

TÍTULO DEL PROYECTO

Anomalías nucleares en células epiteliales de mucosa bucal de pacientes con aparatología ortodóntica fija.

SIGLAS

ANOCEL

TIPO DE PROYECTO

Basica

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

Salud pública estomatológica

DURACIÓN ESTIMADA

Fecha de inicio: 01/05/2019 Fecha de término: 31/03/2020

PARTICIPANTES

- CHUNA MOGOLLON PABLO (INVESTIGADOR) — 000000156
- LARCO LEON EDINSON REYNALDO (INVESTIGADOR) — 000000199
- ROCCA FARFAN DAVID ESTEBAN (ESTUDIANTE) — 000088019
- CARRUITERO HONORES MARCOS JIMMY (COORDINADOR(INV. PRINCIPAL)) — 000051224
- LEZAMA ASECIO PEDRO BERNARDO (DOCENTE) — 000000214

INSTITUCIÓN O LUGAR A EJECUCARSE

- UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO. (ESCUELA DE ESTOMATOLOGIA)

I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El sistema alambre-bracket es usado comúnmente en ortodoncia para lograr el movimiento dental. Actualmente existe una gran variedad de brackets, arcos y demás aditamentos fabricados a partir de aleaciones que contienen níquel (Ni) como lo son el acero inoxidable (FeCrNi) y aleaciones de Níquel-Titanio (Ni-Ti). El níquel es un metal con un alto grado de alergenidad y además es considerado un potente tóxico del sistema reproductor, pulmonar, hematotóxico, inmunotóxico, neurotóxico, genotóxico, nefrotóxico y cancerígeno. (1)

En la literatura se ha evaluado la liberación de iones de dispositivos de ortodoncia en la saliva, mostrándose controversia *in vitro* e *in vivo* sobre el origen de genotoxicidad o citotoxicidad. El aumento significativo de sujetos que utilizan aparatología ortodóntica, la probabilidad de producir rupturas en el ADN de las células de la mucosa oral por parte de los aditamentos de ortodoncia; asimismo, los riesgos en la salud que pueden producir el aumento de los niveles de níquel, (2) son aspectos que ameritan un estudio a mayor profundidad en el tema.

El conocimiento claro de si la aparatología ortodóntica puede causar una alteración en la cavidad bucal, de tal modo que ocasione un aumento significativo capaz de generar alteraciones en los

pacientes, es fundamental para orientar a los pacientes y los profesionales del área a un cambio u optimización de los recursos metálicos utilizados en ortodoncia. (2)

En la última década se ha utilizado el ensayo de micronúcleos en diversas situaciones clínicas, como un método no invasivo para el control biológico. También se ha utilizado para evaluar los efectos de los agentes genotóxicos, como el humo del tabaco, el alcohol, el pesticida, y formaldehído. (3,4,5)

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

La implementación de este estudio va a representar una nueva forma de diagnóstico citológico, al mostrar resultados certeros de los cambios que están ocurriendo genéticamente y de esta manera prevenir patologías que puedan presentarse en un futuro.

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

Por lo cual surge la pregunta: ¿Se generan anomalías nucleares en células epiteliales de la mucosa bucal de pacientes con aparatología ortodóntica fija?

II. ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

Martín-Cameán A y col., 2015, en un estudio de revisión sobre la evidencia in vitro e in vivo de los efectos citotóxicos y genotóxicos de la liberación de metales por aparatos ortodónticos, analizaron los efectos cito-genotóxicos de este tipo de aplicaciones ortodoncias en humanos. Seleccionaron 23 estudios que cumplieron con los criterios (PICO), observando diferencias significativas en la mayoría de los estudios (5 de 6) respecto a daños citotóxicos y genotóxicos después de un tratamiento corto (1-3 meses) y a largo plazo (24-48 meses). Algunos estudios que evaluaron efectos post-tratamiento (2 de 3) no encontraron diferencias significativas con respecto a los controles después de eliminar las aplicaciones ortodónticas; concluyendo, por lo tanto, en la necesidad de llevar a cabo ensayos clínicos aleatorios para determinar la continuidad de los daños cito/genotóxicos inducidos durante el tratamiento ortodóntico en población joven (12-26 años). (6)

