona de residencia: ( ) Urbana ( ) Rural  
Frecuencia de cepillado al día \_\_\_\_\_  
Uso: Cepillo y pasta: No / Si Enjuague bucal: No / Si  
¿Ha tenido tratamiento de ortodoncia previo?: No / Si ¿Hace cuánto tiempo? \_\_\_\_\_  
Duración del tratamiento \_\_\_\_\_  
Peso \_\_\_\_\_ Talla \_\_\_\_\_ I.M.C. \_\_\_\_\_

##### Antecedentes patológicos

Padece alguna enfermedad sistémica: No / Si ¿Cuál? \_\_\_\_\_  
Historia familiar de cáncer: No / Si (Tipo de cáncer) \_\_\_\_\_  
¿Actualmente está bajo tratamiento médico? Motivo: \_\_\_\_\_  
Medicamentos que consume regularmente/Dosis \_\_\_\_\_  
Alergias: No / Si ¿Cuáles? \_\_\_\_\_  
Consumo de vitaminas o suplementos alimenticios: No / Si ¿Cuáles? \_\_\_\_\_

##### Antecedentes toxicológicos

¿Tiene o ha tenido alguna exposición a metales? No / Si Causa \_\_\_\_\_  
¿Durante cuánto tiempo? \_\_\_\_\_  
Alergia conocida a metales, joyas, bisutería: No / Si ¿Cuáles? \_\_\_\_\_  
Consumo de tabaco: No / Si Cantidad/Frecuencia: \_\_\_\_\_  
Fumador pasivo: No / Si Relación con la persona \_\_\_\_\_  
Consumo de alcohol: No / Si Cantidad/Frecuencia: \_\_\_\_\_

##### Observaciones

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

## 16.4. Anexo 4. Aviso de Privacidad UAEMex



### Universidad Autónoma del Estado de México

#### AVISO DE PRIVACIDAD

La Universidad Autónoma del Estado de México, en lo sucesivo y para efectos del presente aviso, se denominará como "La Universidad", con domicilio en Instituto Literario Ote. No. 100, Col. Centro. C.P. 50000, Toluca, Estado de México; a través de sus espacios académicos y administrativos es la responsable del uso, protección y tratamiento de sus datos personales, observando íntegramente para ello lo previsto en la Ley de Protección de Datos Personales del Estado de México, en lo subsecuente "La ley".

La entrega de los datos personales es facultativa, en caso de que el titular se negara a otorgarlos, se generará como consecuencia el no estar en posibilidades de realizar el trámite que pretende llevar a cabo.

En caso de no oponerse a este acto, se entiende que existe un consentimiento expreso para su tratamiento, en los términos citados en el presente aviso de privacidad.

"La Universidad" protesta no transmitir sus datos personales a persona física o jurídico colectiva alguna que sea ajena a la Institución sin su consentimiento expreso; notificándole en su caso qué datos serán transmitidos, cuál es la finalidad de dicho trámite y quién es el destinatario.

Para la mejor comprensión del presente aviso de privacidad le informamos lo siguiente:

#### ¿Para qué fines se recabarán sus datos personales?

Los datos personales que recabamos de usted, los utilizaremos para las siguientes finalidades que son necesarias dentro de las actividades propias de "La Universidad":

- **Trámites académicos**, como pueden ser los relativos a inscripción, reinscripción, solicitud de becas, historial académico, tutoría y mentoría académica, titulación, prestación de servicio social y prácticas profesionales, movilidad estudiantil, participación en proyectos de investigación, registro de evaluaciones, repositorio institucional y cualquier actividad y obligación surgida del quehacer universitario.
- **Trámites administrativos**, como pueden ser los relativos a recursos financieros, recursos humanos, recursos materiales, servicios generales y obra universitaria, así como las demás relativas a la contraloría, marco legal, gestión, planeación, estadística universitaria y cualquier actividad y obligación surgida del quehacer universitario.
- **Actividades y/o servicios diversos**, como pueden ser sociales, de difusión de la cultura, deportivos, médicos, recreativos, empresariales, de investigación, extensión, publicación de eventos, sistema de consulta en línea para padres de familia, entre otros.

