



Frecuencia de alteraciones nucleares presentes en la mucosa bucal de técnicos dentales fumadores

Nuclear alterations frequency in oral mucosa of smoking dental technicians

Vol. 7, No. 13 enero-junio 2017
Contexto Odontológico



Celia Elizabeth Luna Pacheco, Francisco Javier Mejía Pérez, Ma. Saray Aranda Romo, Francisco Luna Pacheco, Alfredo Salazar de Santiago
Unidad Académica de Odontología, UAZ, Facultad de Estomatología de S.L.P.
Correo electrónico: lumapachecoceliaelizabeth@gmail.com

Resumen

El tener contacto con varios tipos de materiales dentales utilizados en el laboratorio dental y el hábito de fumar son factores causantes de alteraciones nucleares. El objetivo del presente trabajo fue determinar la frecuencia de alteraciones nucleares presentes en la mucosa bucal de técnicos dentales fumadores mediante citología exfoliativa. Estudio observacional, en el cual se tomaron citologías exfoliativas a 15 técnicos dentales fumadores en ambos carrillos, las láminas fueron procesadas y teñidas con el colorante "Fast Green" y analizadas mediante microscopía óptica. En un total de 2,000 células fueron detectadas células micronucleadas, binucleadas y con núcleo lobulado o gemaciones. Nuestra población estuvo conformada por 73% hombres y 26% mujeres con una media de edad de 27.47 DE= 9.546. El 80% de los participantes refirió tener de 1 a 10 años trabajando en el laboratorio dental, y el 20% más de 10 años; el material más utilizado fueron los metales con un 46.6%. Las alteraciones nucleares más frecuentes fueron células con micronúcleo en un 42.5%, células binucleadas 30.3% y células con núcleos lobulados (brotes nucleares) con un 27.1%. La frecuencia de células con micronúcleos y núcleos lobulados se incrementó en técnicos dentales con

Summary

Various types of dental materials used in the dental laboratory among smoking are factors that could cause nuclear alterations. The objective of the present study was to determine the frequency of nuclear alterations in the oral mucosa of smoking dental technicians by exfoliative cytology. An observational study, in which exfoliative cytologies were taken to 15 smoking dental technicians in both cheeks, the sheets were processed and stained with "Fast Green" stain and analyzed by optical microscopy. 2,000 cells were detected micronucleate cells, binucleate and with lobed nuclei or buds. The participants in this study were 73% men and 26% women with a mean age of 27.47 SD = 9.546. 80% of the participants reported having 1 to 10 years working in the dental laboratory, and 20% more than 10 years; The most used material was metal with 46.6%. The most frequent nuclear alterations were cells with micronucleus in 42.5%, binucleated cells 30.3% and 27.1% showed cells with lobed nuclei (nuclear outbreaks). The frequency of cells with micronuclei and lobulated nuclei increased in dental technicians with more than 10 years of work. Smoking and persistent exposure to materials used in the dental laboratory subserve the appearance and increases nuclear alterations, mainly

más de 10 años de trabajo. El hábito de fumar y los años de exposición prolongados a materiales utilizados en el laboratorio dental, favorecen la aparición e incremento de alteraciones nucleares principalmente micronúcleo y brotes nucleares.

Palabras clave: Micronúcleos, alteraciones nucleares, técnicos dentales, tabaco.

micronuclei and nuclear outbreaks.

Key words: Micronuclei, nuclear alterations, dental technicians, tobacco.



Introducción

En la actualidad la integridad genética de las poblaciones se ha visto comprometida por la constante exposición a productos químicos y agentes genotóxicos y los técnicos dentales no son la excepción ya que varios de los materiales usados por ellos han sido registrados en la literatura como tóxicos, ejemplo de ello tenemos el alginato del cual se ha demostrado casos de fibrosis pulmonar intersticial severa a causa de este material dental, otro ejemplo es el cromo y los componentes del níquel de los cuales se ha reportado en estudios experimentales y epidemiológicos que se asocian al desarrollo de cáncer nasal y de pulmón, (Dawassas, 2013). Además esta población de técnicos dentales fuman, el hábito de fumar es considerado como el causante en un 90% de las alteraciones nucleares ya que contiene sustancias químicas tóxicas para el ser humano. “En la combustión del tabaco se producen varias sustancias identificándose el 3,4 benzopireno a partir del condensado (alquitran) del humo del tabaco, sustancia genuinamente carcinogénica”, (Himanta & Rajat, 2012). La evaluación de alteraciones nucleares se lleva a cabo mediante el ensayo del citoma bucal el cual

es un procedimiento validado por el proyecto HUM y es utilizado como marcador de daño al ADN, la proliferación celular, daño genético, diferenciación celular y muerte celular de células exfoliadas de la mucosa bucal expuesta constantemente a genotóxicos. (Ramos Ibarra, 2013) Los parámetros que indican genotoxicidad son la presencia de micronúcleos, núcleos lobulados y binucleados cuyas características se mencionan a continuación:

