



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

**Análisis Comparativo de los Niveles
Sistémicos de Citocinas, Lipoperóxidos
y de Metales Pesados/Oligoelementos
en Pelo de Portadores de Implantes
Dentales y/o Amalgamas Dentales**

D. José María Parmigiani Izquierdo

2017

UNIVERSIDAD DE
MURCIA



ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Tesis doctoral

**Análisis comparativo de los niveles sistémicos
de citocinas, lipoperóxidos y de metales
pesados/oligoelementos en pelo de portadores
de implantes dentales y/o amalgamas dentales**

Directores

Dr. D. José Joaquín Merino

Dr. D. Fabio Camacho Alonso

Doctorando

D. José María Parmigiani Izquierdo



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. José Joaquín Merino Martín, Investigador del Instituto de Investigaciones Neuroquímicas de la Universidad Complutense de Madrid, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Análisis comparativo de los niveles sistémicos de citocinas, lipoperóxidos y de metales pesados/oligoelementos en pelo de portadores de implantes dentales y/o amalgamas dentales", realizada por D^o. Jose María Parmigiani Izquierdo, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 5 de Septiembre de 2017



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. Fabio Camacho Alonso, Profesor Titular de Universidad del Área de Estomatología en el Departamento de Dermatología, Estomatología, Radiología y Medicina Física, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Análisis comparativo de los niveles sistémicos de citocinas, lipoperóxidos y de metales pesados/oligoelementos en pelo de portadores de implantes dentales y/o amalgamas dentales", realizada por Dº. Jose María Parmigiani Izquierdo, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 5 de Septiembre de 2017



AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA



AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

Al Dr. Fabio Camacho Alonso por aceptar este proyecto, por su ayuda y consejos desinteresados que han hecho posible culminar estos estudios.

Mi más sentido agradecimiento al Dr. José Joaquín Merino por su humildad y paciencia, por contagiarme su pasión y entusiasmo por los oligoelementos y moléculas y por los consejos, enseñanzas y dedicación incondicional en esta investigación.

A todas mis asistentes, auxiliares e higienistas que han colaborado durante mis 27 años de profesión. Han sufrido y disfrutado de mis retos y logros en todos estos años con paciencia y profesionalidad. Gracias

A mis pacientes, que con respeto y paciencia han confiado en mí, han aceptado asistir a nuestra consulta con gratitud e involucrarse en este proyecto.

A todos quienes colaboraron de una u otra manera en esta tesis, mi más profundo agradecimiento.

A mis hermanas, Silvia y Karina, aunque están en la distancia, por su apoyo y sentimientos de amor a mi persona, que me han dado fuerza para seguir adelante.

Finalmente, agradecer a mis padres, Tata y Sasa, por haberme educado en la voluntad, sacrificio y responsabilidad con la intención de trabajar con buen hacer, honestidad y dedicación a los paciente, fin último de nuestra profesión.

José María Parmigiani Izquierdo, 2017







Dedicado a, María Eugenia

Y a mis hijos, José María, María Victoria, Nicolás Mariano



INDICE DE ABREVIATURAS

A: Grupo con amalgamas

A+I: Grupo con amalgamas e implantes dentales

ac: ácido

ADA: Asociación Dental Americana

ADN: ácido desoxirribonucleico

Ag: plata

Al: aluminio

AST: Aspartato transaminasa

ATP: Adenosín trifosfato

B: boro

Ba: bario

Be: berilio

Cont: Grupo control

Ca⁺⁺: calcio

Cd: cadmio

CIROM: Centro de Implantología y Rehabilitación Oral Multidisciplinaria

Co: cobalto

Cr: cromo

Cat: Catalasa

Cu⁺⁺: cobre

ELAM-2: molécula de adhesión leucocitaria al endotelio

EPA: Agencia de Protección de Medio Ambiente

ROS: especies reactivas del oxígeno

F: fluor

Fe⁺⁺: hierro

G6PDH: Glucosa-6 fosfato deshidrogenada

Ge: germanio

Gpx: Glutación peroxidasa

GR: Glutación reductasa

GSH: Glutación reducido

ABREVIATURAS

GSSG: Glutación oxidado
GST: glutación sulfihidril transferasa
H₂O₂: Peróxido de hidrógeno
Hg: mercurio
I: iodo
ICP-MS: Espectrometría de masas inducido
IgA: inmunoglobulina A
IgM: inmunoglobulina M
IL-1 β : interleuquina 1 beta
IL-2: Interleuquina 2
IL-6: Interleuquina 6
IMC: índice de masa corporal
K⁺: potasio
LDH: lactato deshidrogenasa
Li: litio
Lpx: lipoperoxidación
MDA: Malonaldehido
Mg⁺⁺: magnesio
mg: miligramos.
min: minutos
ml: mililitros
mm: milímetro
MMP: metaloproteínas de la matriz
Mn⁺⁺: manganeso
Mo: molibdeno
MPO: Mieloperoxidasa
N: Newton
Na⁺: sodio
Ni: níquel
NPs: Nano partículas
n.s.: no significativo
FPs: Partículas de tamaño fino

O₂: oxígeno
ONOO⁻: Peroxinitrito
O₂⁻: Anión superóxido
·OH: Radical hidroxilo
OMS: Organización Mundial de la Salud
Pb: plomo
PMN: polimorfonucleado
PSA: Antígeno prostático
Rb: rubidio
Redox: reacción de reducción-oxidación
RL: radicales libres
RLO: radicales libres de oxígeno
ROS: Especie reactiva de oxígeno
rpm: revoluciones por minuto
S: azufre
Se: selenio
Si: silice
Sn: estaño
SOD: Superóxido Dismutasa
Sr: estroncio
Sustrato OPD: Ortofenilendiaminofosfato
Ti: titanio
TiO₂: dióxido de titanio
TNF-α: Factor de Necrosis Tumoral Alfa
UE: Unión Europea
USA: Estados Unidos de América
V: vanadio
Zn⁺⁺: zinc
μm: micra

RESUMEN

El presente estudio ha sido diseñado para comparar los niveles de una serie de metales pesados (Al, Sb, As, Ba, Be, Bi, Cd, Pb, Hg, Pt, Tl, Th, U, Ni, Ag, Sn, Ti) y/o de oligoelementos (Ca^{++} , Mg^{++} , Na^+ , K^+ , Cu^{++} , Zn^{++} , Mn^{++} , Cr, V, Mo, B, I, Li, P, Se, Sr, S, Fe^{++} , Ge, Rb), en los pacientes portadores de implantes de titanio y de amalgamas dentales (A+I, media: 15 años en boca, n=34) frente a sus respectivos niveles detectados en aquellos portadores únicamente de amalgamas dentales (A, n=27) y también en controles sanos (sin amalgamas y sin implantes, n=13). Dichos metales pesados/oligoelementos han sido medidos en pelo por espectrometría de masas (ICP-MS) y expresados como $\mu\text{g/g}$ de pelo (media del grupo en cuestión + error estándar de la media: S.E.M. del inglés).

Por otra parte, hemos analizado los niveles sistémicos de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β y MCP-1) por la técnica de ELISA y los niveles de Glutación (GSH; forma reducida) y de malonaldehído sistémico (MDA: índice de peroxidación lipídica) por técnicas colorimétricas, al ser considerados marcadores de estrés oxidativo.

Los datos indican bajos niveles de selenio (Se) junto a los reducidos ratios de Se/Ag como de Se/Hg evidenciados en los pacientes con implantes de titanio y amalgamas dentales (A+I), frente a portadores únicamente de amalgamas dentales (A). Además, los pacientes con implantes y amalgamas mostraban diferencias significativas relativas a los niveles de magnesio (Mg^{++}), sodio (Na^+) y potasio (K^+). Dado que los niveles de glutación reducido (GSH) disminuyen y aumentan significativamente tanto los de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , MCP-1) como los de Malonaldehído (MDA) sistémicos en pacientes con implantes de titanio y amalgamas frente a sus portadores de amalgamas dentales, sugerimos que el grupo (A+I) es más susceptible a la inflamación y al estrés oxidativo.

Como además sus niveles de plata (Ag) en (A+I) aumentan significativamente en comparación al grupo únicamente con amalgamas dentales, sugerimos que la plata podría migrar a órganos distales. Los niveles de níquel (Ni) y el oligoelemento cobalto (Co) también aumentan significativamente en el grupo

(A+I), lo que podría incrementar los niveles de citoquinas proinflamatorias indicadas frente a los portadores de amalgamas dentales (A).

Por otra parte, los niveles de los demás metales procedentes de las amalgamas dentales (Hg, Sn, Zn^{++} , Cu^{++}) y de las aleaciones de los implantes de titanio (Ti-6Al-4V) no difieren significativamente entre el grupo (A+I) en relación al grupo con amalgamas (A). En su conjunto, nuestros hallazgos indican que los bajos ratios tanto de Se/Ag y Se/Hg evidenciados en los pacientes con implantes dentales de titanio y amalgamas dentales (A+I) podrían predisponerles a un mayor estrés metabólico e incluso conducir a ciertos déficits de oligoelementos. De hecho, el grupo (A+I) tiene niveles significativamente más bajos de litio (Li) y de rubidio (Rb) que sus respectivos portadores de amalgamas dentales (A). Además, evidencian cambios significativos en los niveles de oligoelementos como magnesio (Mg^{++}), sodio (Na^{+}) y potasio (K^{+}). También detectamos correlaciones significativas entre los niveles de selenio, plata o mercurio con sus respectivos ratios (Se/Ag, Se/Hg) en el grupo (A+I). Sin embargo, no es posible establecer una relación causa-efecto directa entre el aumento de los niveles de plata (Ag) y la deficiencia de selenio (Se) detectada en aquellos con implantes de titanio y amalgamas dentales.

Finalmente, los niveles de Bario (Ba) aumentan significativamente en aquellos pacientes con implantes de titanio y amalgamas dentales (A+I) frente a sus respectivos portadores de amalgamas dentales (A). Los niveles de otros metales pesados y oligoelementos analizados también en el presente estudio no difieren significativamente entre el grupo (A+I) y el grupo con amalgamas dentales (A).

ABSTRACT

The present study have been designed to whether levels of a plethora of heavy metals and/or oligoelements could differ among patients who have long-term dental titanium implants and amalgams (n=34), and those with long-term dental amalgams only (n=27) and controls (n=13, without long-term titanium implants and dental amalgams), respectively. These dental biomaterials are present in their mouth during at least 10 years (average: 15 years). We have compared a plethora of heavy metals and/or among these experimental groups by Inductible Couple Mass Spectrometry (ICP-MS) in hair's samples and all results were expressed as $\mu\text{g/g}$ of hair [metals: Al, Sb, As, Ba, Be, Bi, Cd, Pb, Hg, Pt, Tl, Th, U, Ni, Ag, Sn, Ti; oligoelements (Ca^{++} , Mg^{++} , Na^+ , K^+ , Cu^{++} , Zn^{++} , Mn^{++} , Cr, V, Mo, B, I, Li, P, Se, Sr, S, Fe^{++} , Ge, Rb)]. In addition, we have compared their systemic IL-1 β and MCP-1 proinflammatory cytokine levels by ELISA. We also determined the serum levels of Glutathione (reduced form: GSH) and Malonaldehyde (MDA) levels by colorimetric assays among these experimental groups. These biomarkers are mediators of oxidative stress and inflammation, respectively.

We have detected low selenium levels as well as reduced Se/Ag and decreased Se/Hg ratios among patients with long-term dental implants and amalgams (A+I) as compare to patients with long-term dental amalgams only (A); In addition, they (A+I) have significant changes on magnesium (Mg^{++}), sodium (Na^+) and potassium (K^+) levels. These Glutathione levels (GSH: reduced form) were lower in patients with long-term dental titanium implants and amalgams (A+I) and they have higher their systemic MDA (Malonaldehyde) and proinflammatory IL-1 β and MCP-1 (Macrophage Colony Protein-1) levels than patients with long-term dental amalgams only (A). These features suggest they (A+I group) are more susceptible to inflammation and oxidative stress than patients with amalgams only (A).

As higher Silver (Ag) levels were found among patients with long-term titanium implants and amalgams (A+I) as compare to patients with amalgams only

(A), we suggest that silver could migrate to distal organs. In addition, other heavy metal such as nickel (Ni) together the oligoelements cobalt (Co) were higher among patients with (A+I), which could rise proinflammatory cytokine levels as compare to those with long-term dental amalgams only (A).

However, other metals detected from dental amalgams (Hg, Sn, Zn⁺⁺, Cu⁺⁺) or implant alloys (Ti-6Al-4V) did not significantly differed among (A+I) vs (A) groups. Collectively, our finding suggest that lower Se/Ag and Se/Hg ratios found among patients who have long-term titanium implants and dental amalgam could predispose them to oxidative stress. In fact, they have (A+I) group lower lithium (Li) and rubidium (Rb) levels than patients with long-term dental amalgams only (A). In addition, they (A+I) have changes on magnesium (Mg⁺⁺), sodium (Na⁺) and potassium (K⁺) levels. We also detected correlations among selenium, silver or mercury levels and their ratios (Se/Ag and Se/Hg) in (A+I) group. However, the causal relationship was not established between exposure to silver (Ag) and low detected selenium (Ag) levels in patients with long-term dental implants and amalgams.

Levels of barium (Ba) were higher among patients with long-term dental titanium implants and amalgams (A+I) than reached values by patients with long-term dental amalgams only (A). Finally, several heavy metals and oligoelements analyzed in the present study did not significantly differed among experimental groups.



ÍNDICE

ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN 3
1.1 METALES Y ALEACIONES DE USO ODONTOLÓGICO 3
1.2 OXIDACIÓN Y CORROSIÓN GALVÁNICA DE LOS METALES 6
1.3 ELEMENTO QUIMICO. METALES Y OLIGOELEMENTOS 8
1.3.1 Oligoelementos 10
1.3.2 Metabolismo de los Oligoelementos 12
1.3.3 Función biológica y modo de acción de los oligoelementos 14
1.3.3.1. Función estabilizadora 15
1.3.3.2. Función estructural de los tejidos 15
1.3.3.3. Función hormonal 15
1.3.3.4. Cofactor enzimático 16
1.3.3.5. Regulación genética 17
1.4 METALES ODONTOLÓGICOS 17
1.4.1 Amalgamas Dentales 18
1.4.1.1 Mercurio (Hg): absorción, acumulación y eliminación 19
1.4.1.1.2 Mercurio en el ámbito odontológico 21
1.4.1.2 Plata (Ag): absorción, distribución y acumulación 24
1.4.1.3 Estaño (Sn) 26
1.4.1.4 Cobre (Cu ⁺⁺): absorción, distribución y acumulación 27
1.4.1.5 Zinc (Zn ⁺⁺): absorción, distribución y acumulación 28
1.4.2 Implantes Dentales 31
1.4.2.1 Titanio (TiO ₂) 32
1.4.2.2 Implantes de aleación de titanio (Ti-6Al-4V) 35
1.4.2.3 Aluminio (Al) 36
1.4.2.4 Vanadio (V) 37
1.4.2.5 Molibdeno (Mo) 38
1.4.3 Metales asociados a Prótesis Dental (Cr, Ni, Co) 39
1.4.3.1 Níquel (Ni) 40
1.4.3.2 Cromo (Cr) 41
1.4.3.3 Cobalto (Co) 42



1.5 OLIGOELEMENTOS CON FUNCIONES METABÓLICAS 42
1.5.1 Selenio (Se) 42
1.5.2 Estroncio (Sr) 46
1.5.3 Azufre (S) 46
1.5.4 Calcio (Ca ⁺⁺) 47
1.5.5 Boro (B) 48
1.5.6 Manganeso (Mn ⁺⁺) 48
1.5.6 Hierro (Fe ⁺⁺) 49
1.5.7 Germanio (Ge) 51
1.5.8 Iodo (I) 51
1.5.9 Fósforo (P) 52
1.5.10 Litio (Li) 53
1.5.11 Rubidio (Rb) 54
1.5.12 Sodio (Na ⁺) 54
1.5.13 Potasio (K ⁺) 54
1.5.14 Magnesio (Mg ⁺⁺) 55
1.6 METALES DE EXPOSICIÓN AMBIENTAL: (Pb), (Cd) y (Ba) 57
1.6.1 Bario (Ba) 58
1.7 ENFERMEDADES PERIIMPLANTARIAS 60
1.7.1 Mucositis 60
1.7.2 Periimplantitis 60
1.7.3 Factores de riesgo para la aparición de periimplantitis 61
1.7.4 Respuesta inflamatoria mediadas por bacterias 65
1.7.4.1 Barreras externas (piel y mucosas) 65
1.7.4.2 Respuesta inespecífica contra microorganismos 65
1.7.4.3 Respuesta inmunitaria antígeno-específica 67
1.8 RADICALES LIBRES 67
1.8.1 Radicales Libres: repercusión en el organismo 70
1.9 ESTRÉS OXIDATIVO: Sistemas antioxidantes endógenos/exógeno 73
1.9.1 Mecanismos generales de detoxificación	
endógena a metales pesados 77
1.10 EFECTOS DE LA INFLAMACIÓN Y DE LA FORMACIÓN DE	



LIOPERÓXIDOS EN PACIENTE CON IMPLANTES DENTALES 80
1.11 MUESTRA DE PELO 83
1.11.1 Mineralograma 86
2 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS 91
2.1 JUSTIFICACIÓN 91
2.2 OBJETIVOS 92
3 MATERIALES Y MÉTODOS 97
3.1 MATERIALES 97
3.1.1 Tamaño muestral 97
3.1.2 Valoración de la muestra 99
3.1.2.1 Historia clínica 100
3.1.2.2 Valoración dentaria 100
3.1.2.3 Valoración periodontal 100
3.1.2.4 Valoración clínica periodontal y periimplantaria 101
3.1.2.5 Estudio radiográfico 101
3.1.3 Criterio de Inclusión 103
3.1.3.1 Criterios de inclusión para grupo (A+I) 103
3.1.3.2 Criterio de inclusión para grupo (A) 103
3.1.3.3 Criterios de inclusión para el grupo control 104
3.1.3.4 Criterios de inclusión comunes para los tres grupos	... 104
3.1.4 Criterios de exclusión para los tres grupos 104
3.2 METODOS 105
3.2.1 Técnica de TBARS (peroxidación lipídica: MDA) 107
3.2.2 Determinación de los niveles de Glutación reducido (GSH)	... 108
3.2.3 Técnica de Bradford para la cuantificación de proteínas	... 108
3.2.4 Técnica de ELISA para la detección de IL-1 β y MCP-1	... 109
3.2.4.1 Anticuerpos para IL-1 β o MCP-1 (LETI kit) 113
3.2.5 Análisis Estadístico 114



4 RESULTADOS 117
4.1 Niveles de Glutación reducido (GSH) 117
4.2 TBARS: incremento de los niveles de Malonaldehido (MDA) como índice de peroxidación lipídica en grupo (A+I) 118
4.3 Aumento significativo de IL-1 β y MCP-1 en grupo (A+I) frente a grupo (A) 119
4.4 Cambios sobre los niveles de metales pesados en grupo (A+I) 120
4.5 Selenio 124
4.6 Relación entre niveles de plata y selenio en grupo (A+I) 125
4.7 Metales con implicaciones metabólicas 128
4.7.1 Calcio (Ca ⁺⁺) 129
4.7.2 Azufre (S) 130
4.7.3 Boro (B) 131
4.7.4 Estroncio (Sr) 132
4.8 Metales y oligoelementos implicados en funciones psicológicas 133
4.8.1 Litio (Li) 133
4.8.2 Rubidio (Rb) 134
4.8.3 Sodio (Na ⁺) 135
4.8.4 Magnesio (Mg ⁺⁺) 135
4.8.5 Potasio (K ⁺) 135
4.9 Metales de exposición ambiental 137
4.9.1 Bario (Ba) 137
4.9.2 Plomo (Pb) y Cadmio (Cd) 138
5 DISCUSIÓN 143
6 CONCLUSIONES 159
7 BIBLIOGRAFÍA 163
8 ANEXOS 197

8.1 Declaración de Helsinki 197
8.2 Figuras 207
8.3 Tablas 209
8.4 Glosario 211
8.5 Publicaciones Relacionadas 213



INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

1.1 METALES Y ALEACIONES DE USO ODONTOLÓGICO

Los metales y aleaciones son habitualmente utilizados en odontología en una gran variedad de aplicaciones como la fabricación de prótesis removible, prótesis fija, en ortodoncia, en implantología y en restauraciones directas de los dientes como las amalgamas dentales o restauraciones indirectas como las incrustaciones (Craig, 1998). Los más comúnmente usados son: oro, níquel, cobalto, cromo, aluminio, titanio, hierro, paladio, platino, plata, osmio, cobre, cinc, indio, berilio, estaño, cobre y zirconio (Nacional Institute of Dental Research, 1984) .

La mayoría de los metales provienen de los minerales. Un mineral es un material que se halla en forma natural y del cual pueden extraerse uno o más metales para su utilización (Raimond y Williams, 2003).

Los elementos metálicos se pueden combinar entre sí y con otros elementos para formar compuestos, disoluciones o mezclas. Una mezcla de dos o más metales o de un metal y ciertos elementos no metálicos como el carbono, se denomina aleación (Anusavice, 1998; Craig, 1998). Las aleaciones de mercurio con otros elementos metálicos son conocidas como amalgamas (Phillips RW., 1973).

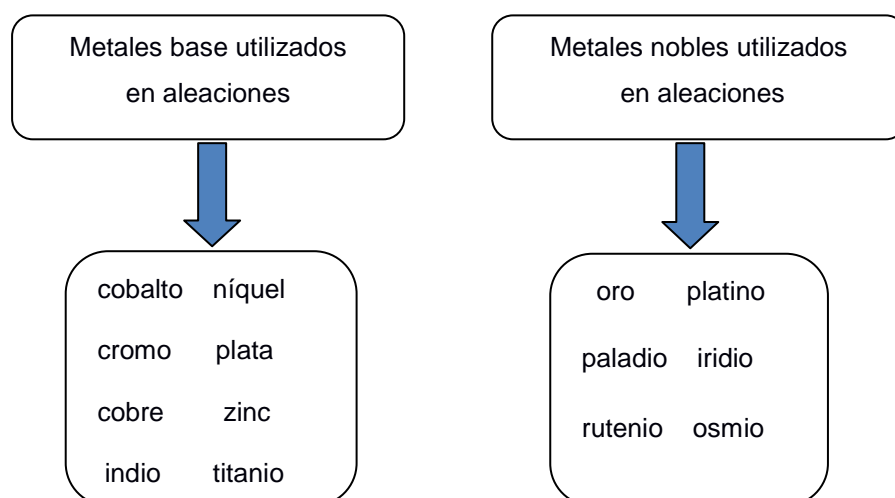
El conocimiento de las propiedades físicas y químicas de los metales y aleaciones que se utilizan en odontología es una necesidad para los profesionales. La selección de una aleación metálica dependerá de su comportamiento mecánico, electroquímico, biológico y de aplicación o función clínica. Cada aleación metálica tiene propiedades diferentes como resistencia, dureza, módulo elástico, tamaño del grano, corrosión, coeficiente de expansión térmica, óxido y color (Macchi, 2002).