González AC. y Mora E. 2013, realizaron un estudio comparativo para determinar la presencia de

micronúcleos en células de la mucosa oral de individuos con aparatología ortodóntica fija y sujetos sin tratamiento ortodóntico, usando 20 muestras de mucosa yugal de individuos con ortodoncia fija (Grupo A) y 20 muestras de individuos sin ortodoncia (Grupo B), encontrando que el uso de aparatología ortodóntica se asoció significativamente con la presencia de micronúcleos tanto en células mononucleadas como binucleadas ($p=0.048$ y $p=0.048$). Esta asociación también se observó con un número significativamente mayor de micronúcleos en células mononucleadas y binucleadas a diferencia del Grupo B (media= 18 Vs 0.4; $p=0.008$ y media= 3.2 Vs 0.4; $p=0.032$, respectivamente); concluyendo que el uso de aparatología ortodóntica fija puede inducir daño genotóxico caracterizado por la aparición de micronúcleos en células epiteliales de la cavidad oral. Sin embargo, estos resultados fueron preliminares y por lo tanto es necesario aumentar el número de muestras para ambos grupos. (3)

Reddy S. 2016. En un estudio sobre los efectos de los componentes de la aparatología ortodóntica sobre las células epiteliales de la mucosa bucal que están en contacto con la aparatología, evaluaron los efectos de aparatos ortodónticos de acero inoxidable y cerámica sobre las células epiteliales de la mucosa bucal adyacente y compararon las alteraciones morfométricas y morfológicas, analizando 29 individuos, divididos en dos grupos (Grupo A con brackets de metal y Grupo B con brackets de cerámica). En T1, se encontró un incremento en el área citoplásmica en células de mucosa bucal adyacentes a ambos brackets de metal y cerámica. En T2, ésta morfometría citoplasmática alterada persistió solamente en células adyacentes a los brackets de metal, aunque en menor grado que en T1. En este último, se notó una gran disminución en el área nuclear en células adyacentes a los brackets de metal con relación a las próximas a los brackets de cerámica. En T2, hubo completa recuperación del área nuclear en células adyacentes a los brackets de cerámica, pero en brackets de metal la recuperación no fue completa; aunque estas alteraciones no sugirieron malignidad. (7)

III. FUNDAMENTACIÓN DE LAS ACTIVIDADES NO LECTIVAS

Las actividades no lectivas serán desarrolladas durante los horarios de atención de la clínica estomatológica de la Universidad Privada Antenor Orrego y según las coordinaciones realizadas entre los investigadores para la ejecución efectiva del procedimiento planteado en el presente proyecto de investigación.

III. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO (IMPORTANCIA, BENEFICIARIOS, RESULTADOS ESPERADOS)

El daño del DNA a nivel cromosómico es una parte importante en la toxicología genética ya que la mutación es fundamental en el proceso de carcinogénesis. La integridad genética humana está

cada vez más amenazada por la actividad industrial que da lugar a exposiciones genotóxicas químicas y físicas, cuyo daño genético es probablemente la causa más importante para el desarrollo de anomalías y enfermedades degenerativas. Sin embargo, existen pocos estudios que se centran en la medición y evaluación de los efectos genotóxicos de los productos que día a día van adquiriendo una mayor utilidad en la sociedad, las sustancias que hacen parte del ambiente, procedimientos médicos como radiación y agentes químicos, deficiencia de nutrientes como el ácido fólico, hábitos como alcoholismo, tabaquismo, drogadicción, stress, estilos de vida; o factores genéticos tales como alteraciones en el metabolismo y/o reparación del DNA. (8)

Existen tres razones fundamentales que justifican la preocupación por la exposición del hombre a los agentes mutagénicos. Primero, el incremento en el grado de mutación de las células germinales (óvulos, espermatozoides y sus precursores), lo cual puede provocar un aumento de la incidencia de las enfermedades genéticas en futuras generaciones. Segundo, la presencia de una estrecha relación entre la inestabilidad genómica de células somáticas con el cáncer y las enfermedades degenerativas crónicas. Tercero, el origen ambiental del cáncer. Por estos motivos, surge la necesidad de realizar ensayos clínicos que nos brinden información acerca de la actividad mutagénica de estas sustancias, sumándole el hecho de que la toxicología es actualmente un elemento cada vez más importante de la salud ambiental y sobre todo debido a la escasa y controversial información presentada en la literatura científica sobre el tema, y a la ausencia de trabajos en nuestro país sobre marcadores mutagénicos por el uso de brackets y alambres ortodónticos, dispositivos muy utilizados en todas las edades con predominio en adolescentes; por lo que un estudio detallado considerando este tipo de materiales será de ayuda para su uso más racional (8).