“*Célula micronucleada:* Se caracteriza por la presencia de un núcleo principal y uno o más pequeñas estructuras nucleares denominadas micronúcleos. Un micronúcleo tiene forma redonda o almendrada y mide entre 1/3 y 1/16 del núcleo principal, presenta la misma intensidad, textura y plano focal que el núcleo”, (Thomas, Holland, Bolonges, & Kirsch-Volders, 2009). Los criterios para identificar los micronúcleos son que la tinción tenga una intensidad similar o mayor a la del núcleo principal, que tenga forma similar a la de los núcleos de la célula binucleada, que no estén conectados con los núcleos de la célula binucleada.

“Células binucleadas: son células que contienen dos núcleos principales, usualmente los núcleos están muy próximos e incluso podrían hacer contacto, ambos con morfología y tinción similar a un núcleo normal.” (Thomas, Holland, Bolonges, & Kirsch-Volders, 2009)

“Núcleo lobulado (brotes nucleares): El núcleo presenta una fuerte constricción en un extremo, sugestiva de un incipiente proceso de eliminación de material nuclear por gemación, el lóbulo presenta las mismas características morfológicas y de tensión que el núcleo, pero el tamaño es de un tercio a un cuarto del núcleo”, (Thomas, Holland, Bolonges, & Kirsch-Volders, 2009).

Se ha utilizado la citología exfoliativa como una técnica no invasiva, económica y de tamizaje poblacional para mostrar con éxito el efectos genotóxicos de los factores de estilo de vida tales como el consumo de tabaco, la masticación de la nuez de betel, así también como tratamientos médicos, como la radioterapia, exposición ocupacional al potencial mutagénico y productos químicos cancerígenos. A mayor frecuencia de anomalías nucleares se incrementa la posibilidad del desarrollo de neoplasias malignas entre las que se encuentra el carcinoma oral de células escamosas, es necesario informar a esta población expuesta del riesgo que tiene a su salud el estar en contacto con estos materiales propios de su profesión, lo cual se incrementa con el hábito de fumar.

El objetivo general de este estudio es determinar la frecuencia de anomalías nucleares en células exfoliadas de la mucosa oral de técnicos dentales fumadores además también determinar la relación entre el tiempo de exposición a estos materiales con la presencia de alteraciones nucleares.

Métodos y materiales

Estudio observacional, transversal y prospectivo en el cual se incluyeron 15 técnicos dentales de ambos géneros mayores de 18 años y que tuvieran por lo menos 1 año de trabajo en el laboratorio. Los laboratorios incluidos fueron de la Facultad de Estomatología, así como laboratorios privados. El proyecto cuenta con aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Estomatología de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. La metodología se dividió en 3 fases, la primera fase consistió en la recolección de muestras, la segunda fase en la tinción de muestras y la tercera fase en observación y estudio de muestras.

Primera fase: Toma de citología exfoliativa

Se realizaron citologías exfoliativas de la mucosa oral mediante la técnica descrita previamente por Olivia Torres Bulgarín (Torres-bulgarín, Guadalupe, Nicole, & Flores Garcia Aurelio, 2013), de 15 técnicos dentales fumadores. Previo consentimiento informado del sujeto participante, se pidió al sujeto que se enjuagara con agua limpia perfectamente la cavidad oral para eliminar así todo resto de alimento, posteriormente se realizó la citología exfoliativa de ambas mejillas con ayuda de un portaobjetos, y dicha muestra se extendió en una laminilla, una para cada lado colocando identificación con nombre del paciente, fecha, y cuadrante muestreado.

Finalmente la muestra fue fijada mediante calor con un mini soplete gas butano de uso odontológico. Las muestras fueron transportadas al laboratorio de bioquímica, microbiología y patología de la Facultad de Estomatología para su procesamiento y tinción.