Estas propiedades dependen de la cantidad y composición de cada componente en la aleación final y es un factor importante en su comportamiento físico, químico y biomecánico (Wataha, 2000a). Varias de las aleaciones que se utilizan en odontología contienen al menos tres metales y una gran mayoría se componen de hasta cinco o más de ellos en su composición.

Desde principios del 1800 se han utilizado distintos materiales para la fabricación de restauraciones dentales con el fin de reponer el tejido dentario perdido y mejorar la función masticatoria. Antiguamente se elegían aleaciones nobles (oro-platino, oro-paladio) para la confección de incrustaciones y bases de coronas de porcelana, por sus mejores propiedades mecánicas (en comparación con las aleaciones muy nobles) (Macchi, 2002).

Más de un 95% de las prótesis colocadas en Estados Unidos contenían un 75% de su peso en oro y el otro 25% eran otros metales nobles. A comienzo de los años setenta el precio del oro subió y aumentó el interés por desarrollar otras aleaciones de metal base (Marzonk, 1991), con el objeto de reducir el precio de las restauraciones dentales coladas y de los aparatos/materiales usados en odontología (Matasa, 1996).

Figura 1: Metales base y nobles utilizados en aleaciones en Odontología.



Las aleaciones de metal base están compuestas de metales no preciosos (Anthony y cols., 1991). Dichas aleaciones son también llamadas como aleaciones alternativas (Bezzon y cols., 1998).

Dentro de las aleaciones de metal base existen 3 categorías: níquel-cromo, cromo-cobalto y titanio (Wataha, 2000b). A estas aleaciones se les adicionan otros elementos para mejorar sus propiedades físicas y químicas, como boro, carbono, cobre, cerio, galio, silicio, estaño, manganeso, titanio, zirconio, hierro, niobio (Council on Dental Materials, 1985). Las aleaciones más comúnmente usadas para la confección de prótesis parcial removible y estructuras de prótesis son: Ni-Cr-Co y Cr-Co (Nielsen y Tuccillo, 1966; NaBadalung y cols., 1998; Ohkubo y cols., 2000) por su alta solidez, resistencia a la corrosión y bajo costo.

Las aleaciones de metal base tienen conductividad térmica menor que las aleaciones de metales nobles, aunque no hay diferencia significativa en la incidencia del frío y el calor en el paciente (Moffa y cols., 1984).

Las aleaciones de cromo-cobalto son las más usadas en la actualidad como base de coronas metal-cerámica, aditamentos de implantes dentales, estructuras de prótesis híbridas y barras de fijación a implantes dentales. Ello, se debe a su baja densidad (Nielsen y Tuccillo, 1966), bajo costo, alto módulo de elasticidad (rigidez) y resistencia a la rotura (Preston y Berger, 1977). Por el contrario su dureza y rigidez dificulta su manipulación y confección, si bien, en la actualidad el método CAD-CAM ha mejorado la manipulación, pasividad y ajuste.

La selección y utilidad de una aleación deben estar basada en propiedades química, física, corrosión y biocompatibilidad (Oruc y Tulunoglu, 2000), como también en apreciaciones económicas, además debe guardar relación con el objetivo clínico deseado (Bertolotti, 1984; Morris, 1987).

Según la Asociación Dental Americana (ADA), los metales utilizados en odontología se clasifican: en aleaciones altamente nobles, con 60% o más de su

contenido en algún metal noble como oro, platino o paladio entre otros, y titanio o aleaciones de titanio con un contenido igual o mayor del 85% de este metal; aleaciones nobles con una proporción igual o mayor al 25% de metales nobles y aleaciones con predominio de materiales base en el que el metal noble está presente en menos del 25%.

De acuerdo a lo anteriormente mencionado, no es difícil encontrar en los tratamientos odontológicos multidisciplinarios, el uso combinado de aleaciones metálicas en forma de prótesis estomatológicas (puentes, coronas, implantes, etc.), obturaciones de amalgamas dentales (aleación de Hg, Ag, Sn, Cu^{++} , Zn^{++}), aleaciones presentes en el tratamiento de ortodoncia, que conducen a todo ese material inmerso en el medio bucal, a un potencial riesgo de corrosión como viene descrito en la literatura (Barret y cols., 1993; Lim y cols., 2003).

Además, las propiedades iónicas, térmicas, microbiológicas y enzimáticas presentes en el medio oral, actuando juntas, podrían desencadenar una degradación de los metales que componen la aleación y en consecuencia se debería de admitir que el paciente estaría sujeto a sufrir algún grado de exposición a los productos de corrosión de estas aleaciones (Mikulewicz y Chojnacka, 2011).

1.2 OXIDACIÓN Y CORROSIÓN GALVÁNICA DE LOS METALES

Cuando se utilizan materiales metálicos no solamente se deben tener en cuenta sus propiedades físicas y mecánicas en boca, sino también su posible reactividad con el medio en el que van a actuar. Los metales pueden sufrir un daño químico o electroquímico; un daño químico es la oxidación que sufre un metal en un medio que contiene oxígeno. La oxidación es la pérdida de electrones y depende de la facilidad con que el átomo metálico puede perder electrones (Macchi, 2002).

Metales alcalinos como el sodio, el potasio, el calcio se oxidan con facilidad. No así los metales nobles como el oro y los del grupo de platino (platino, paladio, iridio, rodio, osmio, ruterio) que mantienen firmemente sus electrones (Peyton y Craig, 1974).

Este tipo de corrosión por oxidación, representa una combinación de mecanismos de oxidación y de solubilización. La velocidad de corrosión depende de la facilidad con que el metal pierde sus electrones y del tipo de líquido en que esté sumergido. En soluciones ácidas y pH ácido, se acelera la corrosión. Al interactuar dos metales, la producción de iones y electrones sumergidos en una solución, crea un potencial eléctrico. El metal que tiene mayor potencial de electrodo actuaría como ánodo, mientras el otro lo hace como cátodo. Así como el ánodo se corroe, el metal que actúa como cátodo puede cubrirse con productos de reacción con aniones y pigmentarse (Macchi, 2002).

La liberación de iones metálicos puede producir diferentes tipos de toxicidad y reacciones adversas al incorporarse al organismo (Case y cols., 1994; Frisken, 2002). Múltiples estudios evidencian las reacciones orgánicas al emplear aleaciones metálicas en medios agresivos como lo es la cavidad oral (Barret y cols., 1993; Hwang y cols., 2001). De hecho, factores que contribuyen a las condiciones ácidas son las bebidas carbonatadas y productos que contienen fluoruro, tales como pastas de dientes y enjuagues bucales. El fluoruro aumenta la susceptibilidad a la corrosión de algunos metales, especialmente de titanio (Golvano y cols., 2015).

Algunas aleaciones de metales no nobles pueden emplearse en el medio bucal, previamente pasada por el fenómeno de pasivación, en combinación con algunos metales como el cromo, es capaz de formar una capa de óxido pasivadora. También lo hacen el aluminio y el titanio (Macchi, 2002; Sedarat y cols., 2001).



1.3 ELEMENTO QUÍMICO: METALES Y OLIGOELEMENTOS

Un elemento químico es un tipo de materia, constituida por átomos de la misma clase, con un número determinado de protones en su núcleo. Tradicionalmente en principio se define, como aquella sustancia que no puede ser descompuesta mediante una reacción química en otras más simples.

La primera clasificación de elementos químicos fue propuesta por Antonio Lavoiser en 1789 quién propuso que los elementos se clasificaran en: metales, no metales y metaloides o metales de transición. Aunque muy práctico y todavía funcional en la tabla periódica actual, no es aceptada en profundidad, debido a que presenta varias diferencias en las propiedades físicas y químicas.

Los elementos se encuentran clasificados en la que se denomina “Tabla Periódica”, que es una forma ordenada siguiendo diversos criterios que distribuye los elementos químicos conforme a ciertas características como, su peso atómico, estableciendo más de 118 elementos conocidos.

Por otra parte, algunos elementos se han encontrado en la naturaleza, formando parte de sustancias simples o compuestos químicos. Otros han sido creados artificialmente en los aceleradores de partículas o en reactores atómicos, son inestables y sólo existen durante milésimas de segundo.

Dmitri Mendeléyev publicó en 1869, la primera versión de la Tabla Periódica que fue ampliamente reconocida, que viene siendo desde entonces ampliada y mejorada con el descubrimiento o síntesis de elementos nuevos y el desarrollo de nuevos modelos teóricos para explicar el comportamiento químico. De hecho, el ordenamiento en la tabla periódica, los elementos de un grupo poseen configuraciones electrónicas similares y la misma valencia, entendida como el número de electrones en la última capa.

Dado que las propiedades químicas dependen profundamente de las

interacciones de los electrones que están ubicados en los niveles más externos, los elementos de un mismo grupo tienen propiedades químicas similares y muestran una tendencia clara en sus propiedades al aumentar el número atómico.

La Tabla Periódica moderna, es la que se presenta vigente en la actualidad, en la cual, además existen otras versiones de acuerdo a diferentes propiedades y según el uso que se le quiera dar para su comprensión didáctica (en geología, medicina, etc). A continuación se detallan los elementos conocidos, ordenados por su número atómico.

Figura 2: Tabla periódica de Mendeléyev

Tabla periódica de los elementos ^B																			
Grupo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
Bloque	s		d										p						
↓ Período	*El helio pertenece al bloque s																		
1	1 H																	2 He	
2	3 Li	4 Be											5 B	6 C	7 N	8 O	9 F	10 Ne	
3	11 Na	12 Mg											13 Al	14 Si	15 P	16 S	17 Cl	18 Ar	
4	19 K	20 Ca	21 Sc	22 Ti	23 V	24 Cr	25 Mn	26 Fe	27 Co	28 Ni	29 Cu	30 Zn	31 Ga	32 Ge	33 As	34 Se	35 Br	36 Kr	
5	37 Rb	38 Sr	39 Y	40 Zr	41 Nb	42 Mo	43 Tc	44 Ru	45 Rh	46 Pd	47 Ag	48 Cd	49 In	50 Sn	51 Sb	52 Te	53 I	54 Xe	
6	55 Cs	56 Ba	57-71 *	72 Hf	73 Ta	74 W	75 Re	76 Os	77 Ir	78 Pt	79 Au	80 Hg	81 Tl	82 Pb	83 Bi	84 Po	85 At	86 Rn	
7	87 Fr	88 Ra	89-103 **	104 Rf	105 Db	106 Sg	107 Bh	108 Hs	109 Mt	110 Ds	111 Rg	112 Cn	113 Nh	114 Fl	115 Mc	116 Lv	117 Ts	118 Og	
	Bloque		f										d						
	* Lantánidos		57 La	58 Ce	59 Pr	60 Nd	61 Pm	62 Sm	63 Eu	64 Gd	65 Tb	66 Dy	67 Ho	68 Er	69 Tm	70 Yb	71 Lu		
	** Actínidos		89 Ac	90 Th	91 Pa	92 U	93 Np	94 Pu	95 Am	96 Cm	97 Bk	98 Cf	99 Es	100 Fm	101 Md	102 No	103 Lr		

Estado de agregación de la materia a 0°C y 1 atm (Según el color del número atómico)					
1	<- Número atómico	Rojo	Azul	Negro	Gris
H	<- Símbolo químico	Gaseoso	Líquido	Sólido	Desconocido

Categorías (según el color de fondo)								
Metales					No metales			
Alcalinos	Alcalino-térreos	Lantánidos	Metales de transición	Otros metales	Metaloides	Otros no metales	Halógenos	Gases nobles
		Actínidos						



1.3.1 Oligoelementos

El término oligoelemento proviene del griego - *oligos* - (pequeño, poca cantidad) y - *elemento* - (cuerpo simple que no permite dividir en otro más simple). Se considera oligoelemento o elemento traza cuando su concentración es menor de 0,01% del peso total humano.

Desde un punto de vista biológico, los elementos químicos pueden clasificarse como: nutrientes, tóxicos y contaminantes.

Las características del elemento para ser considerado *Nutriente Esencial* son:

- Estar presente en todo organismo sano
- Estar en concentración relativamente constante entre las especies
- Su exclusión provoca alguna anomalía biológica que se corrige con su aporte.

Los oligoelementos esenciales son requeridos para el mantenimiento de la salud, su déficit o aumento, puede causar la muerte o una grave disfunción. Están presentes en una concentración más o menos constante en el cuerpo.

Son esenciales porque un aporte insuficiente provoca una disminución de la función del organismo. El restablecimiento de los niveles, hace desaparecer la disfunción. Desde 1989 por ejemplo se considera el cobalto (Co) como oligoelemento esencial (Marco, 2003).

Por otro lado, todavía en la actualidad tenemos oligoelementos esenciales que no se conocen en profundidad, pero son calificados como esenciales debido a que la experimentación ha demostrado que si hay una carencia total de estos oligoelementos podría producir alteraciones metabólicas graves. A su vez, estos elementos de la Tabla Periódica pueden ser divididos en Macro y Micronutrientes (Bertello, 2015).

- **Macronutrientes:** se encuentran en cantidades elevadas siendo suficientemente estudiados y bien conocida su actividad y metabolismo, ellos son: hidrógeno (H), carbono (C), nitrógeno (N), oxígeno (O), sodio (Na^+), potasio (K^+), magnesio (Mg^{++}), calcio (Ca^{++}), fósforo (P), azufre (S), cloro (Cl), zinc (Zn^{++}).
- **Micronutrientes:** los restantes solo dos son del grupo principal: el selenio (Se) y el yodo (I), el resto son metales de transición: manganeso (Mn^{++}), cobre (Cu^{++}), cobalto (Co), níquel (Ni), molibdeno (Mo). La función de estos elementos se están dilucidando con rapidez, en base a datos sobre su distribución, concentración, defecto o exceso en el organismo. Otro grupo llamado "Beneficioso" cuyas carencias producen falencias orgánicas como: cromo (Cr), rubidio (Ru), vanadio (V), silicio (Si), estaño (Sn), flúor (F), bromo (Br). Estudios sucesivos han puesto de manifiesto la existencia de estos elementos, pero están limitados por técnicas analíticas y otros siguen en la lista como próximos candidatos de estudio.

Los elementos considerados no esenciales son oligoelementos que están presentes en el organismo, pero se cree que de forma provisional, en tránsito o contaminantes, que han sido hallados en tejidos, en muy baja concentración, no tienen una función probada o determinada, por tanto, se desconoce.

Todos los oligoelementos en función de su concentración pueden curar o ser tóxicos según la concentración. Su déficit producirá patologías difícilmente soportables, pero nunca llevarán a la muerte si no son los esenciales. Un efecto tóxico se define como un efecto adverso para la salud.

Por otra parte, así como los oligoelementos esenciales son indispensables para la vida como el zinc, hierro, iodo, cobre, cromo, selenio, molibdeno, algunos elementos esenciales como el selenio, dependiendo de su concentración, pueden presentarse como beneficiosos o tóxicos. Son indispensables para el buen metabolismo celular y para todos los fenómenos fisiológicos, aunque tal vez algún

día, algunos oligoelementos no esenciales, puedan ser oligoelementos esenciales. No por ser esenciales, son siempre buenos, depende como siempre, de la cantidad. Como refleja la frase de Paracelso “*Nada es veneno, todo es veneno, la diferencia está en la dosis*”.

Sin embargo, el sentido de toxicidad actualmente excede los límites de la toxicología clásica, debido al hallazgo de acciones crónicas a dosis muy inferiores a las admitidas clásicamente, y que dan origen a fenómenos de genotoxicidad, teratotoxicidad, neurotoxicidad, y más recientemente han aparecido los efectos debidos al tamaño de las partículas, dando origen a la nanotoxicología.

La nanotoxicología estudia la toxicidad y los efectos potenciales sobre el medio ambiente y la salud humana de las partículas con tamaño nanométrico.

En la actualidad, existe una gran relevancia por desarrollar nuevas terapias para combatir los microorganismos patógenos, por ejemplo, con nanomateriales con propiedades microbicidas. Sin embargo, los científicos reconocen que las partículas al ser tan pequeñas (1 a 100 nanómetro) no es fácil realizar estudios pormenorizados y mucho menos prever cómo se comportaran en el tiempo (Savery y cols., 2017; Jiang y cols., 2017).

Mientras que la propagación de las nanopartículas (NPs) fue muy rápida, la investigación sobre sus efectos en el organismo, apenas se conoce.

1.3.2 Metabolismo de los oligoelementos

El metabolismo de los oligoelementos consta de 4 fases:

- A. Absorción:** La absorción de los oligoelementos se realiza en el intestino, se fijan a moléculas de transporte como son las vitaminas, proteínas, aminoácidos, etc.

Después de la absorción son vehiculizados por la sangre, posteriormente son almacenados en diferentes órganos y eliminados a través de orina, bilis, sudor. El paso de los oligoelementos por el tubo digestivo al interior se realiza de varias formas:

- **Transporte pasivo:** se trata del paso a través de la mucosa sin necesidad de energía. Algunos oligoelementos tienen un lugar de paso a través de la mucosa (específico a hierro a nivel del duodeno).
- **Transporte activo:** cuando el oligoelemento tiene la necesidad de fijarse a una proteína y necesita de energía para conseguir el paso.

El buen estado del sistema digestivo es necesario para permitir el paso de los oligoelementos a través de la mucosa, cualquier alteración fisiológica podría perturbar dicho paso.

Los oligoelementos están presentes en los alimentos en forma de sales minerales o de complejos orgánicos (vitaminas, proteínas, aminoácidos). En el estómago se produce una hidrólisis ácida que disocia el metal de su componente, se vuelve soluble y asimilable. Recién hidrolizado, la absorción se realiza en el intestino delgado.

B. Transporte sanguíneo: una vez en el torrente sanguíneo, el oligoelemento se fija a proteínas de transporte, aminoácidos, vitaminas, albuminas y otras proteínas de transporte específico.

C. Distribución: a través del torrente sanguíneo se distribuye por el organismo; esta distribución no es igual en todo el organismo. Los oligoelementos se encuentran en concentraciones variables según órganos, tejidos y función.

Ejemplo: el yodo se acumula en la tiroides. El hierro se acumula en el hígado, bazo y médula ósea. El zinc se acumula en los ojos, piel, leucocitos, eritrocitos, hay tres veces más en los ojos que en eritrocitos.

A nivel celular tenemos la misma disparidad. El hierro se acumula en las



mitocondrias peroxisomas. El cobre y manganeso en las mitocondrias y el zinc se acumula en el citosol.

Se disponen en complejos moleculares de almacenamiento: la ferritina y hemosiderina para el hierro. La albumina y macroglobulina α^2 para el zinc. La ceruloplasmina para el cobre. La globulinas α^2 y β , y ciertas lipoproteínas para selenio. En este almacenamiento hay un número complejo que tiene actividad enzimática, por ejemplo, el zinc, al que se le conocen más de 300 enzimas específicas, es necesario junto al cobre para la actividad enzimática de la enzima detoxificante SOD-1 (Superóxido-Dismutasa 1).

D. Homeostasis: los oligoelementos representan en el organismo un modelo homeostático. Hay un fenómeno de absorción y de eliminación de los oligoelementos a través de: la piel, el sudor (cromo, cobre, zinc, selenio), los riñones: orina (cromo, cobre, selenio, molibdeno), la bilis (cobre, hierro, manganeso, vanadio, zinc, estaño, níquel). La homeostasis, está asegurada por una regulación, es decir por la absorción intestinal y la eliminación a través de los emuntorios. Hay una influencia hormonal, lo que explica que para los oligoelementos hay ciclos nictemerales en la homeostasis.

1.3.3 Función biológica y modo de acción de los oligoelementos

Los oligoelementos tienen cuatro funciones mayores:

- 1- **Función estabilizadora**
- 2- **Función estructural de los tejidos**
- 3- **Función hormonal**
- 4- **Cofactor enzimático**
- 5- **Regulación genética**

1.3.3.1 Función estabilizadora

Estabilizan las estructuras de las metaloproteínas complejas. Ejemplo: el hierro que contiene el grupo hemo estabiliza la hemoglobina, es un elemento estabilizante. Para estabilizar la vitamina B12, tenemos el cobalto.

Las metaloproteínas presentan dos subgrupos:

- ***Metaloproteínas, no enzimáticas:*** Se desconoce un valor enzimático, pero sirven para el transporte y el almacenamiento. (transcobalamina – transferrina – ferritina- hemosiderina. El cobre y zinc son transportados por la metalotioneínas).

- ***Metaloproteínas enzimáticas:*** Son vitales, si están alteradas se produce la muerte. Según su función pueden ser:
 - Activas:* participan en la catálisis.
 - Pasivas:* son integrados en la proteína enzimática, mantiene la estructura espacial de la proteína, pero sin papel directo. En la pareja proteína enzimática: apoenzima y metal, su unión no es muy fuerte, si se une hay acción, si se separa desaparece la acción.

Poseen propiedades de complejos orgánicos: Especificidad variable (el zinc puede ser reemplazado por el cobalto). La estabilidad depende del pH.

1.3.3.2 Función estructural de los tejidos

Contribuyen a la formación de tejidos. Por ejemplo, para la formación de tejido conjuntivo necesitamos el silicio, para la estructura ósea necesitamos fósforo y estroncio.

1.3.3.3 Función hormonal

Un metal puede ser necesario para una enzima en la síntesis o catabolismo de una hormona, por ejemplo el zinc para modular la acción de la alfa reductasa.



Los oligoelementos pueden actuar de tres maneras en la función hormonal:

- *Formación de complejo intermediario:* Expresión de señales hormonales: el oligoelemento es parte integrante de la estructura y confiere a la estructura una actividad biológica especial. Difícilmente dissociable, al contrario de las metaloproteínas, tiene un papel funcional integrado en la estructura. Participación directa en la hormona (iodo en las hormonas tiroideas).
- *Papel hormonal:* el oligoelemento podrá actuar como factor de enzimas en la síntesis de moléculas hormonales. También puede actuar facilitando o inhibiendo la fijación de una hormona a su receptor, debido al reconocimiento por su receptor.
- *El metal puede participar o inhibir* los movimientos de iones debido a una hormona.

1.3.3.4 Cofactor enzimático

Hay muchas enzimas que usan los oligoelementos como cofactores. Son activadores, activan la función enzimática. Pueden presentar una función similar a las vitaminas. Dependiendo de la enzima, los oligoelementos pueden tener un papel catalítico, estructural y regulador (Marco, 2003).

Como *cofactores*, a nivel molecular y atómico, los metales tienen tres funciones:

- *Función estructural:* Las proteínas tienen una estructura primaria, secundaria, terciaria, cuaternaria. La terciaria, es fundamental para la fracción de la proteína o para la adaptación de la proteína a un órgano. El metal como cofactor induce a una estructura terciaria, pero también puede romper esta estructura.