IV. OBJETIVOS

Objetivo General

(Propósito del proyecto)

Resultados Finales

Medios de Verificación

Comparar las anomalías nucleares citológicas en células de la mucosa bucal entre zonas con y sin contacto directo con aparatología ortodóntica fija de pacientes atendidos en clínicas privadas de la ciudad de Trujillo.	Comparación de los tipos de anomalías citológicas más frecuentes en las células de mucosa bucal en zonas con y sin contacto directo con aparatología ortodóntica fija de pacientes estudiados.	Tablas comparativas de los promedios de la frecuencia de anomalías entre las zonas con y sin contacto directo con aparatología ortodóntica fija.
---	--	--

IV. OBJETIVOS

Objetivos Específicos

(Componentes)

Resultados Intermedios

Medios de Verificación

1. Describir las anomalías nucleares en células de mucosa oral empleando diferentes métodos de coloración.	1. Descripción de las anomalías nucleares en células de mucosa oral empleando diferentes métodos de coloración.	1. Tablas descriptivas de las anomalías nucleares en células de mucosa oral empleando diferentes métodos de coloración.
2. Describir las alteraciones en el DNA en células de mucosa oral empleando métodos moleculares.	2. Descripción de las alteraciones más comunes en el DNA en células de mucosa oral empleando métodos moleculares.	2. Tablas descriptivas con las alteraciones más comunes en el DNA en células de mucosa oral empleando métodos moleculares.
3. Comparar las anomalías nucleares citológicas y moleculares en células de la mucosa oral antes y después de seis meses del contacto directo con aparatología ortodóntica fija de pacientes atendidos en clínicas privadas de la ciudad de Trujillo.	3. Comparación de los tipos de anomalías citológicas como moleculares más frecuentes en las células de mucosa oral antes y después de seis meses del contacto directo con aparatología ortodóntica fija de pacientes estudiados.	3. Tablas comparativas de los tipos de anomalías citológicas como moleculares más frecuentes en las células de mucosa oral antes y después de seis meses del contacto directo con aparatología ortodóntica fija.
4. Comparar diferentes métodos de coloración en la identificación de anomalías nucleares citológicas y moleculares en células de la mucosa oral en zonas con contacto directo con aparatología ortodóntica fija de pacientes atendidos en clínicas privadas de la ciudad de Trujillo.	4. Comparación de los tipos de anomalías nucleares observadas con distintos métodos de tinción.	4. Tablas comparativas de los tipos de anomalías nucleares observadas con distintos métodos de tinción.

V. MARCO TEÓRICO

Durante la división celular el material genético que está en el núcleo, se replica y divide

equitativamente dando lugar a dos células hijas idénticas. Múltiples factores pueden afectar este proceso, como errores en la replicación, roturas cromosómicas y efectos genotóxicos, el resultado será una división del material genético no equitativo y pérdida cromosómica. El material genético que se desprende queda excluido del núcleo de la célula hija, formando un nuevo núcleo de menor tamaño que el principal, llamado micronúcleo, el cual es fácilmente visible al microscopio óptico. (8)

En el epitelio oral se produce una constante renovación de células, en el cual las células que se desprenden son reemplazadas por nuevas células resultantes de la mitosis que se produce en la capa basal. Es en la capa basal donde se encuentran las células madre capaces de expresar alteraciones genéticas durante la división celular tales como micronúcleos. Las células hijas, que pueden o no incluir micronúcleos, se diferencian en la capa espinosa y la queratinizada para luego exfoliar en la cavidad bucal. Algunas de estas células pueden degenerar en células con cromatina condensada, núcleos fragmentados, núcleos pignóticos o pueden perder por completo su material nuclear. Estos biomarcadores de daño genético y muerte celular se pueden observar tanto en linfocitos como en células de la cavidad bucal proporcionando mayor información sobre el daño del genoma. (8)

