

# GENOTOXICIDAD DE LAS RADIACIONES IONIZANTES COMPARADA CON LA UTILIZACIÓN DE ADHESIVOS CLÍNICOS DENTALES CLÍNICOS Y ALGUNOS ANESTÉSICOS QUIRÚRGICOS (SEVOFLUORANO) MEDIANTE LA TÉCNICA DE MICRONÚCLEOS

Amparo Olivares<sup>1</sup> , Miguel Alcaraz<sup>1</sup> José Antonio Garcia-Gamuz<sup>1</sup> , José Luis Navarro Fernandez<sup>1</sup> , Miguel José Ruíz Gómez<sup>2</sup> ,Ana Mercado<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Área de Radiología y Medicina Física. Facultad de Medicina. Universidad de Murcia

<sup>2</sup>Área de Radiología y Medicina Física. Facultad de Medicina. Universidad de Málaga

[mab@um.es](mailto:mab@um.es); [amparo.o.r@um.es](mailto:amparo.o.r@um.es); [gamuz@um.es](mailto:gamuz@um.es); [jlnf@um.es](mailto:jlnf@um.es); [mjrg@uma.es](mailto:mjrg@uma.es); [anamaria.mercado@um.es](mailto:anamaria.mercado@um.es).

## RESUMEN

Este estudio analiza la genotoxicidad de las radiaciones ionizantes en comparación con los efectos genotóxicos de adhesivos dentales clínicos y el anestésico quirúrgico sevofluorano, utilizando la técnica de micronúcleos en linfocitos humanos. Los resultados revelan que tanto los adhesivos dentales como el sevofluorano presentan efectos genotóxicos dependientes de la dosis y el tiempo, comparables en algunos casos a los inducidos por radiaciones ionizantes. Este trabajo destaca la importancia de evaluar los riesgos genéticos asociados al uso de estos compuestos en entornos clínicos y quirúrgicos.

## INTRODUCCIÓN

La genotoxicidad, definida como el potencial de un agente para dañar el material genético, es una preocupación creciente en medicina y odontología. Las radiaciones ionizantes son conocidas por inducir daño genético a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), que causan roturas en el ADN. Por otro lado, compuestos como los adhesivos dentales y el sevofluorano también han mostrado capacidad genotóxica, aunque los mecanismos y la magnitud de su impacto aún no están completamente caracterizados.<sup>1,2</sup>

El adhesivo dental, un material común en restauraciones dentales, puede liberar monómeros residuales y productos de degradación que interactúan con los tejidos orales y

sistémicos. De manera similar, el sevofluorano, ampliamente utilizado en anestesia quirúrgica, genera ROS y puede inducir daño genético. Este trabajo compara los efectos genotóxicos de estos agentes con los de las radiaciones ionizantes, utilizando la técnica de micronúcleos como herramienta de evaluación.

## OBJETIVOS

- Evaluar la genotoxicidad de las radiaciones ionizantes, adhesivos dentales y sevofluorano mediante la técnica de micronúcleos.
- Comparar la magnitud del daño genético inducido por estos agentes.
- Identificar posibles diferencias en los mecanismos de acción de cada agente.

## MATERIAL Y MÉTODO

### Muestras y Tratamientos

- **Radiación Ionizante:** Se utilizaron rayos X generados por un equipo Andrex SMART 200E (200 kV, 4.5 mA), administrando dosis de 2 Gy para los ensayos de genotoxicidad.
- **Adhesivos Dentales:** Se empleó Prime&Bond® NT en concentraciones del 25% y 50%, preparados en solución salina. Las muestras se polimerizaron con luz halógena (350 mW/cm<sup>2</sup>, 20 segundos). (Fig.1)

Prime & Bond Universal
PENTA (dipentaerythritol pentacrylate phosphate), 10-MDP (10-methacryloyloxydecyl dihydrogen phosphate), Active Guard™ Technology crosslinker
CQ/tertiary amine

Figura 1. Composición del Universal self-priming dental adhesive Prime&Bond® NT de DENTSPLY©. Dos gotas polimerizadas (Con-O2)/(Sin-O2) 3,907gramos producto polimerizado en 100 ml de suero. A diferentes tiempos (1 hora, 24 horas, 1 día y 3 semanas a concentraciones de 20µl al 25%.