Segunda fase: Tinción

Se realizó la tinción mediante el colorante "Fast Green" el cual el tiempo de tinción es de 1 hora 45 minutos. Mediante la técnica descrita previamente por Thomas. (Thomas, Holland, Bolonges, & Kirsch-Volders, 2009)

Tercera fase: Evaluación de células exfoliadas

Las muestras fueron colocadas en el microscopio a un objetivo de 40x, se realizó el conteo de 2000 células por muestra, identificando alteraciones nucleares, poniendo énfasis en células micronucleadas, binucleadas, y núcleo lobulado (Fig. 1-3). Los datos fueron registrados en tablas de trabajo para facilitar su estudio. Y analizados con el programa estadístico graphpad prism versión 6.0c. Se realizó estadística descriptiva reportando medidas de tendencia central, así como estadística inferencial para valores numéricos t student.

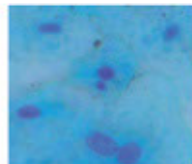


Figura 1. Célula con micronúcleo teñida con colorante "Fast Green" observada con aumento de 40x con microscopio óptico.

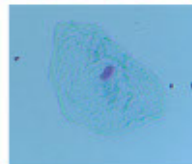


Figura 2. Célula con núcleo lobulado teñida con colorante "Fast Green" observada con aumento de 40x con microscopio óptico.

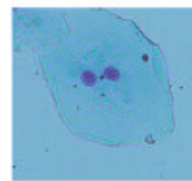


Figura 3. Célula binucleada teñida con colorante "Fast Green" observada con aumento de 40x con microscopio óptico.

Resultados:

Nuestra población de estudio estuvo conformada por 15 técnicos dentales fumadores de los cuales 11 (73%) fueron del género masculino y 4 (26%) del género femenino, la edad media de los participantes fue de 27.47 años, DE= 9.546. Los sujetos de estudio fueron divididos en dos grupos; los participantes que tenían de 1 a 10 años trabajando en el laboratorio dental 12(80%) y >10 años 3(20%). El material más utilizado fueron los metales con un 46.6%. El 73.3% refirió ingerir alcohol, y solo el 20% estaba tomando medicamento durante la etapa de recolección de muestras. (En la tabla 1 se muestran las características clínicas de los técnicos dentales fumadores.)

Tabla 1. Características clínicas en técnicos dentales fumadores

| Características clínicas | Trabajando en laboratorio | |
|--------------------------|---------------------------|-----------|
| | 1-10 años | > 10 años |
| Edad | 19-27 | 43-47 |
| Genero | Masculino | 8 (53)* |
| | Femenino | 4 (26) |
| Años en laboratorio | 12 (80) | 3(20) |
| Materiales | | |
| Yeso | 3 (20) | 0 |
| Metacrílico | 0 | 1 (6.6) |
| Porcelanas | 2 (13.3) | 0 |
| Metales | 5 (33.3) | 2 (13.3) |
| Alginatos | 2 (13.3) | 0 |
| Consumo de alcohol | 9 (60) | 2 (13.3) |
| Ingesta de medicamentos | 3 (20) | 0 |

* Números en paréntesis son porcentajes

Por otro lado evaluamos las condiciones bucales que presentaban los técnicos dentales y encontramos que el 83.1% presentaba dientes sanos y el 16.8% presentaba dientes con cavidades cariosas. Al incrementar la edad disminuyó el porcentaje de dientes cariados (66.6% vs 20%) entre los cuales el 66.6% presenta caries, obtenien-

do un total de 22 (5.62%) dientes cariados, (En la tabla 2 se muestran las características bucales de los técnicos dentales fumadores).

Tabla 2. Características bucales en técnicos dentales fumadores

| Características bucales | Trabajando en laboratorio | |
|-----------------------------|---------------------------|-----------|
| | 1-10 años | >10 años |
| Toma de radiografía | 7(46)* | 2 (13,3) |
| Uso de ortodoncia | 4 (26) | 0 |
| Uso de enjuague | 3(33,3) | 1 (6,6) |
| Dientes sanos | 325 (83,1) | 66 (16,8) |
| Dientes perdidos | 3 (20) | 0 |
| Dientes cariados | 10 (66,6) | 3 (20) |
| Restauraciones metálicas | 6 (40) | 0 |
| Restauraciones no metálicas | 10 (66) | 3 (20) |
| Provisionales | 1 (6,6) | 1 (6,6) |

* Números en paréntesis son porcentajes

Con respecto a la evaluación de las células exfoliadas de la mucosa oral la cual se llevó a cabo mediante microscopía óptica, en un total de 2,000 células, identificamos en todas las muestras datos de genotoxicidad, siendo la alteración nuclear más frecuente la presencia de micronúcleos en un 42.5%, células binucleadas 30.3% y núcleos lobulados (brotes nucleares) en un 27.1%. Además evaluamos si existe asociación entre la frecuencia de alteraciones nucleares y el tiempo de exposición a materiales dentales y tabaco, y encontramos que existe una mayor frecuencia de micronúcleos en sujetos que tienen >10 años de trabajo en el laboratorio dental en comparación con los que tienen un menor tiempo de trabajo. Siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0.0006$). Sin embargo no hubo una asociación con respecto a los años que los sujetos tenían fumando. (En la gráfica 1 se observa la comparación de micronúcleos de acuerdo a los años de trabajo en el laboratorio dental).