El ensayo de micronúcleos es uno de los estudios de preferencia para la determinación de riesgo potencial de daños en el DNA relacionado con la exposición a agentes genotóxicos. Esta prueba es la más frecuentemente usada para detectar rupturas cromosomales o interferencias en el proceso de mitosis y puede ser aplicada a células de diversos tejidos como por ejemplo linfocitos de sangre periférica o células de la mucosa bucal humana, proporcionando información sobre el daño citogenético de tejidos y especialmente permitiéndonos evaluar aquellos lugares blanco de los agentes carcinogénicos humanos donde se podrían desarrollar neoplasias o carcinomas logrando acceder a la adecuada y suficiente toma de muestras sin causar incomodidad. (9)

Las aberraciones cromosomales consisten en anormalidades en los cromosomas respecto al número (aploipode, poliploide) o cambios estructurales (translocación, duplicación). Se interpreta entonces la presencia de aberraciones cromosomales como una respuesta frecuente e importante a la exposición ante agentes mutagénicos físicos o químicos. Su importancia se basa en la relación con enfermedades genéticas hereditarias y su participación en la carcinogénesis. Los defectos segregacionales son una de las causas de inestabilidad cromosomal, cuando se forman núcleos céntricos y acéntricos durante la telofase, lo cual es de gran relevancia en los procesos oncogénicos. Las posibles consecuencias de esta inestabilidad son: alteración del número de copias de uno o más genes, un cambio en la expresión genética o cambio en la estructura genética de tal manera que la proteína es alterada, lo cual a su vez puede conducir tanto al aumento como a la disminución de la actividad de dicha proteína. Las aberraciones cromosómicas están relacionadas con un aumento del riesgo de cáncer. (8)

La mutación cromosómica se identifica básicamente mediante ensayos citogenéticos que consisten en exponer células animales o humanas a la sustancia química en placas de cultivo, teñir cromosomas y luego visualizar directamente en el microscopio los cromosomas para detectar alteraciones en estructura o número, entre los cambios más significativos y aceptados actualmente están las aberraciones cromosomales y como una subcategoría, los micronúcleos. (8)

Los micronúcleos son cuerpos pequeños, extranucleares que aparecen durante el proceso de división celular, principalmente provienen de fragmentos de cromosomas acéntricos, fragmentos de cromátidas acéntricas o cromosomas completos que no se incluyen exitosamente en el núcleo de las células hija en la etapa de telofase por defectos en el proceso de segregación durante la anafase. (10)

Se produce la formación de micronúcleos a partir de fragmentos de cromátidas y cromosomas cuando las rupturas del DNA de doble cadena, sin reparación, pueden producir cromátidas simétricas y asimétricas e intercambio de cromosomas al igual que fragmentos tanto de cromátidas como de cromosomas, pero esto es solo posible cuando el nivel de daño del ADN supera la capacidad reparativa de la célula en un periodo de tiempo determinado. Otro mecanismo consiste en la escisión simultánea de la reparación de los daños del DNA o incorporación inapropiada de bases al ADN en lugares opuestos de la doble hélice. La formación de micronúcleos a partir de una mala segregación de cromosomas completos se produce cuando se detectan micronúcleos en células sin previa exposición a genotoxinas se deduce que son originados a partir de fragmentos de cromosomas acéntricos o pérdida de cromosomas completos en una proporción de 30% y 70% respectivamente, dependiendo de la edad y el género, siendo mayor en mujeres que en hombres. (8,9)

Los cromosomas sexuales contribuyen a la mayoría de los eventos de pérdida cromosomal con relación al incremento de la edad. En las mujeres, el cromosoma X se puede relacionar con el 72% de los micronúcleos observados, de los cuales un 37% parecen carecer de un cinetocoro funcional, lo cual sugiere que el defecto puede ser a nivel del ensamblaje del cinetocoro debido a la inactivación del cromosoma X. Hay una serie de posibles mecanismos que conducen a la formación de micronúcleos a partir de cromosomas completos, por defectos en la segregación durante la etapa de anafase. Uno de ellos es la hipometilación de citosina, el proceso normal de metilación consiste en transferencia de grupos metilos a algunas de las bases citosinas situadas previa y contiguamente a una guanina; el grado de transcripción es inversamente proporcional a la metilación. Al producirse errores en la transcripción genética se altera la secuencia del DNA, la pérdida de metilación o hipometilación se asocia al riesgo de cáncer. (8,9)