- *Función locus catalítico*: existe como factor enzimático en la coenzima orgánica. El metal es atraído hacia el sustrato, se une íntimamente a la enzima, favorece la posición del sustrato con relación a las enzimas, y favorece una hidrólisis u otra acción enzimática.
- *Captador o dador de electrones*: participan en la reacción de oxidoreducción. Esta reacción de óxido-reducción, es el sistema REDOX de base.

1.3.3.5 Regulación genética

Durante la síntesis del ARN intervienen el zinc, magnesio, manganeso y cobalto, como también, el manganeso y el níquel intervienen en la síntesis del ácido-nucleico. A su vez un déficit de zinc puede actuar como teratógeno y genotóxico, al igual que el plomo y el cadmio antagonizan el metabolismo del zinc (Bertello, 2015). Incluso se ha descrito que el ADN de la *Escherichia coli*, contiene zinc. También, se ha demostrado que para activar la enzima ADN polimerasa que contiene zinc, se necesita magnesio o manganeso, que permiten la unión de los sustratos nucleótidos trifosfatos a la enzima.

Cada función será el origen de un trastorno particular, por ello, un déficit de oligoelementos es capaz de modificar una estructura, a su vez alterar las funciones, dará un defecto de estabilización, un defecto endocrino, un defecto enzimático. En la actualidad, el zinc está relacionado con 20.000 genes (Marco Chover, 2011).

1.4. METALES ODONTOLÓGICOS

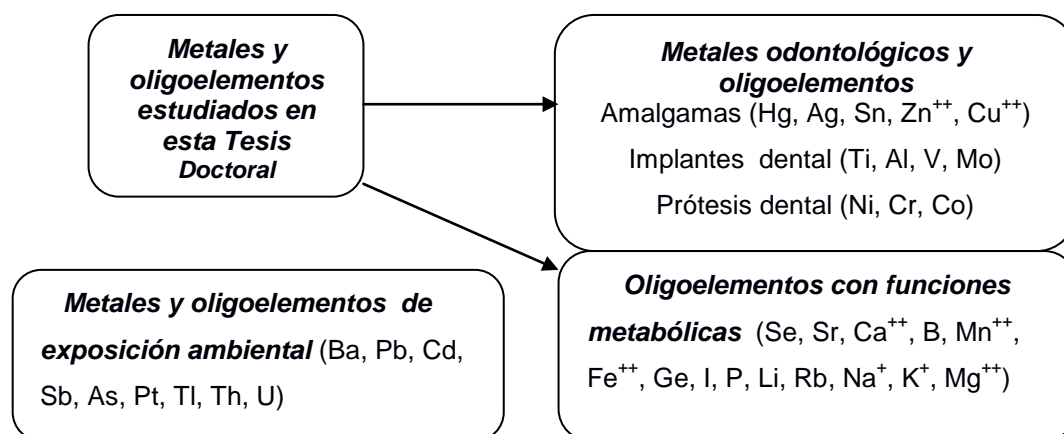
Por razones didácticas y un mejor seguimiento académico de la información, hemos dividido los metales y oligoelementos en metales odontológicos relacionados con las restauraciones de amalgamas dentales (Hg,

Ag, Sn, Zn⁺⁺, Cu⁺⁺), aquellos presentes en implantes de titanio (Ti-6Al-4V) y utilizados en prótesis dentales y dispositivos de ortodoncia (Ni, Cr, Co), aún cuando los pacientes del presente estudio no llevan dispositivos de ortodoncia. Además, hemos dividido conceptualmente los metales y oligoelementos en aquellos relacionados con funciones metabólicas (Se, Sr, Ca⁺⁺, B, Mn⁺⁺, Fe⁺⁺, Ge, I, P, Li, Rb, Na⁺, K⁺, Mg⁺⁺) como también, los metales relacionados con la exposición ambiental (Ba, Pb, Cd, Sb, As, Pt, Tl, Th, U).

Por otra parte, tomaremos en consideración, el análisis de pelo del laboratorio del Dr. DATA (USA), que presenta su propia clasificación en el Mineralograma como: *Metales Tóxicos - Elementos Esenciales y Otros*

Por ello, los metales/oligoelementos de este estudio, se agrupan en el sentido expuesto en la figura 3.

Figura 3: Metales y Oligoelementos estudiados en la presente Tesis



1.4.1 Amalgamas dentales (Hg, Ag, Sn, Zn⁺⁺, Cu⁺⁺)

La amalgama dental se ha utilizado por más de 150 años en restauraciones dentales. En la actualidad se sigue utilizando, aunque en julio del

2018 la Unión Europea prohibirá su uso en las restauraciones dentales de dentición temporal, en menores de 15 años, en mujeres embarazadas y periodos de lactancia (Convención de Minamata, Japón, 2013).

El mercurio (Hg: 50% en peso) y la plata (Ag: 41%) representan los principales constituyentes de la amalgama dental y el estaño (Sn: 8%), junto al Zn^{++} y Cu^{++} están presente en menor cantidad. A continuación, se describe brevemente las implicaciones fisiológicas que inducen los metales pesados de las amalgamas dentales y/o implantes de titanio (Ti-6Al-4V).

1.4.1.1 Mercurio (Hg): absorción, acumulación y eliminación

El mercurio constituye el componente mayoritario de las amalgamas dentales junto a la plata, y estaño, zinc, cobre, en menor proporción. El mercurio es un metal pesado y tóxico como el cadmio y el plomo. Se le considera un metal pesado, algo que sucede cuando el elemento posee una densidad relativamente alta y resulta tóxico en cierta medida para los seres humanos. El mercurio se usa en termómetros ya que su coeficiente de dilatación es prácticamente constante.

El mercurio es ubicuo en la naturaleza. El (Hg) es absorbido usualmente como metilmercurio, por algas al inicio de la cadena trófica, que son consumidas por peces y otros organismos del eslabón superior de la cadena trófica. Los peces absorben completamente el metilmercurio (lo eliminan en cantidades muy pequeñas).

El metilmercurio no se excreta al no ser soluble y se acumula fundamentalmente en el tejido adiposo de organismos superiores en la cadena trófica. De hecho, la bioacumulación de mercurio por otros predadores contribuye a la biomagnificación de los niveles de mercurio. Como ejemplo, el arenque tiene concentraciones de 0.01ppm de millón y el tiburón blanco mayores de 1ppm

(EPA). El selenio parece constituir un antídoto frente a los niveles de metales pesados (Björklund, 2015) y la liberación de Hg en pacientes constituye el principal factor asociado a las amalgamas dentales, de las que se discute su bioseguridad (Homme y cols., 2014; Mutter, 2011).

El mercurio fundamentalmente existe en tres formas: inorgánico, orgánico y elemental o metálico. El mercurio inorgánico puede ser tóxico, ya que podría causar problemas renales. La absorción del mercurio depende del tipo de la forma en que esté presente el compuesto, bien sea, orgánica o inorgánica.

A temperatura ambiente en su forma elemental es metálico (25°C), se volatiliza y libera en forma de vapor de mercurio (Jallad y cols., 2015). Éste hecho ocurre especialmente cuando se produce la retirada de las amalgamas dentales. El mercurio inorgánico muestra una menor absorción gastrointestinal (7%) en humanos, frente al 75% de la vía inhalatoria por parte del vapor de mercurio, que prácticamente no se absorbe a nivel intestinal (Jallad y cols., 2015).

Por ello, es importante controlar la liberación de vapor de mercurio por la vía inhalatoria durante la eliminación de la amalgama dental mediante un protocolo de extracción de amalgamas (Cabaña Muñoz y cols., 2015b), ya que la mayor parte del mercurio metálico (elemental) podría acceder directamente al sistema nervioso central por su carácter lipofílico y el alto porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados del cerebro (Lohren y cols., 2015). De hecho, la propiedad lipofílica le permite atravesar la membrana celular de los eritrocitos donde es oxidado de Hg^0 a Hg^{++} , sin embargo el resultante no oxidado (Hg^0) atraviesa la barrera hematoencefálica, el cual es oxidado y retenido en el cerebro (Echeverría y cols., 1998).

La principal absorción (90-95%) del mercurio ingerido es en forma de metilmercurio y se acumula sobre todo en los riñones (Park y cols., 2012). El mercurio se transporta en plasma por proteínas como la albúmina (Valko y cols., 2005).

La absorción del mercurio en su forma líquida es reducida en el tracto gastrointestinal y el vapor de mercurio es absorbido y transportado en sangre a la membrana de los alveolos pulmonares. Atraviesa la barrera hematoencefálica una vez inhalado, produciendo neurotoxicidad (Roberts y Charlton, 2009). Finalmente, el mercurio se excreta a través de las heces y de la orina (Scheuhammer, 1987).

La exposición a mercurio puede ocasionar sintomatología en humanos, pero podrían pasar años hasta que se manifiestan ciertos síntomas. Sin embargo, la exposición aguda a metil-mercurio podría producir sintomatología en pacientes como temblores (Clarkson y Magos, 2006).

El metil-mercurio podría alterar parámetros bioquímicos en sangre como las enzimas LDH (marcador de "daño") (Morcillo y cols., 2016) reduciendo los niveles de fósforo inorgánico y de proteínas séricas. Además, el metil-mercurio puede reducir la actividad de la enzima (AST), que compite con otros elementos esenciales como el zinc o el calcio, entre otros (Bhasin y cols., 2014).

1.4.1.1.2 Mercurio en el ámbito odontológico

Existe amplia controversia sobre la toxicidad del mercurio en el ámbito odontológico y toxicológico (Hommer y cols., 2014; Roberts y Charlton, 2009). Parece ser que la exposición diaria en humanos a mercurio es de $1\mu\text{g}/\text{día}$, asociado a la inhalación de vapor de mercurio y de $1\mu\text{g}/\text{día}$, asociado a la ingestión de las formas iónicas de mercurio (Olsson y Bergman, 1992; Clarkson y cols., 1988; Mackert, 1987). Además, cabe destacar que la exposición a campos electromagnéticos puede aumentar la liberación de mercurio (Hg) procedente de las amalgamas dentales (Mortazavi y Mortazavi, 2015)

En 1999, Ahlqwist y colaboradores encontraron una correlación positiva en suero entre los niveles de mercurio en sangre y el número de restauraciones de amalgamas en boca, en un cohorte de 1462 pacientes (Ahlqwist y cols., 1999).

Por otro lado, el mercurio puede provocar fallos renales, neurotoxicidad, alergias entre otros procesos patológicos en humanos (Roberts y Charlton, 2009).

Varios estudios han validado el análisis de mercurio en pelo por ICP-MS como método de detección fiable y validable, sobre todo en casos de exposición ocupacional al mercurio en humanos (Li y cols., 2008; Li y Chai, 2008, Rajaei y cols., 2015; Gul y cols., 2015).

Importancia de la determinación de mercurio en pelo mediante espectrometría de masas inducible (ICP-MS)

La determinación del mercurio en orina (U-Hg) mide la exposición aguda a mercurio inorgánico en humanos (Karimi y cols., 2015). Sin embargo, la fiabilidad del pelo como indicador de los niveles de vapor de mercurio parece ser discutible. La relación entre niveles de mercurio total en pelo (T-Hg) y de mercurio inorgánico en orina (U-Hg), y entre los niveles de mercurio inorgánico (I-Hg) y el mercurio total gaseoso en el aire ambiental parece clara.

A este respecto, los niveles de mercurio total en pelo podrían estar en rangos de 1µg/g, pero estos niveles pueden estar significativamente incrementados como consecuencia de la exposición ocupacional al mercurio en trabajadores. El mercurio inhalado constituye la fracción mayor (97.4%) en casos de exposición ocupacional al mercurio. De hecho, se ha propuesto que el mercurio inorgánico en pelo puede ser usado como una herramienta ocupacional para la determinación del vapor de mercurio.

Parece ser que la determinación del mercurio en orina (U-Hg), mide la exposición al vapor de mercurio y podría ser indicativa de una posible acumulación en riñón como de la excreción de ciertas proteínas urinarias (Barregard, 1993). De hecho, la Organización mundial de la salud indica que existe una correlación entre los niveles de mercurio en aire y en orina (Tsuji y cols., 2003).

Por otra parte, existe también correlación entre los niveles de mercurio inorgánico en pelo (I-Hg) y los de orina (U-Hg). La determinación de mercurio en pelo podría ser tan válido como la determinación de los niveles de mercurio inorgánico o de vapor de mercurio en casos de exposición ocupacional al mercurio en pacientes (Li y Chai, 2008).

Por otro lado, los niveles de mercurio en pelo están 250 a 300 veces más concentrado que en plasma (WHO, 1990). Factores ambientales como el consumo de pescado podrían interferir también con los niveles de mercurio en pelo (Morrissette y cols., 2004; Peterson y cols., 2016).

El mercurio se incorpora al folículo piloso en proporción a su contenido en sangre y una vez incorporado en pelo es estable en el tiempo (WHO, 1990). El mercaptoetanol, presente en algunos champoos elimina el 30% del mercurio en pelo por lo que se recomienda que no se lave el pelo el paciente durante la toma del mismo para la determinación de los niveles de mercurio.

Generalmente, el metil-mercurio corresponde al 80% del 98% del total presente en poblaciones consumidoras de pescado contaminado con mercurio (WHO, 1990; Dolbec y cols., 2001), que no es el caso en nuestro estudio.

La bioseguridad en la práctica odontológica disminuye el riesgo tóxico a la exposición del mercurio (Cabaña y cols., 2015b), y reduce la prevalencia de niveles de mercurio en orina relacionado con alteraciones en el comportamiento, producto de cambios moleculares en el sistema nervioso central (Echeverría y cols., 1998).

El principal depósito del mercurio inorgánico es el riñón, y se excreta por la orina y heces. Por ello, principalmente se considera el mercurio urinario (U-Hg) el originado en los riñones, como el principal biomarcador de exposición a vapor de mercurio (Geier y cols., 2011).



1.4.1.2 Plata (Ag): absorción, distribución y acumulación.

En principio no se ha demostrado su esencialidad y su concentración en suero es baja (menos de $1\mu\text{g/L}$). La plata pura tiene la mayor conductividad eléctrica y térmica de todos los metales, es dúctil y maleable.

Por sus propiedades, presenta múltiples aplicaciones. La capacidad microbicida de la plata (Ag) es conocida desde hace siglos, de hecho, existen antecedentes en la antigüedad que se utilizaba (Ag) para potabilizar el agua.

La versatilidad de la plata (Ag) la hace presente en múltiples formas: en sales de (Ag), utilizada para el tratamiento de disfunciones mentales, epilepsia, como agente antibacteriano tópico y enfermedades infecciosas, al igual, en su forma de proteínas coloidales, se presenta como complementos nutricionales en tratamiento de una gran variedad de enfermedades.

Por otra parte, la plata (Ag) metálica, se utilizó en prótesis quirúrgicas y férulas. Destaca en la industria de la joyería, fotografía, textil entre otras múltiples aplicaciones (Drake y Hazelwood, 2005).

Los estudios existentes parecen demostrar que algunas formas de plata son más tóxicas que otras, debido a sus diferencias en su comportamiento que presentan las formas solubles e insolubles en el organismo. Los compuestos de plata solubles son más fácilmente absorbidos que la plata metálica o insoluble. La absorción de plata en el cuerpo es a menudo mucho mayor cuando se toma por vía oral como medicamento (a través de la mucosa oral, garganta y tracto digestivo); en contraposición a la exposición ocupacional, que es predominantemente por inhalación (Drake y Hazelwood, 2005).

Cabe destacar, que los efectos de la exposición ocupacional a compuestos solubles fueron mayores que de plata metálica e insoluble. Resulta también, su capacidad de unirse a proteínas, ADN y ARN, debido a su rápida absorción al torrente sanguíneo y su depósito en órganos. (Armitage y cols., 1996).

Los efectos adversos a la exposición crónica a la plata, se presentan bajo una permanente coloración gris azulada llamada en la piel *argía* y en los ojos *argirosis*, que a su vez pueden ser localizada o generalizada.

Por sus características sobre patógenos, la plata prescrita por médicos, disminuyó drásticamente a medida que aumentaba el uso de antibióticos. Sin embargo la plata coloidal y las sales de plata se están promoviendo una vez más como una cura para todas las enfermedades. La Administración de Alimentos y Fármacos (FDA, por sus siglas en inglés) no tiene conocimiento de ninguna evidencia científica sustancial que apoye el uso de ingredientes coloidales de plata sin receta o sales de plata para enfermedades, debido a que contienen ingredientes coloidales o sales de plata que no se reconocen como seguros y eficaces (Federal Register, 1999) (White y cols., 2003).

La ingestión es la principal vía de entrada de compuestos de plata y proteínas coloidales de plata. Los síntomas agudos de la sobreexposición al nitrato de plata son disminución de la presión arterial, diarrea, irritación del estómago y disminución de la respiración (Marco, 2003).

Los síntomas crónicos de la ingesta prolongada de dosis bajas de sales de plata, son la degeneración grasa en hígado y riñón, como también cambios en las células sanguíneas (Venugopal y Luckey, 1975).

Aunque la plata se acumula en algunos órganos y tejidos, se dispone de muy pocos datos que indiquen posibles efectos tóxicos. Sin embargo, se sabe que iones de plata poseen una alta afinidad por el grupo tiol en el hígado, y se ha demostrado que se unen al Glutatión reducido y se transportan por bilis, agotando de esta manera la cantidad de glutatión reducido disponible para las demás vías bioquímicas. El Glutatión desempeña una función primordial en el mantenimiento de la estructura y función de los glóbulos rojos, así como en la eliminación de los peróxidos orgánicos, de ahí su interferencia en el organismo (Baldi y cols., 1988).

Por otro parte, la expansión que supone la Nanotecnología, ha desarrollado nanomateriales inorgánicos, en particular (NPs Ag), que presentan un marcado

efecto microbicida sobre una amplia variedad de microorganismos, tales como virus, bacterias (*E. coli*, *S. aureus*, *Klebsiellas*, *Pseudomonas*) y propiedades antifúngicas (Castellano y cols., 2007). De hecho, un reciente estudio ha puesto de manifiesto que microimplantes de titanio modificados con nanopartículas de plata (Ti-BP-Ag NF), exhiben excelentes propiedades antibacterianas (Venugopal y cols., 2017).

La aplicación generalizada de nanopartículas de plata (NPs Ag) y productos que contienen plata ha aumentado la preocupación de la seguridad pública por sus efectos adversos sobre la salud humana y el medio ambiente. Un reciente estudio en modelo murino concluye que las (NPs Ag) desregula la familia de las metalotioneína, lo que sugiere efecto de estrés oxidativo específico y cambios transcriptómicos que podrían potencialmente ejercer un efecto adverso en el desarrollo embrionario (Gao y cols., 2017).

En la actualidad, se implementa el uso de las (NPs Ag) sobre distintos dispositivos de uso médico. Esta estrategia se viene aplicando en materiales de uso sanitario como: catéteres, válvulas, vendas, cremas tópicas, y también en pinturas y textiles, cosméticos y como colorante autorizado en alimentos (E174). Otra estrategia, es la modificación de superficies de diferentes dispositivos para inhibir la formación del biofilm bacteriano. Sin embargo, se desconoce la exposición potencial y la toxicidad de los NPs Ag debido a la variación de las propiedades fisicoquímicas y a la falta de datos toxicológicos disponibles (Savery y cols., 2017).

Por otro parte, la plata tiene interacciones metabólicas con el cobre y el selenio, de hecho, la plata actúa sobre el cobre como un antagonista dietario y acentúa su déficit (Marco, 2003).

1.4.1.3 Estaño (Sn)

El estaño podría actuar como posible catalizador de las reacciones de

óxido-reducción y se sabe que es necesario a pequeñas cantidades para el crecimiento normal. Se absorbe poco y se elimina por heces (30%) y por la bilis (11%). El estaño inorgánico es poco tóxico y su absorción es débil, ya que no se retiene y de lo ingerido se elimina rápidamente. Por su parte, el orgánico es altamente tóxico.

Por otra parte, se sabe que altos niveles de estaño (Sn) disminuye los niveles de calcio y de la actividad de fosfatasas ácida y alcalina del hígado. La suplementación con estaño (Sn) no tiene efecto sobre la pérdida de cobre fecal; y en orina, de hierro, manganeso o magnesio.

Se ha demostrado que el estaño (Sn) suprime la absorción de hierro y la biosíntesis de porfirinas. El estaño (Sn) afecta al metabolismo del grupo hemo y también a las funciones dependientes del hemo como el citocromo P-450 (marco, 2003).

Varias patologías se asocian a altos niveles de estaño (Sn) como anemia, y degeneración ocular y hepática entre otras. El zinc (Zn^{++}) actúa como antagonista del estaño (Sn).

1.4.1.4 Cobre (Cu^{++}): absorción, distribución y acumulación.

La mayor parte del cobre (90%) se transporta en plasma unido a una proteína plasmática denominada ceruloplasmina y el 10% restante se une a la albúmina y una fracción pequeña forma complejos con aminoácidos como la Histidina o Treonina. El 2% del cobre que se transporta en plasma va unido a la SOD-1 de los eritrocitos. El cobre muestra un efecto antagónico sobre el selenio (Se). La absorción del cobre disminuye por cobalto (Co), molibdeno (Mo), vitamina C, ácido fólico, selenio, fitatos o exceso de zinc (Zn^{++}), este último compite con las mismas proteínas transportadoras a nivel intestinal.

La absorción de cobre es favorecida por los aminoácidos histidina/treonina

y se sabe que la ceruloplasmina y la albúmina facilitan su absorción desde el estómago y duodeno. En el duodeno existen células que contienen metalotioneína. La deficiencia de cobre aumenta la susceptibilidad de las células al daño oxidativo al disminuir su capacidad para producir SOD, pero un exceso de cobre (Cu^{++}) activan reacciones redox en la célula incrementando la producción de lipoperóxidos mediante reacciones de Fenton (Valko y cols., 2005).

El cobre se acumula en hígado, y se incorpora a la ferroxidasa, como también puede depositarse en riñones, médula ósea y cerebro. La eliminación de Cu se realiza a través de la bilis y se elimina por orina.

Entre otras funciones fisiológicas, el cobre facilita la absorción del hierro, favoreciendo su movilización y captación por parte de la transferrina al intervenir en el metabolismo de la hemoglobina, ya que si no hay cobre no se forma hemoglobina. El tratamiento de la hipercipremia se realiza con oligoelementos como el selenio y el molibdeno, que antagonizan la función del cobre.

Por otra parte, para normalizar sus niveles, es importante considerar los niveles de otros oligoelementos como el hierro (Fe^{++}), manganeso (Mn^{++}) o zinc (Zn^{++}), especialmente cuando se suplementa con L-aminoácidos y vitamina B6 en pacientes (Marco, 2003).