Gráfico 1. Comparación de micronúcleos de acuerdo a los años de trabajo en laboratorio dental.

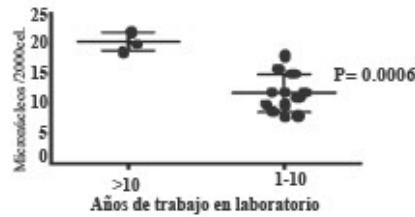


Gráfico 2. Comparación de binucleadas de acuerdo a los años de trabajo en laboratorio dental.

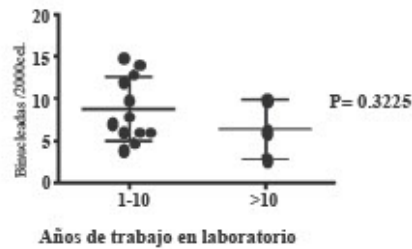
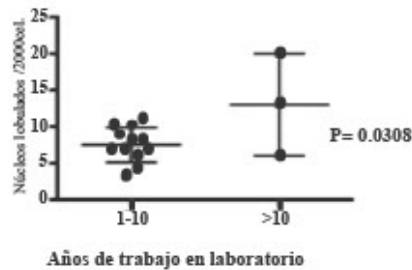


Gráfico 3. Comparación de núcleos lobulados de acuerdo a los años de trabajo en laboratorio dental.



Discusión:

En este estudio evaluamos la frecuencia de alteraciones nucleares de células exfoliadas de la mucosa bucal de técnicos dentales fumadores mediante la toma de citología exfoliativa. Las células de la

mucosa bucal son la primera barrera que está en contacto directo con diversas sustancias tóxicas las cuales pueden metabolizar a productos reactivos. (Kirsh, Zeiger, & Fench, 2008) La formación de micronúcleos es un biomarcador de gran utilidad para evaluar el daño genotóxico en células epiteliales y linfocitos en poblaciones altamente expuestas. En este sentido consideramos que los técnicos dentales son una población con un alto grado de exposición a materiales tóxicos, y además es frecuente el hábito de fumar, lo cual justifica el análisis de alteraciones nucleares en la mucosa bucal debido a que el 92% de las neoplasias malignas tienen un origen epitelial, siendo de nuestro interés el cáncer oral. En este estudio demostramos claramente que la frecuencia de alteraciones nucleares que tiene esta población doblemente expuesta fue de 13.41% en 2,000 células lo cual concuerda con lo reportado por Bansal y cols., (Himanta & Rajat, 2012) quienes encontraron una frecuencia del 15%, sin embargo su población evaluada fueron únicamente fumadores. En otro estudio realizado en técnicos dentales por Alí y cols., en el 2013, encontraron una frecuencia de MN de 6.23%, menor a la reportada por nosotros esto debido a que los técnicos dentales evaluados por este grupo de investigación hacían uso de medidas de protección como máscaras, guantes entre otros, la mayor frecuencia de micronúcleos identificada por nosotros se debe a que los técnicos dentales que evaluamos no hacen uso de barreras de protección al realizar su trabajo, aunado además al factor de exposición extra como es el tabaco. La relevancia de encontrar una mayor frecuencia de micronúcleos en nuestra población radica en el hecho de que existe un daño en la capa basal del epitelio bucal mostrando una mayor frecuencia de células que pierden fragmentos de cromosomas del núcleo, los

cuales permanecen excluidos del núcleo principal después de la mitosis, esto indica que existe una mayor probabilidad de cambios en la secuencia de genes, llevando a la activación de varios oncogenes después de su transposición o amplificación. Otra fuente de micronúcleos son cromosomas aberrantes completos, éste fenómeno lleva a aneuploidía una característica común de muchos carcinomas humanos, (Onkol, 2015).