Otra posibilidad para la formación de micronúcleos se da cuando se pierden los cromosomas debido a mutaciones producidas por defectos en la dinámica de interacción entre el cinetocoro y los microtúbulos. Otra variable que probablemente aumente la incidencia de micronúcleos por pérdida cromosomal son los defectos en el ensamblaje del huso mitótico, defectos en el punto de verificación y amplificación anormal de los cromosomas. Un estudio reciente, sugiere que los cromosomas dicéntricos resultantes de las fusiones finales de los telómeros pueden estar involucrados en los eventos de malsegregación; esto puede ocurrir cuando los centrómeros del cromosoma dicéntrico son atraídos hacia los polos opuestos de la célula durante la anafase con tal fuerza que separan el cromosoma del huso. (8,9)

Durante un tratamiento de ortodoncia, los objetivos principales son proporcionarle al paciente resultados estéticos y funcionales, tomando en cuenta los aspectos de una oclusión ideal. En gran parte por que los elementos que utilizamos dentro de esta área de la odontología son aparatos de metal. Existe un factor en este tipo de aparatología que puede causar alteraciones a nivel génico, como lo es la liberación de iones metálicos proveniente de los mismos, como aleaciones de níquel y cromo en los pacientes que lo portan. Por lo tanto, es posible que estas aleaciones de níquel y cromo de los aparatos de ortodoncia, en cantidades suficientes, puede inducir efectos genotóxicos localizados. Aparatos ortodónticos fijos que consisten en bandas, soportes y alambres se hacen comúnmente de austenítico acero inoxidable (SS) que contiene 18% de cromo y 8% de níquel. La descarga de iones de níquel, un fuerte sensibilizador inmunológico, puede provocar hipersensibilidad, dermatitis de contacto, asma, y citotoxicidad. (3)

La corrosión de una aleación es de fundamental importancia para su biocompatibilidad porque la liberación de elementos de la aleación es casi siempre necesaria para efectos adversos biológicos tales como toxicidad, alergia, mutagenicidad y carcinogenicidad. Aleación y corrosión proporciona iones libres que afectan a los tejidos alrededor de ella. Hay poca evidencia de que los elementos liberados de aleaciones de fundición contribuyen significativamente a la toxicidad sistémica. La causa de esto podría ser explicado por la baja liberación de iones a través del tiempo. La tolerancia de metal y las cantidades que causan toxicidad no son muy claras. Los metales no son biodegradables, y su liberación sostenida puede producir efecto tóxico irreversible de su acumulación en los tejidos. Además, la mayor exposición podría limitar el tiempo de recuperación necesario para la reparación celular. La toxicidad del metal se rige por múltiples factores, por lo que es difícil evaluar realmente los niveles que puede producir daño celular. (3,11,12,13)

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

componentes de la mayoría de las aleaciones de ortodoncia, se clasifican como carcinógenos químicos. El conocimiento reciente en los mecanismos celulares y moleculares de la toxicidad de metales podría producir cierta preocupación cuando se trata de aparatología ortodóntica. Esto es debido al contacto directo, exposición prolongada con los tejidos orales y la corrosión, lo que resulta en la liberación de varios tipos y cantidades de iones metálicos (3).

VI. HIPÓTESIS

El uso de aparatología ortodóntica fija genera anomalías nucleares citológicas y moleculares en células de la mucosa oral de los pacientes atendidos en clínicas privadas de la ciudad de Trujillo.

VII. METODOLOGÍA

METODOLOGÍA PARA DETECTAR MICRONÚCLEOS Y OTRAS ANOMALÍAS EN CÉLULAS EPITELIALES

Muestra del estudio

La muestra estará compuesta por 24 sujetos voluntarios, que asisten a consultorios odontológicos de la ciudad de Trujillo. Su edad oscilará entre 12 y 25 años. Para calcular el tamaño de muestra se tomó en consideración una desviación estándar de 6.04 en base a un estudio previo (Heravi et al.) con una diferencia mínima a ser detectada de 4 micronúcleos por cada 1000 células, con una potencia de 80% y una confianza del 95%, con lo cual se obtuvo un tamaño mínimo de muestra de 20, al cual se le incrementó el 20% para suplir la posibilidad de pérdidas, definiéndose una muestra final de 24.