1.4.1.5 Zinc (Zn^{++}): absorción, distribución y acumulación

El zinc (Zn^{++}) es un cofactor necesario para más de 300 enzimas y hormonas y se requiere para la síntesis de ácidos nucleicos y de hormonas tiroideas. El 80% del zinc (Zn^{++}) está presente en los hematíes como metaloenzima en la anhidrasa carbónica, mientras que en plasma se asocia a la albúmina (15%) y a eritrocitos (5%).

Aproximadamente un 20-30% del zinc de la dieta se absorbe directamente

por el intestino delgado y yeyuno y se almacenan como unos 2 mg. El zinc (Zn^{++}) se acumula sobre todo en próstata, huesos (30%), riñones, retina, músculo y piel.

El 75% del zinc se encuentra en los eritrocitos y se transporta en sangre por la transferrina y la ceruloplasmina. La asimilación del zinc en el cuerpo se promueve por la vitamina C, B1, B12, B6 y por carnosina.

Sin embargo, la absorción del zinc puede ser inhibida por sustancias con capacidad quelante, como calcio, fosforo, cobre, selenio, leche, alcohol, carbonatos, fitatos, taninos, entre otros. El zinc es necesario para la síntesis de ácidos nucleicos y forma parte como cofactor de la enzima SOD-1 (Cu^{++} - Zn^{++} dependiente) (Valko y cols., 2007).

Otro aspecto reseñable es que actúa como cofactor enzimático de metaloenzimas (Kuppusamy y cols., 2005), claves como mecanismos de defensa frente a la toxicidad de metales pesados, que posteriormente se desarrollará en otros apartados de la introducción.

De hecho, mutaciones en el gen que codifica Cu^{++}/Zn^{++} SOD-1 se asocian con esclerosis múltiple amiotrófica o enfermedad de Lou Gehring (Solsona y cols., 2014).

Por otro lado, contribuye a la estabilización de las membranas biológicas acoplándose a grupos tiol y es un inductor de metalotioneínas, evitando que los grupos tiol puedan reaccionar con hierro (Fe^{++}).

Por otra parte, el zinc (Zn^{++}) puede proteger frente al aumento de PSA (Antígeno prostático) inducido por el cadmio (Cd), que puede estar presente en los fertilizantes. De hecho, el zinc promueve que las metalotioneínas se unan al cadmio (Cd).

El zinc puede actuar como cofactor en enzimas necesarias para la



formación de neurotransmisor serotonina y melatonina e indirectamente afecta al metabolismo de la dopamina (neurotransmisor) (Frick y cols. ,2015).

Se encuentra relacionado el zinc con más de 200 metaloenzimas que participan en vías metabólicas diferentes y sus niveles disminuye con la toma de cobre, que es su antagonista.

Cabe destacar también, la sobreexposición a zinc (Zn^{++}) incrementa los niveles de metalotioneinas y su descenso, aumenta la susceptibilidad al estrés oxidativo. El zinc (Zn^{++}) desempeña una función clave frente a la inducción de estrés oxidativo por metales pesados, ya que al unirse a los grupos SH-sulfidrilos (presentes en proteínas como el glutatión), los protege de su oxidación.

Sin embargo, el zinc (Zn^{++}) al ser un elemento antagónica del cobre es capaz de proteger de la oxidación inducida por metales Redox , tales como el (Fe^{++}) y el (Cu^{++}), al desplazar estos metales de la zona de unión de la célula evitando que se produzcan reacciones de Fenton, que aceleran el estrés oxidativo (Valko y cols., 2005).

Se sabe, que la acumulación de zinc en hígado y la producción de cobre y ceruloplasmina (proteína transportadora de cobre), provocan un aumento de cobre y una disminución local de zinc (Zn^{++}) en las encías, lo que produce inflamación del epitelio gingival (Luoma y cols., 1984).

Es importante considerar que el zinc compite con la absorción de selenio, manganeso, cobre y de hierro. Por tanto, si se suplementa nutricionalmente con zinc a pacientes no se recomienda sobrepasar los 150 mg diarios. De hecho el tratamiento prolongado con altas dosis de zinc podría deplecionar los niveles de cobre (Willis y cols., 2005).

En pelo, los niveles de zinc (Zn^{++}) correlacionan con los alcanzados a nivel tisular (Marco, 2003).

1.4.2 Implantes dentales

En el ámbito de la implantología dental, los implantes más utilizados en los últimos 40 años son aquellos fabricados en titanio (Brånemark y cols., 1977), y aún siguen siendo los más populares. Los implantes dentales permiten reemplazar los dientes perdidos con un alto grado de satisfacción a nivel funcional y estético.

El tratamiento con implantes mediante una rehabilitación fija maxilar o mandibular puede presentar resultados muy favorables, tanto en pacientes edéntulos totales mayores, como en pacientes adultos más jóvenes (Engfors y cols., 2004).

Varios estudios científicos, han demostrado una tasa de éxito del 90-95% de los implantes, en un período de seguimiento de 20 años. Este porcentaje de supervivencia hace que los implantes sean uno de los tratamientos más recomendados y demandados en nuestra clínica diaria (Astrand y cols., 2008; Kim y cols., 2008).

Albrektsson e Isidor (Albrektsson e Isidor, 1994), en el primer Workshop Europeo de Periodoncia, condicionaron el éxito de los implantes a largo plazo siempre que estos cumplieron los siguientes requisitos:

- El implante aislado o independiente debe ser inmóvil cuando se prueba clínicamente.
- La radiografía no debe mostrar ninguna zona radiolúcida alrededor del implante.
- La pérdida de hueso debe ser inferior a 0,2 mm después del primer año de la puesta en función del implante.
- Cada implante debe estar libre de síntomas persistentes o irreversibles como dolor, infecciones, neuropatías, parestesias o lesión del conducto mandibular.



Por otra parte, existen implantes dentales con una amplia variedad de diseños, cuyo objetivo principal común es el éxito a largo plazo de la función y la oseointegración (Daood y cols., 2011).

La reciente demanda de materiales más biocompatibles y menos tóxicos en la odontología, contribuyeron al desarrollo de nuevos materiales en la composición de implantes dentales. Un ejemplo de esto, son los implantes dentales de zirconio, es un material cerámico conocido como óxido de zirconio o zirconia.

Por otro lado, la controversia sobre la conexión muñón implante en monobloque, hacen de estos implantes un material interesante (Bredent®, Straumann®) (Gahlert y cols., 2013).

Varios estudios publicados, han demostrado que los implantes de zirconio mostraron, similares patrones de cicatrización, el mismo tiempo de recuperación para la cicatrización, como así también, el mantenimiento de la cortical ósea similar a los implantes de titanio (Gahlert y cols., 2012; Bormann y cols., 2012; Oliva y cols., 2007).

Consecuentemente además, los implantes de zirconio en combinación con restauraciones de Peek (polímero de alta densidad), es una alternativa válida en zonas edéntulas a nivel de molares (Parmigiani-Izquierdo y cols., 2017).

Sin embargo, su modulo de elasticidad elevado y la estabilidad a largo plazo, están en entredicho. Por consiguiente, los implantes de aleación de titanio, son aún los más utilizados (Albrektsson, 1998).

1.4.2.1 Titanio (TiO₂)

El titanio comercialmente puro es actualmente el material más utilizado en implantología. El titanio es un metal reactivo y cuando se expone al medio

ambiente, sufre el fenómeno de pasivación, creando una capa fina de óxido de titanio (Macchi 2002). Esta película protege al titanio haciéndolo altamente resistente a la corrosión (Yan Guo y cols., 2012).

El titanio comercialmente puro, tiene diversos grados de pureza graduadas de 1 a 4. Esta pureza, se caracteriza por el contenido de hierro, oxígeno y carbono. La mayoría de los implantes dentales se fabrican de grado 4, que incrementa su resistencia.

Por su parte, éste material presenta óptimas propiedades mecánicas, haciéndolo particularmente relevante y adecuado para aplicaciones implantológicas y ortopédicas. Entre estas propiedades se encuentran, su baja especificidad, alta resistencia y bajo módulo de elasticidad.

Las interacciones químicas y biológicas entre el titanio y el tejido óseo, están estrechamente asociadas con las propiedades de la superficie del implante (de Jonge y cols., 2008).

La composición química de la superficie es generalmente dióxido de titanio (TiO_2). El óxido de la superficie es químicamente estable y resistente a la corrosión, lo que hace que las superficies de titanio sean lo suficientemente estables en condiciones fisiológicas normales, no obstante recientemente, sus efectos adversos sobre las células vivas, han suscitado serias preocupaciones para su uso en los sectores de la salud.

El mecanismo de acción molecular y la toxicidad de nano-partículas (NPs) de TiO_2 se vienen estudiando ampliamente en los últimos años.

Varias investigaciones revelan que las propiedades fisicoquímicas, incluyendo la forma, el tamaño, las características superficiales y la estructura interna de las partículas de nano- TiO_2 , tienen diferentes grados de toxicidad (Zhang y cols., 2015).



Por otro lado, el dióxido de titanio (TiO_2) es un aditivo autorizado que se utiliza como colorante alimentario, está compuesto de partículas de tamaño nano (NPs) y partículas de tamaño fino (FPs). El TiO_2 ultrafino es ampliamente utilizado en gran número de aplicaciones, incluyendo pigmento blanco en pintura, cerámica, aditivos alimentarios, material de envasado de alimentos, protectores solares, cremas cosméticas, como también, en componentes de implantes quirúrgicos (Rollerova y cols., 2015).

Estudios recientes, sugieren que el TiO_2 de partículas finas (FPs), no puede ser absorbido por vía oral y afecta a los niveles de glucosa en plasma en modelo murino (Gu y cols., 2015).

Además, otro estudio experimental informó que la administración oral de TiO_2 (NPs), desencadena un aumento significativo en la glucosa plasmática, mientras que no hubo diferencias en la secreción plasmática de insulina (Hu y cols., 2015).

Las nano-partículas (NPs) de TiO_2 , entran fácilmente al cuerpo a través de la inhalación, atraviesan la barrera hematoencefálica y se acumulan en el cerebro, especialmente en la corteza y el hipocampo (Czajka y cols., 2015).

Algunos informes anteriores han demostrado que los materiales nano- TiO_2 (NPs) pueden inducir estrés oxidativo, citotoxicidad, genotoxicidad, inflamación y apoptosis celular en órganos y tejidos (Zhang y cols., 2015).

Por otra parte, en el campo de la implantología dental, existe una gran variedad de tratamientos de superficies de implantes, que van desde las superficies suavizadas, a las superficies rugosas. La morfología, como la rugosidad de la superficie, influyen en la proliferación y la diferenciación celular para una mejor oseointegración del implante (Bartold y cols., 2011).

Aunque varios tratamientos de superficie han proporcionado resultados prometedores, no existe un acuerdo en la literatura en cuanto a la superficie ideal (Carneiro-Campos y cols., 2010).

A continuación, describimos brevemente como afectan los metales presentes en la aleación del implante de titanio (Ti-6Al-4V), a la salud humana.

1.4.2.2 Implantes de aleación de titanio (Ti-6Al-4V)

El titanio (Ti) es poco tóxico, sin embargo potencia la toxicidad del mercurio y del plomo. Hanawa, indica que el cobalto de la aleación cromo-cobalto, el níquel de la aleación cromo-níquel y el vanadio de la aleación Ti-6Al-4V podrían liberarse (Hanawa, 2004).

Otros estudios informan, que los pequeños porcentajes de aluminio (Al) y vanadio (V) liberados de las aleaciones, pueden ser potencialmente tóxicos en el organismo (Zaffe y cols., 2003; De Moraes y cols., 2009).

Cabe destacar, que la corrosión puede limitar severamente la vida de dispositivos dentales (Olmedo y cols., 2003; Frisken y cols., 2002).

El óxido de la superficie, desempeña una función importante en el proceso de corrosión (Goldberg y cols., 2004). Aún cuando, el titanio (Ti) es un metal inerte, varios estudios indican su potencial de toxicidad como ocurre en la osteólisis de la zona periimplantaria (Danesh-Meyer, 1994), o incluso respuestas inflamatorias en macrófagos expuestos a titanio (Valles y cols, 2008).

Pese a que, existe controversia sobre la bioseguridad de la aleación de metales (Ti-6Al-4V) (Shi y cols., 2013, Sicilia y cols., 2008). Varios estudios experimentales, han evidenciado que la liberación de iones metálicos (Ti-6Al-4V), están muy por debajo de sus límites de toxicidad (de Moraes y cols., 2009).

Otros autores, evidenciaron altos niveles de titanio (Ti) en los ganglios linfáticos en modelo canino (0,01-9.0 ppm), después de 40 semanas de exposición al Ti (Lim y cols., 2003; Feng y cols., 2015).

Barret y colaboradores en 1993, demostraron ligeros aumentos de iones Ni en la solución que contiene aparato sumergido de Ni-Ti bajo condiciones ácidas (Barret y cols., 1993). También se observaron cambios del pH por la liberación de Ni en varias aplicaciones de ortodoncia (House y cols., 2008).

Otros estudios indican que la liberación de titanio (Ti) se asocia al fracaso del implante y a la inflamación local. La periimplantitis y la formación de biopelículas, determina la posible pérdida de estabilidad de los implantes y podría conducir a su migración a órganos distales. Estos complejos de metal-proteínas son reconocidos por las células inmunes y podrían provocar respuestas alérgicas en pacientes con implantes (Olmedo y cols., 2003; Martin, 2004).

1.4.2.3 Aluminio (Al)

El aluminio (Al) se absorbe en intestino y algunos autores consideran que también en estómago; se elimina a través de las heces y en menor cantidad por los riñones y vía biliar.

Cabe destacar, que el aluminio ambiental, como elemento o como parte de una sal, afecta a varias actividades enzimáticas, influye en el agotamiento del Glutathion reducido, aumenta la producción de citoquinas proinflamatorias en el cerebro y reduce la formación de neurotransmisores, de ahí, que podría contribuir al desarrollo y la progresión de la enfermedad de Alzheimer (Morris y cols., 2017).

Los niveles de aluminio pueden provenir de utensilios de cocina, vacunas, quesos procesados, etc. La absorción de aluminio (Al) en el intestino se favorece por la vitamina D. Su acumulación se produce en cerebro, pulmones, hígado, tiroides y en las arterias y se elimina por las heces, y en menor medida por la vía renal y biliar (Marco 2003; Bhasin y cols., 2014).

Por otra parte, los aminoácidos azufrados (metionina, cisteína), vitamina C, germanio y zinc actúan como antagonistas del aluminio. Además, el magnesio actúa como potente detoxificante del aluminio.

Respecto al aluminio, sus niveles de seguridad en pacientes con restauraciones dentales se desconocen. Se sugiere una posible relación entre Alzheimer y altos niveles de aluminio (Al) (Marco Chover, 2011).

1.4.2.4 Vanadio (V)

El vanadio (V), otro componente de la aleación del implante, podría depositarse también en el organismo. Su principal función es actuar como biocatalizador del metabolismo del colesterol, e inhibe la síntesis de colesterol y disminuye los niveles de fosfolípidos en sangre. Además, regula el crecimiento, al estimular el metabolismo tiroideo, activa el transporte y la conversión de la fructosa independientemente de la insulina.

Por otro lado, el vanadio (V) controla la bomba sodio-potasio celular, estimula la oxidación de la glucosa, mejora la fijación del calcio por lo que reduce la formación de caries. Además, cataboliza la oxidación de catecolaminas.

En principio, el vanadio (V) no es tóxico debido a su pobre absorción, puesto que solo el 1% se absorbe a nivel gastrointestinal. El vanadio (V) se une a la hemoglobina, transferrina y ferritina, se elimina por heces y principalmente se excreta por los riñones (Heinemann y cols., 2003). Dentro de los antagonistas de la absorción del vanadio (V) destacan el cromo (Cr) y vitamina C.

El exceso de vanadio (V) puede inhibir la síntesis de cistina y cisteína e impedir la penetración del cromo (Cr) en las mitocondrias. Además, interfiere en las funciones biológicas de los aminoácidos, péptidos, proteínas y ácidos nucleicos. Los resultados experimentales también demuestran un vínculo entre el vanadio y el estrés oxidativo en la etiología de la diabetes (Valko y cols., 2005).

La controversia con respecto al uso de una aleación de Ti-6Al-4V en

dispositivos médicos está relacionada principalmente a la toxicidad reconocida de vanadio, lo que puede causar necrosis en los cardiomiocitos, probablemente mediante la alteración de la polaridad de las membranas mitocondriales (Soares y cols., 2008).

La citotoxicidad y efectos antiproliferativos de diferentes sales de vanadio se demostró en animales de experimentación por Kordowiak (Kordowiak y cols., 2007).

Otros estudios, evidencian que la liberación de iones de aluminio y en particular de vanadio de esta aleación, puede generar problemas de salud a largo plazo, como la neuropatía periférica, la osteomalacia y la enfermedad de Alzheimer (Edwards y cols., 2012).

La contaminación por vanadio (V) es sobre todo industrial y produce manifestaciones alérgicas como dermatitis, gastrointestinales y alteraciones del sistema nervioso central (Schroeder, 1975).

Por último, el vanadio es un importante contaminante del aire procedente de la combustión de productos de combustible, agrava las enfermedades respiratorias y deteriora la función cardiovascular. Sin embargo, sus efectos sobre la respuesta inmune son contradictorios (Pinon-Zarate y cols., 2008)

1.4.2.5 Molibdeno (Mo)

El molibdeno (Mo) presenta propiedades antioxidantes. El 83% del molibdeno se absorbe en estómago y en menor proporción en intestino delgado. El cobre inhibe su absorción. El molibdeno forma parte de muchas metaloenzimas y también participa del metabolismo de óxido-reducción.

Cabe destacar, que existe una relación inversa entre niveles de molibdeno (Mo) y cáncer de esófago. El molibdeno (Mo) se requiere para activar enzimas implicadas en el metabolismo de aminoácidos azufrados (metionina, cisteína).

Además, es necesario para que la ferritina que transporta hierro, lo libere gracias a la acción del molibdeno (Mo) (Bertello, 2015).

Por otro parte, un reciente estudio sugiere como agente terapéutico multifuncional para el tratamiento integral del Alzheimer NPs de molibdeno (MoS_2) como inhibidor de la agregación de péptidos β -amiloides. De esta manera, se consigue mejorar el estrés oxidativo y disminuir la toxicidad celular, así como, bloquear la formación de canales de (Ca^{++}) inducida por las fibrillas β -amiloides en la membrana celular (Han y cols., 2017).

La absorción intestinal del cobre está inhibida por molibdeno (Mo) y a la inversa. El Mo es antagonista del cobre, aumentando su excreción. A nivel odontológico es reseñable que el molibdeno (Mo) tiene una acción preventiva sobre la caries dental y participa en el crecimiento óseo. De hecho, a nivel clínico se recomienda valorar los niveles de Mo en niños con retraso del crecimiento y en casos de anemias.

La sobreexposición al molibdeno (Mo) puede ocasionar gota, ya que éste activa la enzima xantina oxidasa que forma ácido úrico. Como antagonistas del molibdeno (Mo) destacan el cobre y el azufre.

1.4.3 Metales asociados a Prótesis Dental (Cr, Ni, Co)

A continuación, dada la orientación odontológica de la tesis se analizan metales procedentes de coronas de metal-cerámica en prótesis fija, o metales que son utilizados en prótesis híbridas, aditamentos protésicos y barras atornilladas a implantes dentales.

Las aleaciones de metales base más utilizados en odontología son Cr-Ni, que se emplean por lo general en la confección de puentes y coronas en prótesis fijas. Las de Cr-Co, suelen emplearse en las estructuras de prótesis sobre implantes, como también, en prótesis removibles o sobredentaduras (Cook y

Dalton, 1992). Uno de los aspectos importantes, es el efecto de biocompatibilidad de estas aleaciones sobre la mucosa oral. Estudios experimentales han demostrado que la aleación a base de Ni provocan una disminución significativa de la viabilidad celular, un incremento del estrés oxidativo, aumentan los niveles de citocinas inflamatorias y la toxicidad celular frente a la aleación a base de Co-Cr libre de Ni, que no provocaron respuestas adversas de estrés oxidativo, ni toxicidad celular (McGinley y cols., 2013).

Estos metales níquel (Ni), cromo (Cr) y cobalto (Co), han sido estudiados por ser de utilidad, para rehabilitar con prótesis a los pacientes con implantes dentales. Cada metal aporta una propiedad física y mecánica diferente a la aleación. Ejemplo de ello, es la aleación de Cr-Co que son apropiadas para su uso clínico debido a la combinación de su alta resistencia mecánica y a su excelente resistencia a la corrosión (en especial a temperaturas elevadas) (Burdairon, 1991).

Analizaremos cada uno de ellos para discernir su función metabólica en el organismo. Estos metales también están presentes en dispositivos de ortodoncia, sin embargo en este estudio, los pacientes con tratamiento de ortodoncia fueron excluidos.

1.4.3.1 Níquel (Ni)

Desde el punto de vista biomecánico en odontología, el níquel (Ni) se incorpora a las aleaciones de Cr-Co para mejorar la ductilidad de la aleación a expensa del Co que aporta la resistencia mecánica.

El níquel es intercambiable por el Co. Cuando el níquel (Ni) reemplaza al cobalto (Co), la resistencia, la dureza, el módulo de elasticidad y la temperatura de fusión tienden a descender, mientras la ductilidad aumenta (Phillips, 1986).

Cabe mencionar, que alguno de los elementos metálicos de la aleación pueda provocar algún tipo de sensibilidad o alergia. De los tres metales de la aleación, el níquel (Ni) es el más común que pueda provocar algún tipo de sensibilidad (tipo IV), cuya reacción se manifiesta como una dermatitis alérgica al metal (Geis-Gerstorfer y cols., 1993).

Por otro lado desde el punto de vista biológico, el níquel (Ni) participa en la función y producción de enzimas y hormonas, interfiere con la absorción de hierro, de hecho, se han descrito trastornos cardiovasculares, neurológicos y digestivos asociados a altos niveles de este metal (Ni). El incremento de níquel inorgánico conduce a una disminución transitoria de los niveles de Glutati6n (GSH) del 30-50% y a un decremento de citocromo P-450. Por ello, la administraci6n de Glutati6n reducido o cisteína, previene los efectos negativos del (Ni) (Marco Chover, 2011).

1.4.3.2 Cromo (Cr)

Desde el punto de vista odontol6gico, la funci6n del cromo (Cr) es aumentar la resistencia a la corrosi6n y pigmentaci6n. Al igual que el titanio, es uno de los pocos elementos que se pasiva con facilidad y eficacia, propiedades que conserva al incorporarse a una aleaci6n, lo que protege a ésta (aleaci6n Cr-Co) de la corrosi6n (Macchi, 2002).