#### ¿Qué datos personales se recabarán?

Para llevar a cabo las finalidades descritas en el presente aviso de privacidad y dependiendo específicamente del trámite a realizar, se utilizarán, de manera enunciativa más no limitativa, los siguientes datos personales.

- **Datos de identificación** como: nombre, número de cuenta, estado civil, firma autógrafa y electrónica, registro federal de contribuyentes (RFC), clave única de registro de población (CURP), número de seguridad social, nacionalidad, fecha de nacimiento, datos contenidos en acta de nacimiento, datos relacionados con terceros, fotografía, imagen, voz, entre otros.

- **Datos de contacto** como: domicilio, números telefónicos fijos o celulares o correos electrónicos de índole particular, entre otros.
- **Datos académicos** como: calificaciones cuantitativas, cualitativas, promedios y observaciones a las calificaciones, evaluaciones y las opiniones vertidas en ellas.
- **Datos patrimoniales o financieros**

Además “La Universidad” podrá utilizar para las finalidades descritas anteriormente los siguientes datos personales considerados como sensibles, que requieren especial atención:

- **Datos respecto de su estado o condición de salud física o mental**
- **Datos sobre afiliación sindical**
- **Datos de origen étnico o racial**
- **Preferencias sexuales**
- **Situación genética**

#### **De los Derechos ARCO, revocación y limitación del uso de los datos personales**

El titular podrá ejercer en los términos previstos por “La Ley” su derecho de acceso, rectificación, cancelación u oposición (ARCO). Asimismo “La Universidad” atenderá las solicitudes que el titular tenga respecto a la revocación de su consentimiento para dar tratamiento, uso o divulgar sus datos personales. Es importante considerar que no en todos los casos se podrá atender y/o concluir dicha solicitud de forma inmediata, ya que es posible que por alguna obligación legal o administrativa requiramos seguir tratando sus datos personales. Aunado a esto el titular de los datos debe considerar que esta acción puede implicar que no se podrá seguir prestando el servicio solicitado o concluir el trámite que el titular ha iniciado con “La Universidad”.

Para realizar cualquiera de estos procedimientos así como recibir asesoría por parte de la Universidad, el titular podrá acudir a las oficinas de la Dirección de Transparencia Universitaria localizadas en la calle Valentín Gómez Farías Oriente No. 200, Colonia 5 de Mayo C.P. 50090 Toluca, Estado de México. Para el ejercicio de sus Derechos ARCO el titular puede también, en caso de así desearlo, ingresar su solicitud en la dirección electrónica [www.sarcoem.org.mx](http://www.sarcoem.org.mx) correspondiente al Sistema de Acceso, Rectificación, Cancelación y Oposición de Datos Personales del Estado Mexiquense.

El responsable de vigilar la protección de los sistemas que contengan datos personales es el Lic. en D. Hugo Edgar Chaparro Campos, titular de la Dirección de Transparencia Universitaria.

#### **De los cambios y modificaciones al Aviso de privacidad**

Derivado de nuevos requerimientos legales o de nuevas necesidades administrativas o de otra índole, el presente aviso de privacidad se identifica con el número de revisión 02 de fecha 7/12/2016, sin embargo, podrá sufrir cambios y modificaciones.

“La Universidad” se compromete a mantenerlo informado sobre los cambios que pueda sufrir el presente, a través del sitio electrónico de “La Universidad” ([www.uaemex.mx](http://www.uaemex.mx)) así como por diversos medios de comunicación masiva que en su momento se determine.

REVISIÓN NÚM. 02 FECHA DE APROBACIÓN 7/12/2016

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO  
PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO**



“Conozco y acepto los términos de aviso de privacidad de la UAEMéx, mismo que puede ser consultado en [http://web.uaemex.mx/avisos/Aviso\\_Privacidad.pdf](http://web.uaemex.mx/avisos/Aviso_Privacidad.pdf); en este mismo acto otorgo mi consentimiento, para que la Universidad Autónoma del Estado de México, haga públicos mis datos personales referentes a nombre y firma autógrafa, derivado de las obligaciones comunes y específicas que se tiene como Sujeto Obligado en materia de Transparencia y en cumplimiento a la Ley de Protección de Datos Personales en Posesión de Sujetos Obligados.”