- **Sevofluorano:** Se administró en volúmenes de 5, 20 y 40  $\mu\text{L}$ , diluido en solución salina fisiológica (Fig.2)

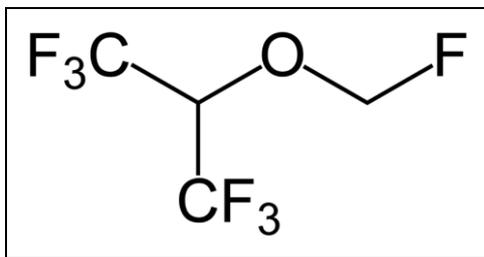


Figura 2. Estructura química del Sevofluorano que administramos puro en diferentes volúmenes (5, 20 y 40  $\mu\text{L}$ ).

### Ensayo de Micronúcleos (CBMN)

El ensayo de micronúcleos (MN) se realizó en linfocitos humanos cultivados, utilizando el método de micronúcleos con bloqueo de citocinesis (MNCB) como lo describieron Fenech y Morley (1985) <sup>3</sup>. En resumen: se cultivaron muestras de sangre total (0.5 ml) a 37°C durante 72 horas en 4.5 ml de medio F-10 que contenía 15% de suero fetal bovino, 1.6% ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) de fitohemaglutinina, 1% de penicilina/estreptomicina y 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de glutamina. Cuarenta y cuatro horas después del inicio del cultivo de linfocitos, se añadieron 150  $\mu\text{l}$  de citolacina B a una concentración de 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Después de 72 horas, los linfocitos fueron tratados con una solución hipotónica (0.075 M KCl) durante 3 minutos y fijados con metanol: ácido acético (3:1). Se prepararon muestras al aire y los portaobjetos se tiñeron con May-Grünwald Giemsa 24 horas después. Cada experimento se repitió en tres ocasiones.

Se analizaron cultivos triplicados para cada sustancia. En cada uno, se determinaron al menos 3000 células bloqueadas en citocinesis (CB) (**MN/500 CB**) por dos especialistas que analizaron los portaobjetos de todos los grupos mediante un método de doble ciego utilizando un microscopio de luz Zeiss (Oberkochen, Alemania) con una magnificación de 400X para examinar los portaobjetos y 1000X para confirmar la presencia o ausencia de micronúcleos en las células (3000 CB/muestra estudiada), según los criterios publicados. <sup>3,4</sup>

### Análisis Estadístico

En el estudio de genotoxicidad, el grado de dependencia y correlación entre las variables fue evaluado mediante análisis de varianza, complementado con un contraste de medias ( $p < 0.05$ ). Las medias cuantitativas fueron comparadas mediante análisis de regresión y correlación lineal.

## **RESULTADOS**

### Frecuencia de Micronúcleos:

En nuestro estudio genotóxico, la frecuencia basal de micronúcleos (MN) fue de  **$10 \pm 2$  MN** por cada 500 células bloqueadas (CB) para el **control no irradiado** de los linfocitos humanos utilizados en el ensayo. La irradiación con **2 Gy de rayos X** produjo un aumento significativo en la aparición de MN, alcanzando  **$28 \pm 4$  MN por cada 500 CB** ( $p < 0.001$ ), lo que expresa un daño genotóxico inducido por los rayos X (Fig. 3). Las radiaciones ionizantes aumentaron significativamente la frecuencia de micronúcleos ( $28 \pm 4$  MN/500 CB) en comparación con el control ( $10 \pm 2$  MN/500 CB).

La administración de las muestras de **Adhesivo dental (AD) a (con O<sub>2</sub> y sin O<sub>2</sub>)** causó la muerte de los linfocitos, lo que hizo imposible realizar el ensayo de micronúcleos. La concentración que permitió realizar el ensayo de micronúcleos adecuadamente fue de **25 %** de la concentración original.

Bajo estas condiciones, la administración de AD con O<sub>2</sub> y AD sin O<sub>2</sub> indujo un aumento significativo en la frecuencia de MN/500 CB ( $p < 0.001$ ) en comparación con los controles, lo que representa un efecto genotóxico inducido por el AD (Fig. 3).

La administración de **sevofluorano** causó un aumento dosis-dependiente en la frecuencia de micronúcleos (MN) en comparación con los controles ( $p < 0.001$ ) (Fig. 3), lo que indica un efecto genotóxico inducido por el sevofluorano. Los efectos genotóxicos causados por la administración de sevofluorano muestran una diferencia significativa con respecto a los causados por los tratamientos combinados de sevofluorano e irradiación cuando se utilizan dosis bajas de 5  $\mu$ L de sevofluorano ( $p < 0.01$ ).