Por otra parte, desde el punto de vista biol6gico, el cromo (Cr) desempeña un papel relevante en el metabolismo de los hidratos de carbono y de la acci6n de la insulina (Brownley y cols., 2015). Participa tambi6n en el metabolismo de lípidos (colesterol LDL) y de proteínas (transporte de aminoácidos).

El cromo (Cr) se elimina a trav6s de la orina y su exceso podría provocar insuficiencia renal. La eliminaci6n de este metal (Cr), es facilitada por zinc, magnesio, vanadio y vitamina C, niacina, cisteína y ácido glutámico. Por el contrario, el hierro disminuye la absorci6n de cromo (Cr).



1.4.3.3 Cobalto (Co)

Desde el punto de vista biomecánico, el cobalto (Co) es un elemento metálico fundamental que proporciona dureza, resistencia y rigidez a la aleación en las estructuras de prótesis dentales. Generalmente el cobalto (Co) es el elemento de mayor porcentaje de la aleación (60%), le sigue el Cr (30%) y más elementos presentes en pequeñas cantidades como el Mo, Fe⁺⁺, Be, y otros (Macchi, 2002).

Por otro lado, desde el punto de vista biológico, es un oligoelemento necesario para la actividad y función de la vitamina B-12. Debe ser ingerido por la dieta, puesto que el organismo no lo sintetiza y se requiere para el funcionamiento y mantenimiento de los glóbulos rojos (Hernández, 2012).

Participa en la síntesis de ADN, potencia la actividad de la glándula tiroides, es vasodilatador y mejora la función psicológica. Se absorbe en el intestino y entre otras funciones regula la actividad del sistema nervioso simpático y parasimpático. Es un oligoelemento poco tóxico, que necesita dosis muy altas 7 mg/Kg/día, para producir toxicidad (Watts, 1995).

1.5 OLIGOELEMENTOS RELACIONES CON FUNCIONES METABÓLICAS

Efectos del selenio sobre la quelación de metales pesados

Dada la relevancia del selenio en la presente tesis doctoral, se describen sus implicaciones fisiológicas al considerarse un antídoto que palia la toxicidad de metales pesados en toxicología y odontología.

1.5.1 Selenio (Se)

El Selenio es un mineral crucial en la síntesis de ubiquinona y ejerce



funciones como antioxidante, antiinflamatorio y anticancerígeno, puesto que potencia el sistema inmune y previene frente al cáncer. El selenio (Se) regula varias funciones metabólicas, como la función tiroidea y neutraliza la acción de los radicales libres. Para la síntesis de proteínas se requiere de la seleniometionina.

Desde un punto de vista químico su estructura es similar a la del azufre (S) y sus niveles dependen de la edad del individuo. Los niveles de selenio (Se) dependen del estado de salud y de la edad de los individuos, siendo sus niveles de referencia de 70 µg para el hombre y de 50 µg para la mujer adulta.

El selenio (Se) desempeña un papel relevante en la protección frente al peróxido de hidrogeno (H_2O_2) de las membranas biológicas. El selenio (Se) incorporado en las proteínas denominadas selenoproteínas, está implicado en la eliminación de metales pesados como mercurio y arsénico (Yoneda y cols., 1997).

Además, el selenio (Se) aumenta la relación glutatión oxidado/reducido, incrementa los niveles de glutatión reducido (GSH) y protege frente a varios inductores de estrés oxidativo en la célula como el malonadehído (MDA: lipoperóxidos lipídicos).

La absorción de selenio es favorecida por las vitaminas E, A, C, B y por los aminoácidos como la metionina, mientras que su absorción se retrasa por mercurio, cadmio, plata, cobre, plomo, zinc, azufre, arsénico, molibdeno, antimonio, vanadio, cromo y bismuto. El zinc inhibe su absorción.. El selenio (Se) mayoritariamente se absorbe en intestino y se transporta en plasma por alfa y beta globulinas y por la albúmina. Además, tiene propiedades de mimetismo insulínico (Beckett y Arthur, 2005).

Otros estudios, demostraron que el selenio (Se) protege al sistema cardiovascular del estrés oxidativo inducido por metales pesados como el arsénico, cadmio y mercurio (Flores-Mateo y cols., 2006).

Por otro lado, existe una alta relación entre depresión y la disminución de los niveles de selenio en sangre (Gosney y cols., 2008).

La intoxicación por altos niveles de selenio es revertida por la administración del aminoácido metionina. Sin embargo, unos bajos niveles de selenio en pelo, no predicen su déficit, sí indican su disminución a nivel nutricional.

El selenio (Se) es incorporado a la enzima glutatión peroxidasa (Gpx) como indicamos con anterioridad y al metabolismo de las hormonas tiroideas. Se transporta al hígado donde es transformado en dimetilseleniuro, que es eliminado por el pulmón, o bien se convierte a trimetilselenomio que se excreta mayoritariamente por orina.

La forma selenio metionina tiene una alta biodisponibilidad, tanto a nivel de sangre como actividad del glutatión reducido (GSH). La forma orgánica del selenio (Se) es la selenometionina, que es la que mejor se absorbe y la que forma selenito tiene una biodisponibilidad del 80% (Combs, 2015; Fairweather-Tait y cols., 2010).

La selenoproteína P es la proteína del transporte de selenio (Se) y es un antioxidante del endotelio vascular (Sies y Arteel, 2000). La selenoproteína P ejerce efectos antioxidantes y promueve la supervivencia neuronal (Takemoto y cols., 2010).

Por otro lado, se sabe que el déficit de selenio (Se) aumenta la oxidación en las proteínas (Moskovitz y Stadtman., 2003). Las selenometioninas están relacionadas con efectos antioxidantes y con el status redox celular. Todas las formas del selenio se metabolizan en el cuerpo en forma de selenocisteínas antes de ser incorporadas en las selenoproteínas, incluidas las enzimas que contienen selenio (Se).

El selenio (Se) actúa como coenzima de varias actividades enzimáticas como por ejemplo la Glutación peroxidasa (Gpx), que cataliza la destrucción del agua oxigenada y la degradación de lipoperóxidos (Valko y cols., 2016).

La enzima antioxidantes Gpx es una selenoproteína y también la enzima Tioredoxina reductasa, ambas contienen selenio (Se), y protegen a los macrófagos y neutrófilos de los radicales libres y frente al daño inducido al ADN. El Glutación se recicla gracias a los niveles de selenio (Se) por la enzimas Glutación peroxidasa (Gpx) y Tioredoxina reductasa (Hansen y cols., 2004).

Se ha demostrado que después de la suplementación con L-selenometionina se produce un aumento de los niveles de este oligoelemento (Se) en suero. Especialmente relevante, es la prevención frente al estrés oxidativo evidenciada en varias patologías y sobre todo frente al síndrome metabólico (Yilmaz y cols., 2007).

Las enfermedades asociadas a su déficit (Se), remiten tras el tratamiento con Vitamina E y además se ha evidenciado en áreas geográficas ricas en selenio, que existe un menor riesgo de determinados cánceres. De hecho, los varones requieren niveles de selenio (Se) más altos que las mujeres, y se ha puesto de manifiesto que la prevalencia de la mortalidad infantil se asocia a déficits de este oligoelemento (Se) y de Vitamina E en estudios clínicos norteamericanos. Además, se ha demostrado que la disminución de los niveles de selenio (Se) incrementa los niveles de moléculas inflamatorias (Demirci y cols., 2017).

Por otra parte, la suplementación de selenio (Se), previene el estrés oxidativo postprandial (Natella y cols., 2007).

Por tanto, de acuerdo a lo descrito, es importante destacar que el selenio (Se) podría utilizarse en el ámbito odontológico como un antídoto para evitar la contaminación por elevados niveles de metales pesados en el organismo (Bjørklund., 2015).



1.5.2 Estroncio (Sr)

El estroncio (Sr) posee propiedades bioquímicas y fisiológicas similares a las del calcio (con dos cargas positivas). De hecho, el estroncio (Sr) puede reemplazar al calcio en los cristales de hidroxapatita de los huesos y dientes.

El estroncio (Sr) es una de las sustancias más efectivas para el tratamiento y prevención de la osteoporosis. Es capaz de eliminar el sodio (Na^+) intracelular y de reintroducir potasio (P) al interior, como ocurre en las células cancerosas que son debilitadas por este mecanismo.

Por su parte, los pacientes libres de caries muestran elevados niveles de estroncio (Sr) y se absorbe mejor en jóvenes, depositándose en huesos y en menor medida en dientes. Su absorción es pobre en duodeno e íleon y la absorción intestinal representa del 5% al 25%. Scamschula y cols., en 1978 han puesto de manifiesto que la concentración de placas de estroncio (Sr) está inversamente correlacionada con la incidencia de caries (Schamschula y cols., 1978).

Su toxicidad es relativamente baja, pero se han descrito casos de depresión y baja retención de calcio en casos de intoxicación (Marco, 2003).

1.5.3 Azufre (S)

El azufre se encuentra en los aminoácidos azufrados (metionina, cisteína, cistina, taurina), en las proteínas y glicoproteínas azufradas, enzimas, sulfolípidos, mucopolisacáridos y hormonas. El azufre está implicado en procesos de detoxificación por actividades enzimáticas como por ejemplo la de la Citocromo P450.

El azufre inorgánico se absorbe en intestino, llega al hígado y se elimina por orina. Una parte del azufre orgánico contribuye a la formación de hormonas adeno-hipofisarias, insulina, glutatión, acetilcolina A.

El azufre se encuentra en todas las células y destaca su participación en las formas de aminoácidos azufrados. Actúa como un reductor y como constituyente esencial de coenzimas (vitamina C, ácido lipóico, glutatión). Por ejemplo, los flavonoides con función antioxidante contienen hierro y azufre en su composición.

El azufre interviene en la constitución del cartílago y del hueso, ya que fija cationes divalentes como el calcio. El azufre es necesario para prevenir frente a la citotoxicidad. Se utiliza para la detoxificación de metales pesados, gracias al aminoácido taurina. El azufre muestra interacciones positivas con vitaminas del grupo B, aminoácidos y oligoelementos como manganeso y cobre (Hernández, 2012).

1.5.4 Calcio (Ca^{++})

El 99% del calcio está presente en el tejido óseo y el 1% restante en diversos tejidos. El calcio es un oligoelemento que llega a la sangre a través de la dieta y procedente de su movilización ósea. Por tanto, es necesario mantener una adecuada ingesta para mantener los niveles de calcio (Ca) en tejido óseo y prevenir la osteoporosis, puesto que desempeña una función importante en la formación de los huesos y dientes. El 1% está en sangre, en líquido extracelular y en el tejido adiposo.

El calcio se absorbe a nivel intestinal (favorecido por la vitamina D), y por la movilización del calcio procedente de los huesos. Sólo se absorbe el 30% del calcio ingerido y su absorción se facilita por la vitamina D, mientras que se dificulta por fitatos y el exceso de folatos.

Los niveles de calcio dependen de la hormona PTH (paratohormona), de los niveles de vitamina D, y de la hormona calcitonina (Saha y cols., 2017).



1.5.5 Boro (B)

Existe una relación entre niveles de boro (B) y adrenalina, el metabolismo de lípidos, de hidratos de carbono y los niveles de insulina (Bakken y Hunt, 2003). El boro actúa como antioxidante y su suplementación nutricional previene el cáncer de próstata, la osteoporosis y la osteoartritis, incluso, mejora la función cognitiva.

La administración de boro (B) disminuye los síntomas asociados a la deficiencia de magnesio, por el contrario no mejora cuando hay déficits de calcio o fósforo. La interacción del boro (B) con el calcio, disminuye la excreción urinaria del calcio (Nielsen, 1990). Se piensa, que una disminución del boro está relacionada con caries en pacientes, pero otros estudios indican que altos niveles de boro (B) provocan caries.

Se observan altos niveles de boro (B) en el esmalte dental y en huesos. Su absorción es rápida y se almacena en tejido óseo y cerebro. La excreción renal de boro oscila entre el 30-90% y una dieta deficitaria en boro (B) conduce a una pérdida de calcio y de magnesio por la orina.

El boro (B) actúa como cofactor de algunas enzimas, aumenta la síntesis de estrógenos y es antagonista de la vitamina B-12.

La suplementación con boro (B), ha demostrado que incrementa la concentración de hormonas esteroides plasmáticas, lo que sugiere que puede ser utilizado como una sustancia ergogénica segura para atletas (Naghii, 1999).

La intoxicación por este elemento traza (B) produce déficits de vitamina B12, calcio y magnesio (Watts, 1995).

1.5.6 Manganeso (Mn⁺⁺)

El manganeso se requiere para la síntesis de las catecolaminas y de los fosfolípidos de membrana entre otros. También interviene en el metabolismo de azúcares y se requiere para la correcta producción de hormonas sexuales.

Desempeña una función relevante como cofactor de la enzima Superóxido-dismutasa-2, también de la arginasa, entre otras, que podría interactuar con el selenio (Se). El manganeso (Mn^{++}) es necesario para la formación de dopamina (neurotransmisor) y de colesterol. Se requiere para la correcta formación de huesos y de cartílagos.

Una disminución de los niveles de manganeso en diabéticos, reduce la producción de insulina y desajusta el metabolismo de la glucosa. Por ello, es recomendable a posibles alteraciones pulsátiles de la glucosa en pacientes odontológicos, debido a que la deficiencia de manganeso también puede ocasionar un déficit de selenio (Se).

El exceso de manganeso podría interferir con la absorción del hierro de la dieta y producir alteraciones neuropsiquiátricas, ya que el manganeso (Mn^{++}) también se requiere para la detoxificación de amoníaco (glutaminosintetasa) (Watts, 1995)

Dentro de los antagonistas del manganeso (Mn^{++}), destacan el cobre, hierro y magnesio mientras que el aminoácido arginina es un agonista. Un exceso de manganeso y/o zinc puede conducir a desajustes de las metaloenzimas de cobre (Marco, 2003).

1.5.6 Hierro (Fe^{++})

El 65- 70% del hierro está en la hemoglobina, un 4% en la mioglobina y el 1% en otras proteínas y enzimas. El 25-30% restante se almacena conjugado con la ferritina, que transporta el hierro. La mayoría del hierro está en los anillos de porfirina y en enzimas antioxidantes como la catalasa, citocromos y proteínas azufradas de hierro como la NADH deshidrogenasa.

Los niveles de hierro en pelo representan sus niveles en los tejidos y refleja los cambios citocromáticos. Unos elevados niveles de hierro en sangre

significan una deficiente capacidad para movilizar o excretar el hierro, o un metabolismo desequilibrado del hierro. Se sabe que sólo el 5-10% del hierro ingerido de la dieta se absorbe a través del intestino (duodeno, yeyuno).

La secreción gástrica reduce el hierro ferroso a férrico, que es absorbible. Por tanto, el ácido clorhídrico y aminoácidos como la metionina y cisteína y la vitamina C, favorecen la absorción de hierro. Dicha absorción, es bloqueada por sustancias como fosfatos, oxalatos y taninos entre otras y por minerales como calcio, zinc, magnesio, cromo, y manganeso (Schroeder, 1975)

El hierro se elimina por heces, orina y algo por el sudor. La deficiencia de hierro produce alteraciones inmunológicas y alteraciones cognitivas y endocrinológicas.

Su función principal es el transporte de la hemoglobina y mioglobina y almacén de oxígeno e interviene entre otros mecanismos en procesos de óxido-reducción.

Cuando se acumula en cerebro produce lesiones similares a las observadas en la enfermedad de Alzheimer. Su déficit se asocia a anemia y a problemas cognitivos, y también se ha asociado a dietas vegetarianas, al excesivo consumo de antiácido o de fibratos en la dieta. El hierro (Fe^{++}) está relacionado con la actividad del yodo (I), ya que en pacientes, si existe déficits de hierro con déficits de yodo, no se produce mejoría solo con la suplementación con hierro.

La contaminación con plomo disminuye los niveles de hierro, ya que se ha evidenciado en niños con déficits de hierro que existe un aumento del plomo (Pb) en sangre (Khan y cols., 2011).

Los metales antagonistas del hierro son el zinc, cadmio, cobalto, cobre, manganeso, plomo y niveles altos de fósforo, así como una relación Ca^{++}/Fe^{++} alta.

1.5.7 Germanio (Ge)

El germanio (Ge) se encuentra siempre en combinación con otros elementos. Se utiliza para la fabricación de cristales ópticos y cátodos. También actúa como antioxidante y como quelador de metales pesados. Su toxicidad es baja debido a que se elimina a las 24 horas por orina, a dosis superiores de 400 µg/día durante un tiempo prolongado puede provocar problemas renales. Su absorción es a través del intestino delgado.

Las dosis orales de germanio de sodio se absorben rápidamente y en un 99% en el tracto gastrointestinal en pocas horas y se excreta por orina en los 4 a 7 días posteriores.

Aunque se conoce muy poco sobre el metabolismo del germanio (Ge), se sabe que desempeña una función antiinflamatoria y estimuladora del sistema inmune y como mineral anti-osteoporótico (Watts, 1995).

Se estima que el germanio (Ge) es un mineral antiestrés y también previene patologías cardíacas entre otros efectos beneficiosos. Por otra parte, desempeña funciones homeostáticas al estabilizar los niveles sanguíneos de colesterol, cloro, potasio, sodio y ácido úrico. Por ello, se ha utilizado para prevenir la hipertensión arterial y se puede administrar por vía oral e intravenosa.

Sin embargo, la suplementación crónica con germanio (Ge) podría conducir a la depleción del boro (B) y está presente en rábano, cereales integrales, alfalfa, ajo, ginseng, aloe, eleuterococo entre otras plantas.

1.5.8 Iodo (I)

Se trata de un nutriente esencial en su forma de iodo inorgánico para las células del organismo, para la tiroides y para proteger frente al cáncer. El 90% del iodo se encuentra en la glándula tiroidea y se absorbe en el intestino, pero también puede absorberse a través de los pulmones y de la piel.

La absorción es disminuída por la ingesta de hierro, cobalto y arsénico. El iodo absorbido se transporta al tiroides para la síntesis de hormonas tiroideas. El 60-70% del iodo se excreta por los riñones.

Es necesario para la producción de energía, previene la gota, y participa en la síntesis de proteínas, estimula la síntesis de colesterol y disminuye el glucógeno hepático.

El iodo actúa como detoxificante, sobre todo de metales como flúor y bromo, cadmio, mercurio y plomo. El magnesio y la vitamina C mejoran la actividad del iodo (Marco, 2003).

Su déficit, se asocia a problemas de absorción y a una dieta pobre en iodo. De hecho, su déficit se asocia a enfermedad tiroidea y a déficit cognitivo entre otros efectos (Watts, 1995).

1.5.9 Fósforo (P)

El fósforo orgánico se encuentra sobre todo en tejido óseo y músculos. El inorgánico en el líquido intracelular, que se elimina a través de la orina y heces. Se absorbe un 60-70% por el intestino delgado y su absorción aumenta cuando existen bajos niveles de calcio.

Su acción metabólica es similar a la del calcio y hueso y su metabolismo está ligado al calcio, magnesio, potasio y sodio, debido a que la fijación al hueso se realiza en presencia de magnesio. Cuando existe déficit de vitamina D, se produce una disminución de los niveles de fósforo antes que la concentración de calcio.

El fósforo ejerce una acción reguladora del equilibrio P/Ca^{++} e interviene en la formación de huesos y de dientes. Es fundamental para mantener el equilibrio ácido/base a través del fluido extracelular. Forma parte de fosfoproteínas y fosfolípidos.

Regula la homeostasis del calcio entre otras funciones fisiológicas. La intoxicación con fósforo provoca hipomagnesemia e hipokalemia, mientras que el consumo excesivo de fósforo desequilibra el ratio $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ y produce hiperactividad. Unos bajos niveles de fósforo (P) en pelo, podrían también indicar una ingesta inadecuada de calcio/magnesio (Watts, 1995)

1.5.10 Litio (Li)

Se trata de un mineral alcalino parecido al sodio y al potasio. Estudios epidemiológicos indican una relación inversa entre la absorción de litio (Li) y el riesgo de enfermedades neuropsiquiátricas.

Desde un punto de vista bioquímico, la acción del litio (Li) es similar a la del sodio (Na^+), pero el litio (Li) no puede sustituirlo. Interviene en cuarenta reacciones enzimáticas en el organismo.

Se absorbe fácilmente en intestino, sin embargo presenta inconvenientes para atravesar la barrera hematoencefálica. Los huesos contienen bastante litio (Li) y la cantidad que absorbe una persona de este oligoelemento (Li) depende del porcentaje presente en el agua potable. Sin embargo, se interfiere por aluminio. Se elimina por vía renal y heces.

El litio (Li) se administra en desordenes neurosiquiátricos, tal como se ha evidenciado en pacientes con depresión bipolar, especialmente en la forma de orotato de litio (Mauer y cols., 2014), en la prevención de enfermedades cardiovasculares y en pacientes con síndrome de fatiga crónica.

Por otra parte, el litio (Li) puede desplazar al potasio y al sodio hacia el medio intracelular. El litio (Li) tiene interacciones con magnesio y calcio, al regular las concentraciones intracelulares de ambos oligoelementos. El litio (Li) disminuye los niveles de glucosa, al mostrar una acción "like insulina" y ejerce efectos antioxidantes (Schroeder, 1975).



1.5.11 Rubidio (Rb)

No se considera un oligoelemento esencial, pero desempeña una función protectora en patologías relacionadas con los radicales libres. El rubidio (Rb) tiene una relación fisicoquímica con el potasio y contribuye a neutralizar la acción tóxica a dosis muy altas del Li.

El rubidio (Rb) puede actuar como sustituto del potasio. La absorción es similar a la del potasio, se realiza rápidamente y se elimina mayoritariamente por orina.

1.5.12 Sodio (Na⁺)

Se sabe que las consecuencias del consumo excesivo de sodio (Na⁺) puede provocar hipertensión arterial, por lo que su ingesta debe ser controlada, debido a que puede provocar problemas cardiovasculares por su efecto vasoconstrictor y también aumenta la retención de líquidos.

Un exceso de sodio (Na⁺) aumenta la excreción urinaria de calcio, por lo que su consumo crónico se ha vinculado con una mayor incidencia de osteoporosis. Por otro lado, un exceso de sodio (Na⁺) en el organismo podría conducir a una sobrecarga renal (Watts, 1995).

1.5.13 Potasio (K⁺)

El potasio (K⁺) es un mineral necesario para el normal funcionamiento electrolítico del organismo. Se requiere utilizar los carbohidratos para el desarrollo muscular, controla la actividad eléctrica del corazón y su principal función es la regulación del equilibrio ácido-base.

En casos de hipopotasemia (bajos niveles de potasio) puede producir debilitamiento muscular, ritmos anormales del corazón y un ligero aumento de la presión arterial.

Contrariamente, los altos niveles de potasio (K^+) en sangre conducen a hiperpotasemia, lo que puede ocasionar ritmos cardíacos anormales y peligrosos. Los pacientes con hipopotasemia presentan fatiga muscular, debilidad y calambres musculares.