Los criterios de inclusión serán: pacientes que requieran tratamiento de ortodoncia fija sin extracciones en ambos arcos, hasta primeros o segundos molares, con presencia de todas las piezas dentarias hasta segundos molares, con piezas dentarias sin restauraciones de amalgama o que presenten bordes afilados y con mucosa oral sana al examen clínico antes de iniciar el tratamiento de ortodoncia. Serán excluidos los pacientes que hayan tenido ortodoncia previa, con uso actual de medicamentos o suplementos, con enfermedades orales o sistémicas, con alergias a joyas u otros productos que contengan Níquel o Cromo, fumadores, o que usen enjuagues o bebidas a base de alcohol.

Características de la aparatología ortodóntica.

Los aparatos de ortodoncia consistirán en: tener la instalación mínima de 4 tubos bucales en la arcada superior e inferior desde el primer mes, de 16 a 20 brackets de la misma marca y prescripción, ranura de 0.022 pulgadas. Los tubos y los brackets serán de acero inoxidable.

Los arcos de alambre utilizados en el transcurso de este estudio hasta los seis meses de evaluación incluirán 0.012 pulgadas de níquel-titanio, 0.014 pulgadas de níquel-titanio, 0.016 pulgadas de níquel-titanio, 0.016 × 0.022 pulgadas de Níquel-Titanio, 0.017 × 0.025 pulgadas de níquel-titanio, arcos de acero inoxidable de 0.016 × 0.022 pulgadas y arcos de acero inoxidable de 0.017 × 0.025 pulgadas según las necesidades de cada caso. Los alambres del arco se sujetarán con ligaduras elastoméricas y metálicas de acero. Después del estudio un especialista en ortodoncia continuará con todos los tratamientos hasta culminar con los objetivos de los planes de tratamiento previamente establecidos.

Colección de células epiteliales de mucosa bucal

Previo a su colección, cada paciente voluntario debe enjuagarse la boca con abundante agua a fin de remover cualquier residuo que interfiera con el análisis.

Las células epiteliales se colectaran de la cara interna de ambas mejillas y labios empleando citocepillos, las que serán transferidas a tubos de eppendorf conteniendo solución salina 0.9%, Tris EDTA en Buffer pH 7.; organizándolos en gradillas y almacenados en hielo dentro de un recipiente adecuado.

En el laboratorio, para liberar las células se retirará cada cepillo citológico agitándolo suavemente para liberar las células adheridas a ella, y luego se centrifugará a 2000 rpm/5 min; luego de lo cual se eliminará el sobrante.

Preparación de las láminas

El pellet obtenido será transferido por frotis a laminas portaobjetos y secados a temperatura ambiente, la misma será fijada en una mezcla de metanol – ácido acético glacial en proporción 3:1. Se prepararan 5 láminas para cada muestra, las que serán debidamente codificados.

Coloración

Se usarán diferentes tipos de coloraciones que cuentan con procedimientos universales, tales como Feulgen modificado (Feulgen-Schiff's-Fast Green), DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride), naranja de acridina, ioduro de propidieum, Giemsa (May-Grunwald-Giemsa 2 – 10%), y orceina acética. Esto permitirá observaciones con microscopio óptico y de fluorescencia

Análisis de las láminas

Las láminas codificadas de cada muestra serán leídas por 3 investigadores y manteniendo dos láminas como respaldo, contando para ello 1000 células por muestra e investigador; variando este número acorde al número de ajáosoma observados y bajo las normas ya establecidas. Las anomalías que deben analizarse son; micronúcleos, células binucleadas, broken egg o nuclear bud, ajáosoma, cariolisis, picnosis, cromatina condensada.

Consideraciones éticas

Se tendrán en consideración los principios éticos de la declaración de Helsinki y los principios del comité de ética de la Universidad Privada Antenor Orrego. Los objetivos del estudio serán totalmente explicados a los participantes y se obtendrá un consentimiento informado de cada sujeto antes del muestreo. Los menores de edad firmarán también un asentimiento informado y deberán contar con el consentimiento informado previo de un tutor, padre o apoderado.