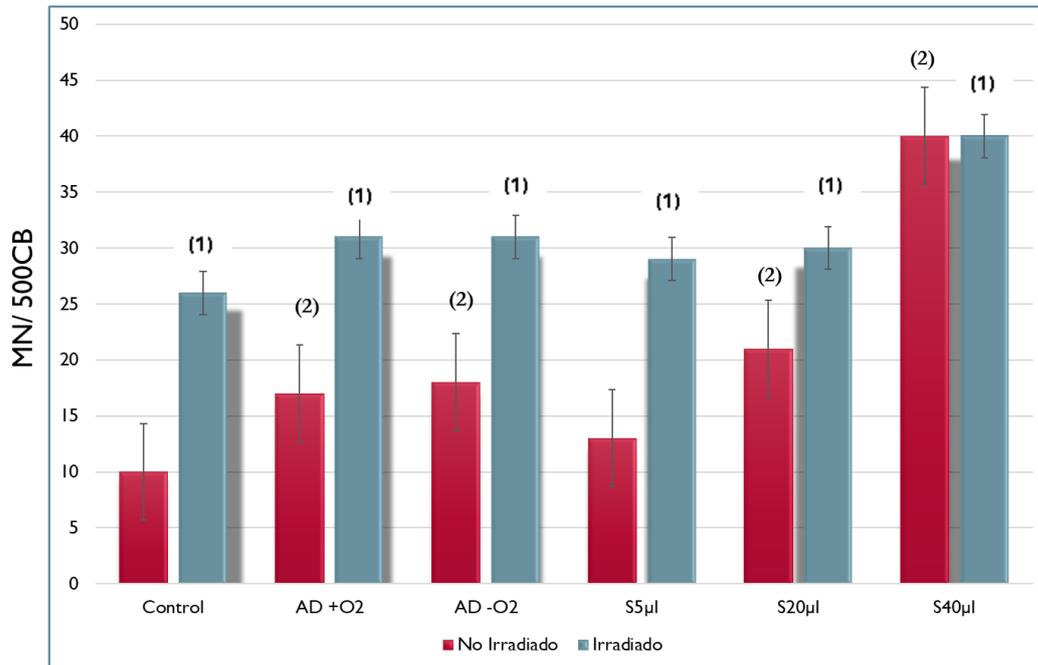


Figura 3. Efecto genotóxico (Frecuencia de MN/500 CB) de diferentes volúmenes de adhesivo dental / sevoflurano y radiación: C control, y S5, S20, S40 diferentes volúmenes de sevoflurano ( $\mu\text{L}$ ) AD O2, muestras de adhesivo dental en presencia de oxígeno; AD-O2, muestras de adhesivo dental en ausencia de oxígeno administrados solos o con la irradiación con rayos X. (1): ( $p < 0.001$  versus control No irradiado; (2): ( $p < 0.001$ ) versus control irradiado)

## DISCUSIÓN

La frecuencia de micronúcleos es una medida fiable tanto de la pérdida como de la rotura de cromosomas, lo que la hace única en comparación con otras pruebas citogenéticas. El daño cromosómico es un indicador de genotoxicidad y puede resultar, en última instancia, en la inducción de aneuploidía, además de ser un evento importante en la carcinogénesis.<sup>3,5</sup>

Nuestros resultados también muestran una genotoxicidad significativa del sevoflurano a dosis altas, alcanzando un número máximo de micronúcleos (MN) incluso con dosis de 40  $\mu\text{L}$ , similar a la respuesta generada por la exposición a 2 Gy de rayos X.

Diversos estudios han demostrado que las especies reactivas de oxígeno (ROS) contribuyen a la radioprotección cuando se preconditiona con sevoflurano. Además, el sevoflurano también puede desencadenar directamente la formación de peroxinitrito y se sabe que incrementa significativamente los niveles intracelulares de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (peróxido de hidrógeno), anión superóxido y óxido nítrico (NO) en los PMN después de 1 hora de tratamiento, intensificando así el agotamiento de glutatión (GSH) intracelular<sup>6</sup>.