1.5.14 Magnesio (Mg^{++})

Se trata de un oligoelemento que funciona como cofactor en muchas reacciones enzimáticas, debido a que actúa en más de 300 procesos bioquímicos, incluidas aquellas implicadas en el metabolismo glucídico.

Se necesita para los procesos de detoxificación del metabolismo energético, como también favorece la detoxificación alcohólica, estabiliza el ATP, regula la temperatura y es necesario para la buena salud ósea y dentaria. Además, es necesario para una correcta función cardiovascular. Es un agente antihipertensivo.

Por otro lado, el estrés incrementa la ingesta de magnesio, previene varias patologías, especialmente disminuye el riesgo de síndrome metabólico, puesto que el estrés aumenta su pérdida a través de la orina.

El magnesio regula las funciones del ADN y ARN. Es bien estudiado que el magnesio mejora la salud de los huesos en mujeres jóvenes (Carpenter y cols., 2006), y la suplementación con magnesio se asocia a un incremento en la resistencia y calidad ósea (Ryder y cols., 2005).

Constituye un cofactor necesario para la actividad de la enzima Na^+/K^+ -ATP-asa e inhibe la salida de potasio, previniendo el aumento de calcio y de sodio intracelular. Además, preserva el zinc y regula la adecuada polarización de la membrana. La disminución de magnesio altera la transmisión nerviosa (Eisenberg, 1986).

El déficit de magnesio se relaciona con hipertensión arterial y aumento de los niveles de la citocina proinflamatoria IL-6 (Johnson y cols., 2014). Regula la

secreción de serotonina y mantiene la función de la insulina. Por otra parte, controla el ratio calcio/fósforo, al tener una acción directa sobre la hormona paratohormona y actúa como cofactor de varias enzimas implicadas en el metabolismo de la glucosa. La ingesta de magnesio mejora la resistencia a insulina y reduce el riesgo de diabetes tipo 2 (Cosaro y cols., 2014).

El magnesio también participa en la regulación del equilibrio ácido-base y en funciones de óxido-reducción, desempeña efectos antiinflamatorios y regula la temperatura, entre otras múltiples funciones.

Especialmente relevante es su función en la prevención de desequilibrios de las sales de calcio, previniendo las caries, aterosclerosis, nefrocalcinosis. De hecho, el calcio necesita magnesio para poder asimilarse en el organismo. Sólo el 1% de magnesio se encuentra en la sangre y el resto (98%) se almacena principalmente en hueso y músculos. Por ello, niveles bajos de magnesio en pelo se asocian con su déficit en la dieta, o problemas de absorción intestinal. Por su parte, altos niveles de magnesio en pelo no se relacionan con hipermagnisemia.

Se sabe que el magnesio estimula el transporte de potasio en las células y éste proceso se inhibe por el plomo. De hecho, cuando los niveles de magnesio están por debajo de su nivel normal, se observa un aumento sanguíneo del ratio Zn^{++}/Cu^{++} , un descenso del cobre, cromo y selenio, como también un aumento del plomo (Marco, 2003).

El 44% se absorbe en el intestino delgado en personas con dieta rica en magnesio y un 76% si tienen una dieta pobre en magnesio. Su absorción es retrasada por el exceso de calcio, vitamina D entre otros factores, mientras que es acelerada por la vitamina B6, fósforo, vitaminas C y E, e insulina y progesterona.

Una vez absorbido, se encuentra en plasma y hematíes. El 35% se une a las proteínas dependiendo del pH y el 15% restante está disponible en forma compleja. La mayoría del magnesio se detecta en los huesos y el 21% se elimina vía renal y heces. La ingesta de productos acidificantes aumenta la excreción de magnesio.

La hormona paratohormona provoca el aumento de las concentraciones de magnesio en suero, posiblemente al ser liberado del metabolismo óseo (acción similar a la del calcio), lo que influye por tanto en su reabsorción.

El magnesio se encuentra en forma de sales con diferentes grados de absorción; el óxido de magnesio se absorbe menos que el citrato de magnesio y cloruro de magnesio (Firoz y Graber, 2001).

La hipomagnesemia (bajos niveles de Mg^{++}) se relacionan con la depleción de fosfato, excreción excesiva, dieta inadecuada e ingesta de sodio.

Por otro lado, existe una relación directa entre el déficit de magnesio y la resistencia a insulina, por ello, los pacientes diabéticos tipo II muestran déficits de magnesio (Sundaram y cols., 2017).

Los bajos niveles de magnesio en suero se relacionan con un agotamiento energético y los pacientes hipertensos presentan niveles bajos de magnesio.

1.6 METALES/OLIGOELEMENTOS DE EXPOSICIÓN AMBIENTAL:

Plomo (Pb), Cadmio (Cd)

Se sabe que un único átomo de mercurio (Hg) o bien cadmio (Cd) puede unirse hasta a dos moléculas de GSH para facilitar su excreción (Valko y cols., 2007). Los altos niveles de plomo (Pb) y de mercurio (Hg) observados pueden ser eliminados por conjugación con glutatión reducido (GSH) y también el Pb, Hg^{++} , y Cu^{++} pueden actuar como agentes hemolíticos (Ercal y cols., 2001).

El plomo inhibe la actividad SOD-1, puesto que desplaza a los metales Zn^{++} y Cu^{++} , necesarios para su activación y aumenta la peroxidación lipídica. Por otra parte, la toxicidad del cadmio (Cd) o del plomo (Pb) se asocia a la oxidación de la hemoglobina en aves (Scheuhammer 1987). La exposición al plomo (Pb) podría interferir con la actividad de enzimas antioxidantes (Valko y cols., 2005).

Por otro lado, el metil-mercurio aumenta la peroxidación lipídica y afecta los niveles de glutatión (GSH) y de las metalotioneínas tras la exposición crónica al cadmio (Cd) (Manca y cols., 1991; Klaassen y cols., 2009). Las metalotioneínas muestran una mayor afinidad por el mercurio y el cadmio, que por el Zn^{++} . Dichas metalotioneínas son depósitos intracelulares que almacenan Cu^{++} , Zn^{++} , y son especialmente ricas en cisteína, por lo que pueden secuestrar metales pesados (Quig, 1998).

Por otra parte, también se ha descrito que neuronas corticales in vitro expuestas al cadmio (Cd) muestran bajos niveles de Glutatión y aumento de actividad SOD-1 (López y cols., 2006).

1.6.1 Bario (Ba)

El metal puro se oxida fácilmente y reacciona con agua que emite hidrógeno. Es químicamente similar al calcio, la fuente más probable de bario en la atmósfera, proviene de emisiones industriales.

Dado que normalmente está presente en forma de partículas, puede ser eliminado de la atmósfera por precipitación húmeda y deposición. De acuerdo con los estudios realizados por la National Academy of Sciences en 1977, que detectaron cantidades de bario en más del 99% de las aguas superficiales y muestras de agua potable (valores promedio de 43 $\mu\text{g/l}$ y 28,6 $\mu\text{g/l}$, respectivamente).

Las formas solubles de sales de bario se absorben rápidamente en sangre provenientes del tracto intestinal. El bario absorbido en el torrente sanguíneo desaparece en aproximadamente 24 horas. Sin embargo, se deposita en músculos, pulmones y hueso. Alrededor del 54% de la dosis de bario está unida a las proteínas. Una vez absorbido, se almacena principalmente en los huesos, como el calcio. A medida que se libera, causa síntomas en los sistemas

corporales. Entre los más importantes están el sistema cardiovascular y el sistema nervioso. Por ello, en dosis bajas, el bario actúa como un estimulante muscular, y en dosis más alta afecta el sistema nervioso que eventualmente conduce a la parálisis.

El bario activa la secreción de catecolaminas de la médula suprarrenal sin privación previa de calcio. Igualmente interfiere con el metabolismo del calcio y puede reemplazarlo en algunos sitios de unión a enzimas (Beliles, 1994).

Por otro lado, el zinc es un potente antagonista del bario y protege al cuerpo contra la toxicidad del bario. El bario es utilizado como medio de contraste para estudios de Rx del tracto digestivo. Estas pruebas radiológicas son tóxicas y deben ser evitadas, siempre que sea posible.

Los estudios sobre inhalación en humanos aun no han sido definidos. La baritosis se considera una neumoconiosis benigna caracterizada por radiopacidades intensas diseminadas por todo el pulmón, en trabajadores expuestos al mineral de barita o al sulfato de bario en el aire.

Un área de incertidumbre científica con respecto a la evaluación del riesgo no cancerígeno para el bario es la identificación más sensible de la toxicidad del bario en seres humanos, el resultado en animales de experimentación sugieren que los efectos renales pueden ser el punto final más sensible que la hipertensión, de acuerdo con el informe emitido por EPA en 1999 (Agencia de Protección Ambiental).

Otros metales de exposición ambiental menos importantes en el marco de la presente tesis doctoral son el platino (Pt), talio (Tl), torio y uranio (U). El platino (Pt) previene la formación de radicales libres expuestos a radiación. Por su parte, el uranio (U) es nefrotóxico y cancerígeno (Marco, 2003).



1.7 ENFERMEDADES PERIIMPLANTARIAS

El término enfermedades periimplantarias se refiere colectivamente a los procesos inflamatorios que tienen lugar en los tejidos que rodean a un implante dental (Zizmann y Berglundh, 2008).

Las lesiones infecciosas que con mayor frecuencia pueden presentar los tejidos que rodean los implantes dentales antes de su fracaso o pérdida (movilidad del implante), son la mucositis y la periimplantitis. Estas enfermedades periimplantarias son bien diferenciadas y generalmente una precede a la otra.

1.7.1 MUCOSITIS

La mucositis periimplantaria se define como una forma reversible de afección inflamatoria de los tejidos blandos que rodean a un implante oclusalmente funcional, sin signos de pérdida de hueso de soporte (Lang y cols., 2000).

Clínicamente, se identifica una mucositis cuando se observa un enrojecimiento e hinchazón del tejido blando alrededor de un implante junto con sangrado al sondaje y profundidad de sondaje de menos de 4 mm (Laine y cols., 2006; Renvert y cols., 2007).

Varios estudios experimentales observaron similitud en el desarrollo de las lesiones de gingivitis y mucositis periimplantarias (Pontoriero y cols., 1994; Zitzmann y cols., 2011).

1.7.2 PERIIMPLANTITIS

La periimplantitis se define como una enfermedad de origen bacteriano que combina una inflamación de la mucosa y una pérdida de hueso de soporte

(Zitzmann y Berglundh, 2008).

La lesión mucosa en la periimplantitis, se presenta asociada a menudo con supuración, aumento de la profundidad de sondaje y siempre acompañada de pérdida de soporte óseo marginal (Lindhe y Meyle, 2008; Norowski y Bumgardner, 2009).

Otros autores detallan como criterio diagnóstico de la periimplantitis la presencia de sangrado al sondaje y profundidad de sondaje mayor que 5 mm con presencia de pérdida ósea (Karoussis y cols., 2004; Ferreira y cols., 2006).

Sin embargo, las lesiones de periimplantitis cursan clínicamente semejantes a las periodontitis, pero no así histológicamente, donde las lesiones de periimplantitis cursan con un infiltrado inflamatorio mayor (apical a la bolsa) y está habitualmente en contacto con el hueso, como así también, se observa mayor número de neutrófilos y macrófagos presentes en regiones perivasculares distantes a la bolsa periimplantaria (Berglundh y cols., 2011).

1.7.3 FACTORES DE RIESGO PARA LA APARICIÓN DE PERIIMPLANTITIS

Los factores de riesgo relacionados con la periimplantitis son:

- Higiene oral deficiente. Flora bacteriana oral
- Historia previa de enfermedad periodontal
- Hábitos tóxicos (tabaco y alcohol)
- Ausencia de encía queratinizada
- Factores genéticos
- Presencia de enfermedades sistémicas (Diabetes mellitus y otras)

Entre otros factores que facilitan y exacerban el desarrollo de la periimplantitis, se encuentran una higiene oral deficiente, historia previa de



periodontitis y tabaco (Lindhe y Meyle, 2008). Otros autores, ponen de manifiesto que un deficiente control metabólico de la diabetes, consumo de alcohol, susceptibilidad genética o características de la superficie de implantes dentales, también aumenta el riesgo de periimplantitis (Norowski y Bumgardner, 2009).

En la actualidad, la tasa de éxito y supervivencia de los implantes dentales es muy elevada, cerca del 90% (Albrektsson y Donos, 2012), aunque los estudios más recientes indican una prevalencia de periimplantitis del 18,8% (Atieh y cols. 2013).

Por otro lado, además de los factores endógenos y exógenos mencionados que pueden influir o afectar en la zona periimplantaria, se debe tener en cuenta también factores locales, como presencia de encía queratinizada y tipo de aleación seleccionada para la prótesis sobre implantes.

La elección del material de la prótesis, también parece ser que puede condicionar el mayor o menor acumulo de bacterias. La terminación y pulido de superficies de distintas aleaciones metálicas utilizadas en prótesis dentales podrían provocar retención de alimentos y acúmulo de bacterias (Macchi, 2002). Además se ha demostrado que la calidad y salud del tejido periimplantario es mayor en pilares de zirconio-titanio que en aleaciones de oro o platino (Welander y cols., 2008).

Por otra parte, la acumulación y composición de flora bacteriana en la cavidad oral incidirá directamente sobre la zona periimplantaria (Lindhe y Meyle, 2008). La placa bacteriana se compone de una flora diversa. Cambios en la composición de esta flora, como el incremento de bacterias Gram negativas anaerobias (*Prevotella Intermedia*, *Porphyromonas Gingivalis*, *Fusobacterium*, *Capnocytophaga*, *Aggregibacter Actinomycetemcomitans*, entre otras), pueden provocar un avance rápido de las enfermedades periimplantarias como la mucositis y la periimplantitis.

También hay que destacar que pacientes con historia de afectación periodontal, presentan unas características de susceptibilidad genética, inmunológica y microbiológica que pueden predisponer a que padezcan también periimplantitis (Schou y cols., 2006). Las especies patógenas de la dentición natural y de los implantes dentales son esencialmente las mismas, sin embargo, puede haber ligeras diferencias en el número y especies presentes (Calzavara y cols., 2003).

Cabe destacar, en estudios clínicos, que pacientes con una enfermedad periodontal activa presentan un 25,6% de fracasos de implantes, mientras que los que no presentaban enfermedad periodontal sólo un 5,4%, en un estudio de 13 años de duración (Rosenberg y cols., 2004).

Por otro lado, en otro estudio de 10 años, observaron un 100% de éxito en pacientes sin enfermedad periodontal mientras se reduce al 83,3% en pacientes con enfermedad periodontal activa (Mengel y cols., 2007).

Otro factor endógeno a analizar es la diabetes, los pacientes geriátricos diabéticos presentan frecuentemente más pérdida dental y periodontitis, y la diabetes, es considerada como una condición de riesgo para los implantes dentales, debido a que existe una menor capacidad de cicatrización, producto de la enfermedad microvascular y de la deteriorada respuesta a la infección. Sin embargo, los pacientes que presentan un buen nivel de glucemia y están controlados no suelen presentar una mayor tasa de fracasos implantarios (Chrcarnovic y cols., 2014).

Otro factor de riesgo importante para el tratamiento implantológico en los adultos mayores lo constituye el consumo de tabaco (Strietzel y cols., 2007).

Existe suficiente evidencia entre la asociación del hábito de fumar y los fracasos implantarios. Esta relación también se manifiesta en las localizaciones intervenidas con aumento de tejido óseo. Además, el hábito de fumar incrementa



la pérdida de hueso marginal y el desarrollo de periimplantitis (Strietzel y cols., 2007).

El consumo de tabaco en los adultos mayores está relacionado con una mayor incidencia de periodontitis (expresada por el nivel de pérdida ósea marginal) y de enfermedad coronaria (Alman y cols., 2011).

La nicotina incrementa los niveles de adhesión plaquetaria, elevando el riesgo de micro-oclusión vascular e isquemia en los tejidos. Además, fumar está asociado con la liberación de catecolaminas que producen vasoconstricción y disminuyen la perfusión del tejido. Varios estudios, evidencian al tabaco como factor de riesgo de mucositis, pérdida de hueso marginal y enfermedad periimplantaria (Fransson y cols., 2008; Roos-Jansaker y cols., 2006).

Por otro lado, otro estudio a 10-15 años de seguimiento observaron un 78% de periimplantitis en los implantes dentales colocados en fumadores, mientras que en no fumadores desciende al 64% (Klokkevold y Han, 2007).

Por otra parte, la evidencia científica disponible es limitada en consumidores de alcohol como factor de riesgo en la aparición de periimplantitis, debido a la dificultad de medición en la población y complejidad en el abordaje.

Por último, las variantes genéticas son consideradas como un factor de riesgo para la periimplantitis. Polimorfismos de IL-1RN ha sido considerado como un factor de riesgo de fracaso de implantes (Laine y cols., 2006).

Las citoquinas proinflamatorias como la interleuquina 1 (IL-1) evidenciaron tener un amplio espectro de respuesta, que incluye la degradación de la matriz extracelular. La sobreproducción de ésta, ha sido implicada como un factor importante en la patogénesis y manifestación clínica de la enfermedad inflamatoria. Los polimorfismos específicos de la IL-1, han sido sugeridos como determinantes genéticos de periodontitis severas (Andreiotelli y cols., 2008).

Recientes estudios han indicado que existe un aumento significativo en los niveles de IL-1 en el fluido crevicular de pacientes con lesiones de peri-implantitis avanzadas, en comparación a aquellos con implantes sanos (Severino y cols., 2016).

1.7.4 RESPUESTA INFLAMATORIA MEDIADAS POR BACTERIAS

El organismo dispone de tres elementos defensivos ante posibles ataques bacterianos:

- Barreras externas (piel y mucosas).
- Respuesta inespecífica contra microorganismos.
- Respuesta inmunitaria antígeno-específica.

1.7.4.1 Barreras externas (piel y mucosas)

En los implantes dentales, la unión del epitelio con la superficie del implante es de tipo hemidesmosomal, al igual que la del tejido conectivo, pero la disposición de sus fibras es predominantemente longitudinal respecto a la superficie del implante y no perpendicular como ocurre en el diente natural.

Esta unión es relativamente débil de manera que si se destruye, la contaminación bacteriana se extiende al hueso de manera directa, provocando su rápida destrucción (Lindhe y cols., 1992).

1.7.4.2 Respuesta inespecífica contra microorganismos

Los procesos inflamatorios más importantes se dan en el tejido conectivo, ya que es un tejido muy irrigado y con alta capacidad de atracción de células defensivas contra los agentes externos, por toxicidad de los componentes y

enzimas bacterianas, e internos por la estimulación de la inmunidad específica e inespecífica del huésped. Cuando los factores o mecanismos defensivos biológicos no son capaces de contener dicha reacción inflamatoria, se producirá la destrucción del tejido conectivo y óseo por actividad osteoclástica.

La presencia de placa bacteriana produce una irritabilidad en los tejidos del huésped, lo que estimula a las células epiteliales para que produzcan citoquinas proinflamatorias y otros mediadores inflamatorios.

Se produce una tumefacción de los tejidos y la llegada de leucocitos, principalmente neutrófilos, que migran desde los vasos hacia el tejido conectivo y posteriormente hacia la hendidura crevicular. El aumento del infiltrado leucocitario en el tejido conectivo produce una degeneración de los fibroblastos dentro de la lesión y una destrucción del colágeno en el área infiltrada. Si persiste la invasión bacteriana, se produce también el reforzamiento de la barrera primaria del epitelio de unión, aumentando las células basales del epitelio de unión y sulcular (Seethal y cols., 2014). Los macrófagos van a tener una función muy importante en la hendidura ya que se van a encargar de fagocitar los neutrófilos muertos.

Otro de los procesos que ocurren en la defensa inespecífica es la aparición de moléculas expulsadas al medio por parte del huésped como también del agente microbiano que van a influir en el proceso inflamatorio. Así podemos encontrar proteasas y proteinasas, colagenasas, fosfatasas ácidas, fosfolipasas, fosfatasas alcalinas en la hendidura que participan en la destrucción de tejidos, e inhibidores de proteasas que sirven como moduladores de la inflamación inactivando la función de las proteasas.

También encontramos metaloproteinasas de la matriz (MMP), colagenasa neutrófila y colagenasa fibroblástica que tienen la capacidad de dividir la triple hélice de colágeno I, II y III iniciando la degradación de la matriz extracelular.

1.7.4.3 Respuesta inmunitaria antígeno-específica

Está basada en la respuesta inmunitaria humoral y celular específica. Los anticuerpos son dirigidos contra determinados microorganismos bucales. Estos anticuerpos tienen la función de opsonización de bacterias y la de unirse fuertemente a las fimbrias con lo cual previenen una futura colonización.

Cuando un antígeno de la placa penetra en el tejido conectivo atravesando el epitelio de unión, las células de Langerhans lo procesan y los alteran de forma para que sean reconocibles por el sistema inmunitario.

El péptido antigénico se une a complejo de histocompatibilidad y es reconocido por un Linfocito T helper (CD4+) liberando citoquinas que actúan llamando a otras células linfoides como son los macrófagos, linfocitos B y linfocitos T.

Esta respuesta es mucho más selectiva ante el antígeno, pero al mismo tiempo es más dañina para el organismo, produciendo mayor inflamación y reabsorción ósea que la inespecífica (Meyle y cols., 2015).

1.8 RADICALES LIBRES

Los radicales libres (RL) son moléculas que contienen oxígeno, que en su estructura atómica presentan un electrón impar en el extremo, lo cual le da una gran inestabilidad (Cheeseman y Slater, 1993; Hernández, 2012).

Son capaces de extraer electrones de las moléculas vecinas para completar su orbital, convirtiéndose en altamente reactivos y oxidantes (Simic y Taylor, 1998; Gutiérrez-Salinas y cols., 2004).



Los radicales libres se producen durante la transferencia de electrones en la cadena respiratoria de las mitocondrias, los lisosomas, los peroxisomas, así como la membrana nuclear, citoplásmica y del retículo endoplasmático.

También pueden ser generados por factores externos como contaminación ambiental, la exposición a radiaciones ionizantes (exposición solar, acción de RV), el tabaco, los medicamentos, los aditivos químicos en alimentos procesados y algunos xenobióticos ambientales como pesticidas, herbicidas y fungicidas (Finkel y Holbrook, 2000).

Aunque los radicales libres tienen una vida muy corta (una milésima de segundo), son tremendamente reactivos y la producción de radicales libres puede propagarse con extrema rapidez.

Con el fin de evitar la propagación de RL, todas las células vivas poseen un potente dispositivo enzimático. Estas enzimas, permiten la eliminación de los radicales antes de que comience su acción destructora sobre los elementos celulares, activan mecanismos de defensa antioxidantes endógenos como la activación de las enzimas Superóxido-dismutasa (SOD), la Catalasa (Cat) y la enzima Glutación Peroxidasa (Gpx).