Análisis estadístico

Los datos recolectados serán procesados en el programa estadístico Stata v. 14 (StataCorp, Texas, USA). Se calculará el promedio, desviación estándar, rango e intervalos de confianza de las frecuencias de las anomalías celulares y nucleares. Para comparar los promedios de la frecuencia de anomalías nucleares citológicas y moleculares entre zonas con y sin contacto, así como entre las muestras antes y después de seis meses del contacto directo con aparatología ortodóntica fija se empleará la prueba estadística T de Student para grupos relacionados. Para comparar los promedios de las frecuencias de anomalías celulares y nucleares entre los diferentes métodos de coloración se empleará ANOVA de una vía para grupos relacionados. Dichas pruebas se aplicarán luego de verificar la distribución normal y homocedasticidad de los datos. En todos los casos se considerará un nivel de significancia del 5%.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Das KK, Das SN, Dhundasi SA. Nickel, its adverse health effects & oxidative stress. Indian J Med Res. 2008 Oct;128(4):412-25.
2. Díaz AJ, Causado VK, Rumbo MF, Fang LC. Niveles de níquel en saliva, biopelícula y mucosa bucal de sujetos antes y durante el uso de aparatología ortodóntica fija. %5BTesis%5D. Cartagena: Universidad de Cartagena; 2015.

3. González AC, Mora E, Díaz AJ. Micronúcleos en mucosa oral en individuos con aparatología ortodóncica en la universidad de ajáosom. %5BTesis%5D. Cartagena: Universidad de Cartagena; 2013.
4. Harshvardhan SJ, Alka Dk, Mohan KP. Micronucleus as Potential Biomarker of Oral Carcinogenesis. IJDA, 2(2), 2010.
5. Gupta A, Bhovi TV, Jaju P. Micronuclei frequency as an early diagnostic tool for detection of oral cancer: A comparative study. Intl J Oral Health Dent. 2016;2:77-83.
6. Martin AM. Evaluación de la liberación in vivo de iones metálicos a partir de aparatología ortodóncica en diversas matrices y sus potenciales efectos tóxicos. %5BTesis%5D. Sevilla: Universidad de Sevilla; 2015.
7. Reddy S. Effects of Components of Orthodontic Appliances on the Epithelial Cells of the Buccal Mucosa That are in Contact with the Appliances: A Cytomorphometric Analysis. IOSR-JDMS. 2016;15(5):92-5.
8. Díaz A, Mora E, Herrera A. Presencia de micronúcleos en células epiteliales de encías, como marcador de inestabilidad cromosomal. Revisión sistemática. Av. Odonto Estomatol. 2013;29(2): 95-102.
9. Torres O, Ramos ML. Utilidad de la Prueba de Micronúcleos y Anormalidades Nucleares en Células Exfoliadas de Mucosa Oral en la Evaluación de Daño Genotóxico y Citotóxico. Int. J. Morphol. 2013; 31(2):650-7.
10. Zalacain M, Sierrasesúmaga L, Patiño A. El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. Anales Sis San Navarra. 2005;28(2):227-36.
11. JVA Rodriguez. Lesiones fácticas por tratamiento ortodóntico. Virtual Jorunal of Orthodontics. 2004;6(3):43-54.
12. FGS Shahsavari, S Farhadi, P Mazinani, S Delavari. Occupational exposure in dental laboratory technicians may induce nuclear abnormalities in buccal mucosa cells: a preliminary study. Journal of Research in Dental and Maxillofacial Sciences 2016. 1(22): 23-7
13. Pratheepa N, Anjana M, Sundarapandian S.. role of caricinogens in oral cancer: a micronucleus study. Int j anat res 2015. 3(4):1721-25.

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

ACTIVIDAD	INICIO	FIN
Selección de la muestra para el estudio	01/05/2019	31/05/2019
Recolección de los datos y monitoreo de los pacientes	01/06/2019	15/01/2020
Informe Parcial del Proyecto	18/09/2019	15/10/2019
INFORME PARCIAL DEL PROYECTO	15/12/2019	15/01/2020
Procesamiento estadístico de los datos	16/01/2020	24/01/2020
Redacción del informe final	25/01/2020	13/02/2020
Elaboración y presentación del artículo a una revista para publicación	14/02/2020	31/03/2020
INFORME FINAL DEL PROYECTO	01/03/2020	15/03/2020
Informe Final del Proyecto	16/03/2020	31/03/2020

PRESUPUESTO			
DESCRIPCION	CANTIDAD	PRECIO_UNITARIO	PRECIO_PARCIAL
TESISTA	1 UNI	1500	1500
APOYO	1 UNI	2000	2000
OTROS	1 UNI	7103.30	7103.30
CONSULTOR	1 UNI	500	500
TRANSPORTE LOCAL	1 UNI	250	250
Análisis en Laboratorio Externo	72 P01	120	8640
			Total 19993.30