Nuestros resultados indican que la exposición a materiales dentales y tabaco tiene un efecto genotóxico esto medido por la frecuencia de micronúcleos (42.5%) y brotes nucleares (27.1%) así como citotóxico ya que las células binucleadas se encontraron en 30.3% de las células evaluadas. Los brotes nucleares representan el primer cambio morfológico que sufre el núcleo para la formación de micronúcleos este fenómeno está ligado a genotoxicidad, (Leitao Almeida Andrade, 2004). Por otro lado se ha demostrado que en poblaciones expuestas a tabaco y alcohol incrementa la frecuencia de células binucleadas lo cual se asocia a citotoxicidad del epitelio bucal, (Celik, Avas, & Ergene, 2003, págs. 417-421).

El cigarro es considerado uno de los principales factores genotóxicos por tal motivo está bien documentado que es causa de cáncer. (Speit, Witton, Heepchantree Trenz, & Hoffman, 2003) Por otro lado metales como cromo, cobalto, níquel, molibdeno, silice, berilio, boro y carbono han mostrado también ser genotóxicos, el 46% de los técnicos evaluados utilizaban metales para la elaboración de prótesis dentales, ambos efectos aditivos pueden incrementar la posibilidad de desarrollar neoplasias malignas, por tal motivo se dará seguimiento a esta población y se realizará una exploración bucal con la finalidad de detectar cual-

quier cambio sugestivo de lesiones potencialmente malignas. Otro factor importante para el desarrollo de neoplasias malignas es el tiempo de exposición, en este sentido encontramos que conforme se incrementan los años de trabajo en el laboratorio >10 años aumenta la frecuencia de micronúcleos (30.1% vs 69.8% $p=0.006$) y núcleos lobulados (30.23% vs 69.76% $p=0.03$) lo cual está ligado a un incremento en el daño al DNA que es heredado a las células hijas, aumentando la posibilidad de desarrollar neoplasias malignas. Sin embargo no parece haber una asociación significativa entre los años de trabajo y células binucleadas las cuales son consideradas biomarcadores de citotoxicidad, cuyo daño no es acumulable ya que la célula entra en apoptosis y se da el recambio celular. Debido a que el daño al DNA y la muerte celular son considerados factores etiológicos durante la carcinogénesis química, nuestros datos pueden ser relevantes para futuros estudios en los cuales se evalúe el riesgo de poblaciones expuestas a sustancias tóxicas para prevenir el desarrollo de neoplasias malignas.

Conclusiones:

El hábito de fumar y los años de exposición prolongados a materiales utilizados en el laboratorio dental, favorecen la aparición e incremento de alteraciones nucleares principalmente micronúcleos y brotes nucleares biomarcadores de genotoxicidad.

Referencias bibliográficas

Celik, A., Avas, T., & Ergene, G. Z. (2003). "Cytogenetic biomonitoring in petrol station attendants: micronucleus test in exfoliated buccal cells" en *Mutagenesis* 18, [pp.417-421.]

Dawassas, A. A. (2013). "Evaluation of methyl methacrylate monomer cytotox

city in dental lab technicians using buccal micronucleus cytome assay, dental materials journal" CELIK en *master luqman*, [pp. 519-521.]

Himanta, B., & Rajat, B. (2012). "Evaluation of micronuclei in tobacco users: a study in punjabi population, contemporary clinical dentistry" en *Issue*, [pp. 184-187.]

Kirsh, H. B., Zeiger, V. B., & Fench, K. E. (2008). "The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for bio-monitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps" en *Mutat Res* 659, [pp. 93-108.]

Leitao Almeida Andrade, B. C. (2004). "Detection of micronuclei formation and nuclear anomalies in regenerative nodules of human cirrhotic livers and relationship to hepatocellular carcinoma." en *cancer Genet Cytoegenet*, [pp. 16-21.]

Onkol, M. (2015). "frequency of spontaneous aneuploidy in the healthy Hungarian population" en *sep59*, [pp. 198-204.]

Ramos Ibarra, M. L. (2013). "Utility Micronucleus Test and Nuclear Abnormalities in Exfoliated Cells" en *Int. J. Morphol.*, [pp. 650-657.]

Speit, G., Witton, D., Heepchantree Trenz, K., & Hoffman, H. (2003). "Investigations on the effect of cigarette smoking in the comet assay" en *Mutant Res* 542, [pp. 33-42.]

Thomas, P., Holland, N., Bolonges, c., & Kirsch-Volders, M. (2009). "Buccal micronucleus cytome assay" en *Nature Publishing Group*, [pp. 825-837.]

Torres-bulgarin, O., Guadalupe, Z.-c. M., Nicole, M.-r., & Flores Garcia Aurelio, R. I. (2013). "Procedimientos básicos de la prueba de micronúcleos y anomalías nucleares en células exfoliadas de la mucosa oral" en *El Residente*, [pp.4-11.]