Por otro lado, para lograr el correcto funcionamiento de estos vitales sistemas antioxidantes, es necesario asegurar el aporte de los catalizadores que las activan: Zn^{++} , Cu^{++} , Mn^{++} , Se, especialmente. El zinc, además, entre muchas actividades enzimáticas, actúa como protector de las proteínas y del Glutación.

Si bien es cierto que el oxígeno es imprescindible para los seres aerobios, éste induce la formación de los radicales libres, los cuales pueden llegar a causar diversos efectos adversos en el organismo, debido a la labilidad de la molécula. Las especies reactivas de oxígeno (ROS), pueden tener origen tanto extracelular como intracelular (Maldonado y cols., 2010).

Existen tres tipos de radicales libres:

- *Especies reactivas del oxígeno*: la mayor parte del oxígeno celular es reducido a través de reacciones enzimáticas salvo el 2-5% que escapa a la reducción quedándose en forma monovalente y de ello resulta la formación de radicales libres de oxígeno. Son moléculas altamente reactivas que atacan constantemente al organismo mediante reacciones bioquímicas de oxidación-reducción. Entre ellas encontramos al anión superóxido, el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo y los hidroperóxidos.

Una pequeña descripción de la formación de las *especies reactivas de oxígeno* sería la siguiente: la reducción univalente de O_2 produce el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) cuya fuente más importante es la NADPH oxidasa durante el estallido respiratorio. La reacción univalente subsecuente genera el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a través de la enzima Superóxido-dismutasa (SOD), que transforma el anión superóxido en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y también puede formar peroxinitritos ($ONOO^{\cdot}$). Mediante reacción de Fenton se formaría el radical hidroxilo (HO^{\cdot}), que es varias miles de veces más reactivo que el O_2 y deriva fácilmente a la formación de nuevos radicales libres.

- *Metales de transición*: Son elementos químicos cuyo átomo tiene una subcapa “d” incompleta de electrones. Poseen una gran versatilidad de estados de oxidación, debido a los numerosos huecos en los orbitales “d”. Son en general buenos catalizadores formando complejos iónicos. Pueden formar aleaciones entre ellos y son muy importantes en los procesos biológicos (Fe^{++} , Mn^{++} , Co, Ni, Cu^{++} son los más importantes).
- *Especies reactivas del nitrógeno* (óxido nítrico o dióxido nítrico), ión hipoclorito y el radical triclorometilo son otros radicales libres presentes en la naturaleza.



1.8.1 Radicales libres: Repercusión en el organismo

Los radicales libres han sido implicados en una amplia variedad de trastornos humanos y son conocidos por oxidar biomoléculas, incluyendo ADN, proteínas, lípidos y carbohidratos (Justo y Venereo, 2002).

- **ADN:** Sus alteraciones por la interacción de RL causan mutaciones, transformación celular, proliferación celular incontrolada (Jacob y cols., 2013), y roturas espontáneas en las cromátidas y pérdida de fragmentos cromosómicos, llegando incluso a la pérdida total de determinados cromosomas (Roche y cols., 1996). El ADN es un objetivo altamente susceptible al ataque de radicales libres, lo que da lugar a la oxidación de sus bases y del anillo del azúcar ribosa, produciendo la pérdida de la base y roturas de la cadena (Ames y cols., 1993). Los principales agentes involucrados en el daño directo son los radicales HO^\cdot y el H_2O_2 (De Mello Filho y Meneghini, 1985).
- **Proteínas:** Pueden producir la fragmentación de proteínas alterando su función, estructura, transporte y receptores. El ataque de los RL a proteínas puede ser difuso, dando lugar a modificaciones generalizadas, o selectivas mediante ataque a sitios específicos. A nivel general atacan en diferentes regiones de la estructura proteica y producen alteraciones estructurales, agregaciones intra o intercatenarias, fragmentación y/o desnaturalización. Un ejemplo muy frecuente es la peroxidación lipídica, formando por ejemplo Malonaldehído (MDA) (Valenzuela, 1991). Los metales de transición participan en el daño oxidativo (Stadtman y cols., 1992).

Por otro parte, los radicales libres y sobre todo el radical OH^\cdot son muy afines a los aminoácidos presentes en las proteínas, por lo que producen un daño oxidativo a nivel de los aminoácidos y entrecruzamientos de cadenas peptídicas, fragmentación de la proteína por ruptura de sus enlaces peptídicos y por último,

formación de grupos carbonilos, que impiden el normal desarrollo de sus funciones y conducen a una alta susceptibilidad a la degradación (Stadtman y cols., 1992).

Las proteínas modificadas oxidativamente son eliminadas mediante proteólisis. Sin embargo, algunas proteínas oxidadas pueden presentar una mayor resistencia a ser eliminadas, lo que contribuye a un acúmulo de proteínas oxidadas y a los efectos dañinos derivados de su mayor concentración. Se piensa que las proteínas parcialmente o poco oxidadas presentan una menor resistencia a la proteólisis que las que están muy oxidadas (Davies, 1987).

- **Lípidos:** Los radicales libres atacan a los lípidos de membrana, lo que podría alterar la permeabilidad, fluidez e integridad de las membranas celulares. Este proceso se conoce como lipoperoxidación (Lpx) o enranciamiento oxidativo y constituye un factor muy importante para el envejecimiento de células aeróbicas (Sevenian y Hochstein, 1985; Frankel, 1984).

La lipoperoxidación es un proceso vital para las membranas biológicas, ya que actúa como regenerador de sus enlaces pero su activación no controlada está relacionada con numerosas enfermedades como diabetes, fibrosis pulmonar, etc; Por tanto, debe destacarse su papel en la aparición de las enfermedades y durante su evolución (Jenkins, 1988).

La lipoperoxidación tiene tres fases: iniciación, propagación y terminación. La iniciación se produce cuando cualquier especie reactiva ataca un átomo de H del doble enlace de un grupo metileno (CH_2) de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) y genera un radical lipídico (Halliwell y cols., 1992).

En la propagación, el radical lipídico tiende a estabilizarse por reordenación molecular formando un dieno conjugado que puede sufrir varias reacciones posteriores. En condiciones aeróbicas favorables reaccionan con el O_2 formando

radicales peroxilo (ROO^\cdot). El peróxilo puede sustraer un átomo de hidrógeno de otra molécula vecina, que podría ser otro PUFA y formaría así un hidroperóxido (ROOH) y un nuevo radical libre.

Los radicales ROO^\cdot pueden reaccionar con residuos aminoacídicos de las proteínas, alterando la función de enzimas y de receptores de membrana y también podrían oxidar el colesterol de las membranas.

El grado de propagación de la cadena depende de varios factores, entre ellos la concentración de O_2 , la composición de los ácidos grasos, la relación lípido-proteína y la presencia de antioxidantes. Los hidroperóxidos (ROOH) son los productos primarios de la Lpx y en condiciones fisiológicas son relativamente estables, aunque sus grupos $^\cdot\text{OOH}$ se encuentran localizados en medio de la cadena hidrocarbonada de PUFAs y producen la distorsión del espacio hidrofóbico y por tanto, conducen a una pérdida de la función biológica de las membranas celulares (Richter, 1987).

La Lpx siguen propagándose en la fase de terminación, donde dos hidroperóxidos reaccionan entre sí formando un tetróxido, que son inestables y al romperse generan aldehídos como el MDA (Malonaldehído), un indicador de la peroxidación lipídica (Lpx) (Valenzuela, 1991).

Los productos finales de la lipoperoxidación son aldehídos, gases hidrocarbonados y varios residuos químicos, como los n-Alcanales, 2-Alquenes, incluyendo dentro de estos últimos el malondialdehído (MDA) y los 4-hidroalquenes. El MDA, formado durante las últimas etapas de la ruptura de endoperoxidos durante la reestructuración intramolecular de los ácidos grasos, puede ser metabolizado a nivel celular, por ejemplo por la aldehído deshidrogenasa hepática y está involucrado en el daño celular, ya que reacciona y modifica los residuos aminoacídicos de las proteínas (especialmente la lisina), que ataca a los grupos sulfhidrilo ($^\cdot\text{SH}$) y produce entrecruzamientos intra e intermoleculares con las proteínas (Valenzuela, 1991).

En la lipoperoxidación se producen los 4-hidroxicualquenes y en particular el 4-HNE (4-hidroxicinonal), producto de la oxidación del ácido araquidónico, que es muy reactivo, produciendo mutaciones en el DNA y daños estructurales y funcionales al reaccionar con las proteínas (Esterbauer y cols., 1991).

- **Carbohidratos:** Los RL pueden provocar una disminución del contenido de adenosín trifosfato (ATP) intracelular, alterando la vía glucolítica, inactivando la vía GADPH y disminuyendo los niveles de NAD^+ .

Los monosacáridos, en condiciones fisiológicas, se autooxidan y forman cetoaldehídos e intermediarios oxidantes como el radical O_2^- , que es captado por glucosa e impide su acción sobre otras moléculas. Son productos muy reactivos y capaces de alterar la estructura espacial de las proteínas (Wolff y Dean, 1987).

1.9 ESTRÉS OXIDATIVO: SISTEMAS ANTIOXIDANTES ENDÓGENOS-EXOGENOS

El daño o estrés oxidativo, se ha definido como la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen una ruptura del equilibrio que debe existir entre las sustancias o factores prooxidantes y los mecanismos oxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de radicales libres. Por ello, un desbalance entre la producción y la eliminación de radicales libres produciría alteraciones de la estructura-función en cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado (Justo y Venereo, 2002).

En la actualidad, numerosas investigaciones demuestran que los RL participan y desencadenan numerosos mecanismos fisiopatológicos en procesos inflamatorios crónicos (Van y cols., 2003).

Los antioxidantes al interactuar con un RL le ceden un electrón,

oxidándose a su vez y transformándose luego en un RL débil no tóxico, lo que impide que otras moléculas se oxiden. Su acción la ejercen en la membrana plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular, es decir, tanto en medios hidrofóbicos como hidrofílicos.

Los mecanismos de defensa antioxidante son:

- **Macromoléculas:** inactivan especies reactivas y así evitan su acción. Entre ellas encontramos proteínas que acumulan o transportan metales de transición como la transferrina, ceruloplasmina, o como oxígeno con la mioglobina o hemoglobina.
- **Enzimas antioxidantes:** son definidas como sustancias que son capaces, a bajas concentraciones, de unirse a sustratos oxidables e inhibir o eliminar la oxidación de dichos sustratos. Presentan gran afinidad para catalizar a altas velocidades de reacción. Entre ellas destaca la Superóxido dismutasa (SOD) que produce la dismutación del O_2 a H_2O_2 , la Glutación peroxidasa (Gpx) que reduce el peróxido hidrógeno y la Glutación Sulfhidril Transferasa (GST) y la catalasas que reduce H_2O_2 a H_2O ; Además el tocoferol (vitamina E), o el ascorbato (vitamina C) actúan como antioxidantes.
- **Cosustratos antioxidantes:** empleados por enzimas para poder reducir parcialmente a los radicales libres y especies reactivas.

a-Glutation: tripéptido con gran facilidad para ceder electrones debido a su grupo sulfhídrico (-SH) y su potencial redox. Una vez oxidado, se puede regenerar gracias a la enzima glutación reductasa (GR) que lo reduce en la oxidación de NADPH.

b-NADPH: tiene un potencial redox muy negativo y es un importante donador de electrones e hidrógenos, por lo que puede pasar a su forma $NADPH^+$ fácilmente y también utilizarse como cosustrato de otras enzimas.

- **Antioxidantes endógenos:** son moléculas nucleofílicas con gran afinidad y que se comportan como compuestos muy susceptibles de ser oxidados por RL. Ofrecen electrones a especies reactivas para que estas no dañen a macromoléculas. Un ejemplo sería el Glutati6n (GSH), NADPH, albúmina, 6cido úrico, coenzima Q, bilirrubina y melatonina.
- **Antioxidantes ex6genos:** provienen de la dieta. Son esenciales, ya que pueden prevenir la lipoperoxidaci6n o participar en reacciones enzimáticas antioxidantes, ya que por ejemplo el Zn^{++} y Cu^{++} actúan como cofactores de enzimas (Krinsky, 1992).

El Glutati6n (GSH) es ubicuo en todas las células y sus precursores aminoacídicos se adquieren de la dieta, siendo un potente antioxidante (Valko y cols., 2011).

Las vitaminas C y E interaccionan directamente con los RL y con los radicales lipídicos. El α -tocoferol es un importante antioxidante lipofílico de la vitamina E que reduce el daño oxidativo en membranas biológicas, lipoproteínas y tejidos.

El 6cido asc6rbico (vitamina C), es una querolactona, tiene la capacidad de poder sufrir r6pidamente dos procesos oxidativos monovalentes consecutivamente con la formaci6n del radical semidihidroascorbato como intermediario, radical relativamente no reactivo. Por otro lado, la vitamina C interviene en el reciclaje de la vitamina E, reduciendo el radical α -tocoper6xido y transformándolo de nuevo en α -tocoferol (Weffers y Sies, 1988).

La vitamina A y los carotenoides reaccionan con el radical peroxilo, radicales OH° y $O_2^{\circ-}$ y otras especies reactivas (Handelman, 2001). Los elementos trazas (Cu^{++} , Zn^{++} , Mn^{++} , Fe^{++} , Se) est6n presentes en las enzimas antioxidantes SOD, Cat, Gpx y actúan sinérgicamente para neutralizar el estrés oxidativo; éstas enzimas necesitar6n la disponibilidad de todos estos elementos.



Tabla 1: Estrés Oxidativo: sistemas antioxidantes y mecanismo de actuación

	Estrés Oxidativo
Sistemas antioxidantes	Actividad
SOD1	Neutraliza O ₂ transformandolo en H ₂ O ₂ Evita la degradación del NO
Catalasa	Neutraliza O ₂ y el H ₂ O ₂
GSH	Neutraliza el H ₂ O ₂ y lo transforma en agua y oxígeno molecular. Neutraliza agentes xenobióticos prooxidantes. Controla la actividad de diferentes enzimas antioxidantes.
CoQ10	Elimina los RLO producidos durante la peroxidación lipídica. Tiene acción estabilizante de membranas celulares.
Selenio	Cofactor de la GSH-Gpx que neutraliza y elimina los RLO. Neutraliza hidroperóxidos lipídicos.
Polifenoles	Inhíben la susceptibilidad de los LDL a oxidarse
GS	Principal agente de defensa celular frente a la oxidación. Regenera la Vitamina C y la A.
Metionina	Aminoácido esencial, interviene en la multiplicación y crecimiento celular. Permite la entrada de selenio en la cadena alimenticia (unido covalentemente a ella).
Taurina	Amplía la actividad antioxidante.
L-Cisteína	Elimina H ₂ O ₂ , O ₂ , HOCl, OH. Estimula la producción de GSH intracelular.
Vitamina C	Neutraliza los RLO (especialmente eficaz frente al O ₂) y Agentes pro-oxidantes. Regenera los niveles de Vitamina E.
Vitamina E	Intercepta la acción de los RLO, especialmente la Peroxidación lipídica. Protege a la Vitamina A.
Ácido Fólico	Aceptor de metilos (-CH ₃). Requiere de la Vitamina C para su funcionalidad. Interviene en la síntesis de metionina, otros aminoácidos y purinas.
Zinc	Centro activo de la SOD (Cu ⁺⁺ -Zn ⁺⁺ -SOD). Interviene en la protección y estabilidad de las membranas frente a los RLO. Colabora en la estabilización del ADN, ARN y ribosomas.
Vitamina A	Intercepta la acción de los RLO, especialmente el O ₂ .



1.9.1 Mecanismos generales de detoxificación endógena a metales pesados

Los metales pesados son compuestos ubicuamente presentes en la corteza terrestre y muchos de ellos se requieren en cantidades infinitesimales para la vida. La actividad humana ha producido un aumento de los metales en el medio terrestre. Por ejemplo, Pb, Cd, Hg⁺⁺ y Zn⁺⁺ están dentro de los 129 contaminantes registrados por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA) y del Programa de Medio Ambiente de Naciones Unidas (UNEP) (USEPA, 1997; UNEP, 2013). Algunos como el Zn⁺⁺ actúan como cofactores de la actividad enzimática detoxificante (SOD-1, Cu⁺⁺/Zn⁺⁺ dependiente o SOD-2, que es Mn⁺⁺ dependiente) (Valko y cols., 2005).

En la presente tesis se evaluó si los implantes dentales y/o amalgamas incrementa la producción de peróxidos lipídicos debido a la acumulación de metales pesados. El principal mecanismo de toxicidad inducido por metales pesados es la excesiva producción de radicales libres (Ercal y cols., 2001), que son eliminados entre otros mecanismos por la conjugación con el glutatión reducido (GSH) a través de la bilis (Jozefczak y cols., 2012; Quig, 1998).

Los niveles de selenio son necesarios para reciclar los niveles de glutatión reducido (GSH). El glutatión se recicla en la células gracias a los niveles de selenio, que actúa como cofactor necesario para la activación enzimática de la Glutatión peroxidasa (Gpx) (Stohs y Bagchi., 1995).

Por tanto, si el exceso de metales pesados no se elimina de forma adecuada, se produce una amplificación de la cascada de radicales libres, que atacan los lípidos de las membranas biológicas formando lipoperóxidos, como el malonaldehído, (MDA) que ha sido testado en el presente estudio.

Por ello, como indicamos anteriormente, es clave la acción de proteínas transportadoras de metales como ceruloplasmina (cobre) o transferrina para evitar la amplificación de la cascada tóxica de los radicales libres en la célula (Valko y



cols., 2005; Limón-Pacheco y Gonsebatt., 2009).

De hecho, actividades enzimáticas con capacidad detoxificantes como la de SOD-1 (Superóxido Dismutasa-1), o niveles adecuados tanto de Glutación (GSH: forma reducida) como de antioxidantes se requieren para prevenir la toxicidad de los metales pesados (Cabaña-Muñoz y cols., 2015a).

Las enzimas Glutación peroxidasa (Gpx), glutación reductasa (GR), Glutación-S-transferasa, SOD-1 (Superóxido Dismutasa-1), y Catalasa actúan de forma sinérgica para eliminar radicales libres bajo situaciones homeostáticas o patológicas (Valko y cols., 2005; Merino y cols., 2014).

Además, el uso de antioxidantes endógenos (vitamina C: Ácido ascórbico, E (Alpha tocoferol), ácido úrico y la bilirrubina (Limón-Pacheco y Gonsebalt, 2009) son también necesarios para promover la reparación tisular frente a daños inducidos en moléculas claves para la célula (ej. lípidos de membrana, fosfolípidos y el ADN). Consecuentemente, paliarían los efectos tóxicos asociados a la acumulación de metales pesados en la célula (Valko y cols., 2005; Limón-Pacheco y Gonsebalt, 2009).

Se sabe que la enzima glutación peroxidasa requiere del selenio (Se) como cofactor. El glutación es un tripéptido compuesto de gamma-glutamyl-L-cisteína, que desempeña una importante función como antioxidante en la célula (Gurer y Ercal., 2000). La Fig. 4 ilustra como la enzima SOD-1 ($\text{Cu}^{++}/\text{Zn}^{++}$ dependiente) elimina el anión superóxido y muestra que la eliminación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se produce por la enzima Glutacion peroxidasa (Gpx). Por su parte, la enzima Glutación reductasa (GR) es necesaria para reciclar los niveles de glutación en la célula. De hecho, el glutación reducido (GSH) se requiere para la eliminación del metal pesado por conjugación y así excretarlo del organismo (Fig. 4).

Figura 4: *Sistemas antioxidantes con capacidad detoxificante en la célula*

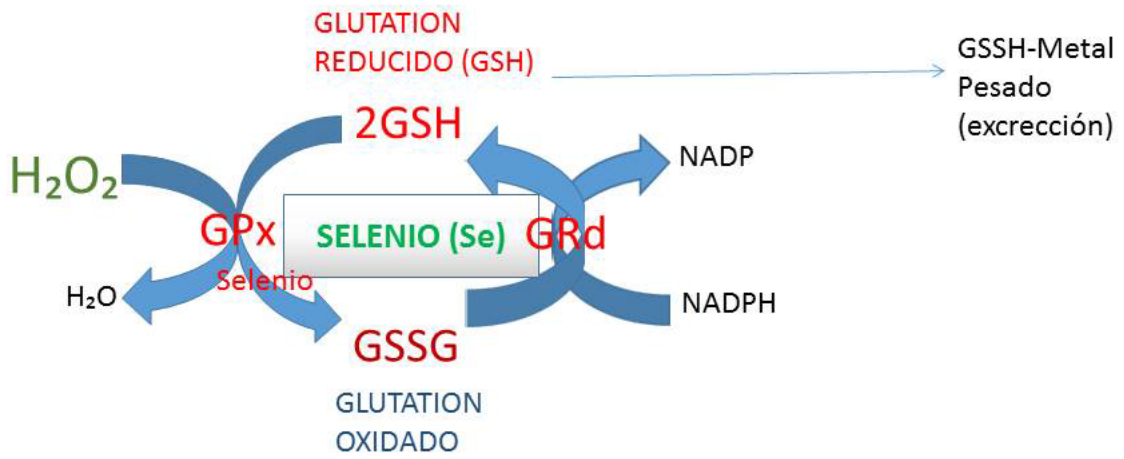
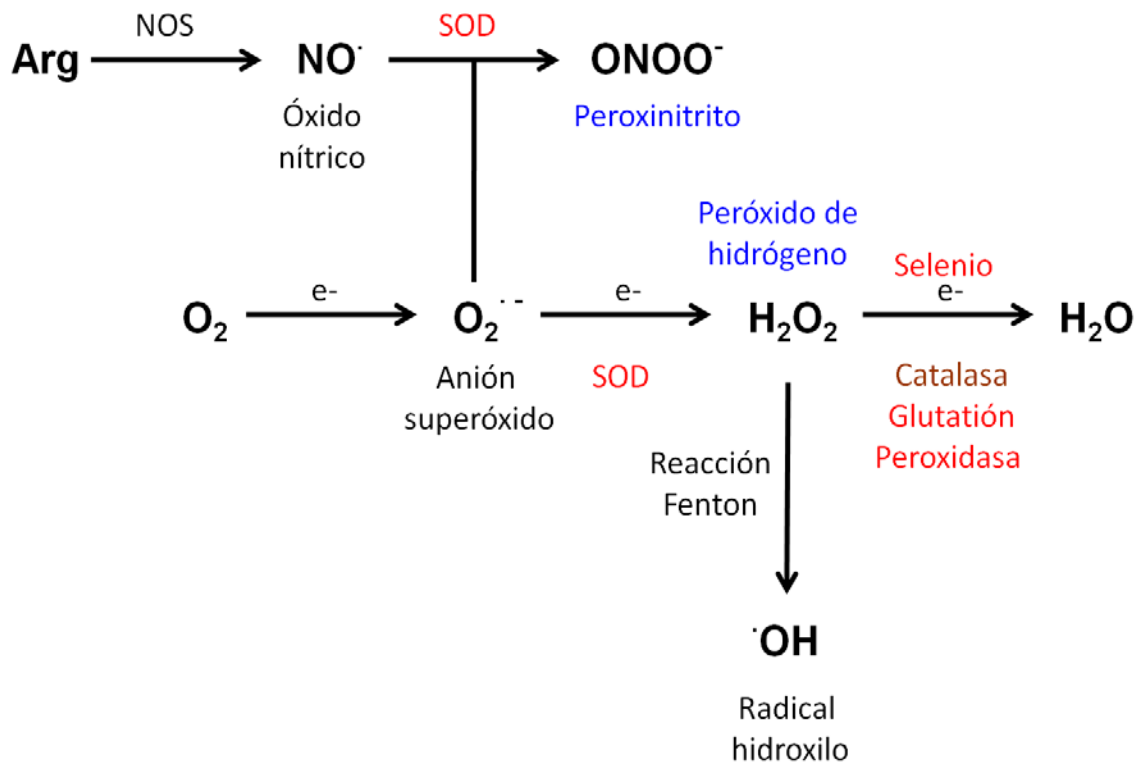


Figura 5: *Adaptado de Andersen JK. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? Natre Medicine 10 Suppl: S18-S25, 2004.*



La actividad de la enzima Cu^{++}/Zn^{++} SOD-1 es necesaria para eliminar el anión superóxido y también para la formación de peroxinitrilos. Por su parte, la enzima selenio-dependiente denominada Glutación peroxidasa (Gpx), transforma el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y oxígeno. Además, los niveles de glutación (forma reducida) deben reciclarse por la actividad Glutación peroxidasa (Gpx)/Glutación reductasa (GR), para así evitar su agotamiento. De hecho, los metales pesados se eliminan por conjugación con glutación. El antioxidante glutación es un tripéptido compuesto de glutamato, cisteína que se requiere para la excreción de metales pesados mediante conjugación con Glutación Reducido (GSH) (Jomova y Valko, 2011).