El estrés oxidativo es el mecanismo de acción empleado por el sevofluorano para inducir daño cromosómico, de manera similar a la acción de los rayos X<sup>1</sup>.

Numerosos estudios han descrito el potencial genotóxico de diferentes AD<sup>7</sup> y sus capacidades citotóxicas en diferentes líneas celulares. Se ha descrito de la siguiente manera la citotoxicidad: a) a corto plazo, la liberación de monómeros libres que ocurren durante la conversión de monómero a polímero, b) a largo plazo, la liberación de sustancias solubles que se generan por la degradación y erosión con el tiempo. Además, la liberación de iones y el crecimiento bacteriano en la interfaz entre el material restaurador y los tejidos dentales también podrían causar una respuesta tisular<sup>8,9</sup>.

La generación de ROS (especies reactivas de oxígeno) induce una polimerización incompleta de los monómeros o la degradación de los polímeros con el tiempo, y se ha descrito como uno de los mecanismos que conducen a los efectos citotóxicos y genotóxicos dañinos en las células<sup>10</sup>.

Los resultados confirman que las radiaciones ionizantes, los adhesivos dentales y el sevofluorano inducen daño genético significativo. Las radiaciones ionizantes generan ROS directamente, mientras que los adhesivos dentales y el sevofluorano lo hacen de manera indirecta<sup>1,2</sup>.

La toxicidad del adhesivo dental se ve exacerbada en ausencia de oxígeno, lo que subraya la necesidad de mejorar los procesos de polimerización. Por otro lado, el sevofluorano, aunque efectivo como anestésico, presenta riesgos genéticos que deben ser considerados, especialmente en procedimientos quirúrgicos prolongados.

## **CONCLUSIONES**

Las radiaciones ionizantes, los adhesivos dentales y el sevofluorano tienen un impacto genotóxico significativo.

Los adhesivos dentales y el sevofluorano generan daño genético mediante mecanismos relacionados con ROS. Es esencial continuar investigando y desarrollar materiales clínicos más seguros.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Alcaraz M, Quesada S, Armero D, Martín-Gil R, Olivares A, Achel GD. Genotoxicity and cytotoxicity of sevoflurane in two human cell lines in vitro with ionizing radiation. *Colomb Med (Cali)*. 2014 30;45(3):104-9
2. Alcaraz M, Olivares A, Achel DG, García-Cruz E, Fondevilla-Soler A, Canteras-Jordana M. Toxicity of a dental adhesive compared with ionizing radiation and zoledronic acid. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2015 1;20(4):e427-34.
3. Fenech M, Morley A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Res*. 1985; 147: 29–36.
4. Alcaraz M, Armero D, Martínez-Beneyto Y, Castillo J, Benavente- Garcia O, Fernandez H, et al. Chemical genoprotection: reducing biological damage to as low as reasonably achievable levels. *Dentomaxillofac Radiol*. 2011;40:310-4.
5. Brozovic G, Orsolich N, Rozgaj R, Kasuba V, Knezevic F, Knezevic AH, et al. DNA damage and repair after exposure to sevoflurane *in vivo*, evaluated in Swiss albino mice by the alkaline comet assay and micronucleus test. *J Appl Genet*. 2010; 51: 79–86.
6. Wong CH, Liu TZ, Chye SM, Lu FJ, Liu YC, Lin ZC, et al. Sevoflurane-induced oxidative stress and cellular injury in human peripheral polymorpho nuclear neutrophils. *Food Chem Toxicol*. 2006; 44: 1399–407
7. Prica D, Galić N, Zeljezić D, Prica A. Genotoxicity evaluation of five different dentin bonding agents by chromosomal aberration analysis. *J Oral Rehabil*. 2006;33:462-71.
8. Pawlowska E, Poplawski T, Ksiazek D, Szczepanska J, Blasiak J. Genotoxicity and cytotoxicity of 2-hydroxyethyl methacrylate. *Mutat Res*. 2010;696:122-9.
9. Kaya A, Ündeğer Ü, Aydın S, Ömürlü H, Başaran N. Genotoxicity evaluation of dentine bonding agents by comet assay. *Int Endod J*. 2011;44:807-16.
10. Bouillaguet S, Wataha JC, Zapata O, Campo M, Lange N, Schrenzel J. Production of reactive oxygen species from photosensitizers activated with visible light sources available in dental offices. *Photomed Laser Surg*. 2010;28:519-25.