1.10 EFECTOS DE LA INFLAMACIÓN Y DE LA FORMACIÓN DE LIPOPERÓXIDOS EN PACIENTE CON IMPLANTES DENTALES

Los datos epidemiológicos y la biología molecular, apuntan hacia el hecho de que las enfermedades orales tienen efectos importantes sobre la salud general de los individuos. Cada vez más las enfermedades periimplantarias de implantes de titanio y de zirconio, se relacionan con el estrés oxidativo y la inflamación, contribuyendo sinérgicamente al daño celular.

Un estudio realizado en saliva de pacientes con periimplantitis, ha puesto de manifiesto un aumento del estrés oxidativo, medido en saliva de 28 varones y 42 mujeres sanos con periimplantitis y 10 controles sanos sin periimplantitis. En éste estudio, el número medio de implantes dentales por pacientes fue de 4.7 y 2.7 en el grupo control. Los niveles de malonaldehído aumentaban como índice de peroxidación lipídica por reacción colorimétrica (HPLC) y la actividad MPO mieloperoxidasa, un indicador indirecto de inflamación, incrementan en saliva medidos por ELISA (Sánchez-Siles y cols., 2016).

Por su parte, el aumento de la respuesta inflamatoria local contribuye a la pérdida de la estabilidad del implante dental. En un reciente estudio, realizado en pacientes con implantes de zirconio se ha revelado el aumento de los niveles de las citoquinas proinflamatorias Interleuquina 1 Beta ($IL-1\beta$) y Factor de Necrosis

Tumoral alfa (TNF- α) en los pacientes portadores de implantes dentales de zirconio en comparación a los niveles alcanzados en el líquido crevicular de dientes contralaterales (control).

Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas sobre dichos mediadores proinflamatorios entre 36 pacientes con implantes de zirconio frente a 9 portadores de implantes dentales de titanio (Coccini y cols., 2015). Por tanto, una exacerbada respuesta inflamatoria local podría debilitar el implante si se producen procesos como la gingivitis.

La prevalencia de periimplantitis asociada a implantes de titanio, se estima que oscila entre un 10-20% en pacientes después 5 años de su implantación (Mombelli y cols., 2012).

Algunos autores, han descrito reacciones inmunes adversas al óxido de titanio como agente principal de dichas alteraciones (Jacobi-Gresser y cols., 2013; Sicillia y cols., 2008).

Por su parte, el análisis del líquido crevicular, es útil para evaluar las respuestas inflamatorias endógenas locales asociadas a la liberación de citoquinas proinflamatorias en la zona periodontal (Cimasoni., 1983).

Varios factores locales secretados por fibroblastos en el endotelio, desempeñan un papel crucial en la respuesta inmune innata y adaptativa frente a infecciones bucales o daño tisular por periodontitis. De hecho, altos niveles de citoquinas como IL-1 β aumentan conforme avanza el depósito de la placa bacteriana y reflejan directamente la inflamación local como posibles marcadores tempranos de inflamación gingival, asociado a pacientes portadores de implantes de titanio (Kinane y cols., 1992) y pueden ser indicativos del grado de patología (Ramseier y cols., 2016; Javed y cols., 2011; Petkovic y cols., 2010; Recker y cols., 2015).

En base a éstos estudios, se sugiere que niveles elevados de polimorfismos para IL-1 β y TNF- α podrían asociarse con pérdida de estabilidad de los implantes dentales.

Un mediador proinflamatorio es la citoquina IL-6, TNF- α y IL-1 β que se asocia con respuestas inflamatorias locales en pacientes con periimplantitis (Jacobi-Greisser y cols., 2013).

Otro reciente estudio ha medido los niveles de citoquinas proinflamatorias IL-6, IL-10, IL-17 y IL-33 en el fluido crevicular periimplantario en pacientes sanos (n=10), pacientes con mucositis periimplantaria (n=20) y pacientes con periimplantitis. El análisis de los mediadores proinflamatorios por ELISA indica que los niveles de citoquinas IL-6, IL-17 e IL-33 aumentan significativamente en el grupo con periimplantitis frente al grupo control sano. A su vez, las citoquinas proinflamatorias IL-17 e IL-33 también aumentaban en el grupo con mucositis, también frente al control. El aumento de tales niveles locales de citoquinas proinflamatorias se asocia con una intensificación de la actividad inflamatoria local (Severino y cols., 2016).

Por otra parte, la liberación de iones podría conducir a citotoxicidad o induce a procesos alérgicos en la zona del implante, ya que los iones metálicos liberados podrían alcanzar órganos distales y formar haptenos circulante de complejos metal-proteína, que podrían ser reconocidos por el sistema inmune y causar reacciones de hipersensibilidad (Case y cols, 1994), especialmente en aquellos con periimplantitis (Thierse y cols., 2005; Martin, 2004).

Se sabe que macrófagos expuestos a titanio incrementan los niveles de citoquinas proinflamatorias in vitro (Valles y cols., 2006). La respuesta inflamatoria es orquestada por varios tipos celulares como osteoblastos/osteoclastos, células inmunes (macrófagos, linfocitos), fibroblastos y células endoteliales en la zona periimplantaria (Thewes y cols., 2001; Lee y cols., 2014; Svensson y cols., 2015).

Jacobi-Gresser y colaboradores han puesto de manifiesto que polimorfismos genéticos para la citoquina IL-1 β predicen el fallo del implante (Jacobi-Gresser 2013).

Por otra lado, citoquinas quimiotácticas solubles como CCL17 y CCL22 o la analizada en ésta tesis denominada MCP-1 (Macrophage Colony Factor-1 del inglés) contribuyen a propagar la inflamación local y promueven quimiotaxis de células inmunes bajo inflamación inducida (Cadosch y cols., 2009). Además, el polimorfismo para IL-1 en fumadores es un predictor clínico de la periimplantitis (García-Delaney y cols., 2015).

Un reciente meta-análisis, muestra que los niveles de mediadores proinflamatorios aumentan significativamente en pacientes con periimplantitis, frente a aquellos pacientes sanos que portan implantes dentales. La conclusión del análisis sólo muestra una moderada evidencia de que los pacientes portadores de implantes con periimplantitis, aumentan los niveles de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6, TNF- α) en comparación a pacientes sanos con implantes. Por otro lado, el papel de las citoquinas relacionadas con procesos de osteogénesis o el papel de ciertas quimiocinas (citoquinas quimiotácticas) como posibles predictoras de periimplantitis es todavía muy limitado (Duarte y cols., 2016).

Sin embargo, no existen estudios clínicos que determinen directamente los niveles de mediadores proinflamatorios y lipoperóxidos a nivel sistémico tras un largo periodo de colocación del implante. Es probable que en pacientes con implantes y amalgamas dentales, exista migración de metales pesados a órganos distales que pudiera conducir al aumento sistémico de citoquinas proinflamatorias, razón por la cual se diseñó la presente tesis doctoral.

1.11 MUESTRA DE PELO

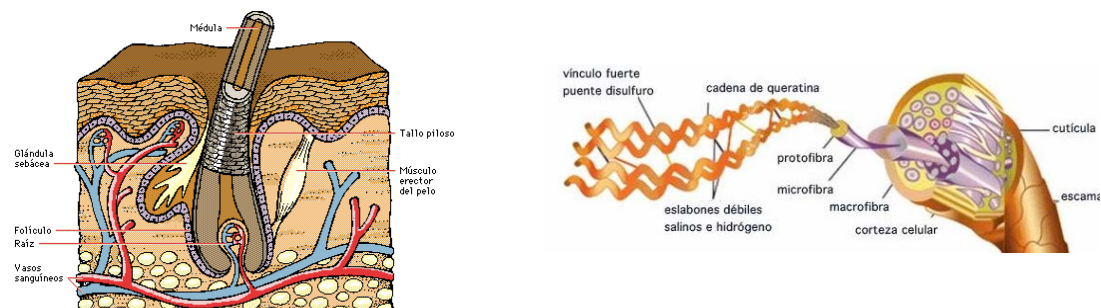
Durante la fase de crecimiento, el cabello se expone al entorno interno,

tales como la sangre, la linfa y los líquidos extracelulares. A medida que el cabello sigue creciendo y alcanza la superficie de la piel, sus capas externas se endurecen y bloquea en él, los productos metabólicos acumulados durante el período de formación. Este proceso biológico proporciona un plan y registro duradero del contenido de metales y la actividad metabólica nutricional que se ha producido durante este tiempo.

Ventajas del análisis del cabello

- Es un tejido de depósito y por lo tanto aporta ventajas al análisis de suero y orina.
- Es inerte, un tejido estable a la temperatura.
- No requiere biopsia.
- Puede remitirse al laboratorio por correo de forma sencilla.
- Es el medio biológico más utilizado en toxicología.
- Método indoloro, 1g pelo parte de la nuca (2 o 3 cm desde cuero cabelludo).

Figura 6: Ilustración de folículo de pelo. Adaptado de Sobotta. *Histología*. 3^o Edición. 2014. Editorial Panamericana.



El cabello se utiliza como uno de los tejidos de elección por parte de la Agencia de Protección del Medio Ambiente (E.P.A.) en la determinación de la exposición a metales tóxicos y concluye, que es más apropiado que la sangre u orina para el estudio de la exposición en la comunidad. Un ejemplo, es el sustrato elegido para el análisis de metales pesados como el Hg, que puede ser plasma, saliva, orina, sangre y pelo.

La mayoría de sustrato son efectivos en caso de intoxicaciones agudas (sangre y orina), pero el cabello revela una actividad intracelular, que no puede ser visto a través de la mayoría de otras pruebas.

Ante una exposición crónica, el pelo alcanza concentraciones más altas. El ratio mercurio (Hg) en pelo versus en sangre es 250:1, lo que significa que el valor del pelo (ppm) se puede multiplicar por 4 para encontrar el valor en sangre (ug/L) del último mes.

Por otra parte, otros estudios indican que el pelo puede representar un material analítico adicional para elementos traza (Cu^{++} y Zn^{++}) para complementar el suero sanguíneo (Follin y cols., 1991).

Las muestras de pelo se toman cortando con tijeras aproximadamente 0.25g de diferentes partes de la zona occipital. Después de rellenar la solicitud junto con las muestras se envían a un Laboratorio especializado para el estudio por espectrometría de masas.

En este trabajo de investigación las muestras se enviaron a laboratorio del Dr. DATA (EEUU). Doctor's Data es un laboratorio pionero en la determinación analítica, entre otros, de metales pesados con más de 35 años de experiencia en el testaje de metales pesados y de otras marcadores analíticos.

1.11.1 MINERALOGRAMA

Se conoce como mineralograma, al análisis realizado en un laboratorio para conocer el nivel de minerales presentes en el cabello de una persona. El análisis mineral tisular del cabello o mineralograma, refleja los niveles de minerales presentes a nivel intracelular, a diferencia de las analíticas convencionales (sangre, orina, heces), que reflejan niveles extracelulares.

Estos últimos pueden variar por motivos muy diferentes: ritmos circadianos, técnicas de muestreo, ejercicio físico, procesos inflamatorios agudos o crónicos, procesos infecciosos, situaciones de estrés.

Por el contrario, el mineralograma no está sujeto a estas fluctuaciones, razón por la cual es el test de elección para determinar el estado mineral de un individuo y para establecer su perfil metabólico.

Mediante el mineralograma, puede determinarse el estado mineral de una persona, lo cual permite establecer su perfil metabólico y saber qué composición de minerales, vitaminas y aminoácidos es más conveniente para restablecer su salud.

Por otra parte, las diferentes relaciones entre minerales posibilitan conocer el estado funcional del sistema neuroendocrino del organismo, lo cual permite corregir posibles disfunciones antes de que se manifieste un problema orgánico.

Figura 7: Mineralograma genérico, resultados de diferentes muestras de metales tóxicos y oligoelementos en pelo

Elementos Tóxicos & Esenciales; Pelo

METALES TÓXICOS			
	RESULTADO µg/g	INTERVALO DE LA REFERENCIA	PERCENTILE 68 th 95 th
Aluminio (Al)	5,0	< 7,0	
Antimonio (Sb)	< 0,01	< 0,066	
Arsenico (As)	0,018	< 0,080	
Bario (Ba)	0,61	< 1,0	
Berilio (Be)	< 0,01	< 0,020	
Bismuto (Bi)	0,008	< 2,0	
Cadmio (Cd)	< 0,009	< 0,065	
Plomo (Pb)	0,40	< 0,80	
Mercurio (Hg)	1,7	< 0,80	
Platino (Pt)	< 0,003	< 0,005	
Talio (Tl)	< 0,001	< 0,002	
Torio (Th)	< 0,001	< 0,002	
Uranio (U)	0,046	< 0,060	
Niquel (Ni)	0,54	< 0,20	
Plata (Ag)	0,13	< 0,08	
Estano (Sn)	0,09	< 0,30	
Titanio (Ti)	0,13	< 0,60	
Total Toxico Representacion			

ELEMENTOS ESENCIALES Y OTROS			
	RESULTADO µg/g	INTERVALO DE LA REFERENCIA	PERCENTILE 2.5 th 16 th 50 th 84 th 97.5 th
Calcio (Ca)	1660	200- 750	
Magnesio (Mg)	99	25- 75	
Sodio (Na)	60	20- 180	
Potasio (K)	18	9- 80	
Cobre (Cu)	81	11- 30	
Cinc (Zn)	240	130- 200	
Manganeso (Mn)	0,11	0,08- 0,50	
Cromo (Cr)	0,25	0,40- 0,70	
Vanadio (V)	0,019	0,018- 0,065	
Molibdeno (Mo)	0,031	0,025- 0,060	
Boro (B)	1,2	0,40- 3,0	
Yodo (I)	0,56	0,25- 1,8	
Litio (Li)	0,006	0,007- 0,020	
Fosforo (P)	180	150- 220	
Selenio (Se)	0,53	0,70- 1,2	
Estroncio (Sr)	12	0,30- 3,5	
Azufre (S)	44900	44000- 50000	
Cobalto (Co)	0,018	0,004- 0,020	
Hierro (Fe)	8,5	7,0- 16	
Germanio (Ge)	0,021	0,030- 0,040	
Rubidio (Rb)	0,019	0,011- 0,12	
Circonio (Zr)	0,014	0,020- 0,44	

INFORMACIÓN MUESTRA

COCIENTES



JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2.1 JUSTIFICACIÓN

Las amalgamas dentales están compuestas por metales pesados como el mercurio (50%) y plata (40%) y otros metales minoritarios como el estaño (Sn: 8%), cobre (Cu^{++}) o zinc (Zn^{++}). Por su parte, el implante dental de titanio es una aleación de titanio (Ti), aluminio (Al) y vanadio (V) (Ti: Ti-4Al-6V). En principio, las aleaciones de implantes de titanio se están utilizando en el campo de la implantología oral y en ortopedia al ser inertes y biocompatibles. Sin embargo, éste concepto está cambiando radicalmente, ya que se discute la bioseguridad de ciertos materiales dentales en los últimos años, incluidos los implantes de titanio. De hecho, la bioseguridad de las nanopartículas de dióxido de titanio (TiO_2) se ha discutido en varios estudios. A pesar de la opinión de que son biocompatibles, se han descrito reacciones adversas provocadas por metales pesados y toxicidad en líneas celulares humanas de neuronas y astrocitos tras la exposición al titanio “in vitro”. Además, la liberación de iones metálicos procedente de ciertos biomateriales dentales podría producir inflamación crónica. Considerando que un aumento del estrés oxidativo (ROS) contribuye a la fisiopatología de los procesos inflamatorios crónicos y aumenta el daño a nivel molecular (ADN, proteínas, lípidos y carbohidratos), es crucial determinar aquellos posibles biomarcadores que pudieran predecir la toxicidad a largo plazo de los implantes de titanio.

Por otra parte, el avance científico en el campo y el uso de nuevos biomateriales ha reducido ostensiblemente la exposición a metales pesados en el ámbito odontológico. Sin embargo, y a pesar del uso de medidas reguladoras, aún persisten casos de susceptibilidad a metales pesados por amalgamas, implantes dentales y aleaciones utilizadas en prótesis sobre implantes.

La combinación de aleaciones metálicas en boca, es una reacción de deterioro inevitable, que implica mecanismos electroquímicos y alteraciones a

nivel molecular y celular, que sinérgicamente conducen a una liberación de iones metálicos indeseables. Por tanto, conviene extremar al máximo las medidas de precaución y seguridad, como también reducir la exposición crónica a largo plazo de los metales pesados en el organismo de pacientes con aleaciones dentales.

Consecuentemente, la búsqueda de nuevos biomarcadores sistémicos que pudieran predecir una posible toxicidad sistémica a largo plazo debida a la exposición crónica de metales pesados y de biomateriales dentales en el organismo por corrosión galvánica, podría permitir desarrollar medidas preventivas destinadas a disminuir en la medida de lo posible la liberación de metales a órganos distales y así reducir sus posibles respuestas alérgicas y tóxicas a largo plazo. En base a estas evidencias indirectas, hemos planteado los presentes objetivos. Los niveles de metales pesados y/o oligoelementos han sido determinados en pelo por la técnica de espectrometría de masas (ICP-MS); Los niveles de mediadores inflamatorios han sido cuantificados por ELISA y el estrés oxidativo se midió por técnicas colorimétricas en la presente Tesis Doctoral.

2.2 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Analizar si la presencia crónica de implantes de titanio en portadores de amalgamas dentales (A+I), pudiera alterar los niveles de metales pesados y/o oligoelementos y conducir a una respuesta inflamatoria sistémica crónica junto a una mayor susceptibilidad al estrés oxidativo, frente a los portadores de amalgamas dentales (A).

El objetivo general puede ser desglosado en una serie de objetivos específicos, que permiten responder a los diferentes aspectos que plantea nuestro estudio:

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Analizar comparativamente los niveles de una serie de metales pesados (Al, Sb, As, Ba, Be, Bi, Cd, Pb, Hg, Pt, Tl, Th, U, Ni, Ag, Sn, Ti) y de oligoelementos (Ca^{++} , Mg^{++} , Na^+ , K^+ , Cu^{++} , Zn^{++} , Mn^{++} , Cr, V, Mo, B, I, Li, P, Se, Sr, S, Fe^{++} , Ge, Rb) en pacientes odontológicos portadores de implantes de titanio y amalgamas dentales durante al menos 10 años en boca (media: 15 años), frente a los portadores únicamente de amalgamas dentales y controles sanos (sin amalgamas, ni implantes dentales).
- 2- Comparar los niveles de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β) y de la quimiocina (citoquina quimiotáctica, MCP-1: Macrophage Colony protein-1) en pacientes con implantes de titanio y amalgamas dentales (durante al menos 10 años en boca, media: 15 años), frente a los portadores únicamente de amalgamas dentales y controles sanos (sin amalgamas, ni implantes dentales).
- 3- Valorar si existe una mayor susceptibilidad al estrés oxidativo en pacientes con implantes de titanio y amalgamas dentales (A+I), frente a aquellos portadores únicamente de amalgamas dentales (A) debido a cambios significativos sobre los niveles sistémicos de malonaldehído (MDA) y de glutatión (GSH: forma reducida).
- 4- Estudiar si existen diferencias estadísticamente significativas de los ratios Se/Ag, Se/Hg, Se/Pb entre pacientes con amalgamas e implantes de titanio (A+I) frente a los portadores únicamente de amalgamas dentales (A).



MATERIALES Y MÉTODOS

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

Los sujetos involucrados en el presente estudio han sido tratados odontológicamente por el doctorando. Los seleccionados fueron correctamente instruidos para participar en el mismo y dieron su aprobación mediante la firma del correspondiente consentimiento informado, manteniéndose su anonimato y privacidad en todo momento, según los principios de la declaración de Helsinki.

Cabe destacar, que el Centro Dental donde se realizó el estudio muestral, se caracteriza por tratamientos multidisciplinarios por el cual la mayoría de los pacientes tienen acceso a tratamientos integrales. Por ello, se abordan las distintas disciplinas de la odontología y los pacientes siguen un riguroso seguimiento semestral y anual dependiendo de las necesidades del tratamiento realizado. De hecho, los portadores de implantes dentales siguen un programa de mantenimiento estricto de revisiones de 4-6 meses parecido a los pacientes que han padecido problemas de enfermedad periodontal.

Además, la clínica CIROM (Centro de Implantología y Rehabilitación Oral Multidisciplinaria) está acreditada mediante la normativa española de control de calidad AENOR por el (certificado CD-2014-001; ER-0569/2014) y normativa UNE-EN ISO 9001:2008 y UNE 179001-2001, España).

Los pacientes seleccionados para este trabajo de investigación acudieron de forma consecutiva a la clínica CIROM para realizar las pruebas muestrales de conveniencia oportunas.

3. 1.1 Tamaño muestral

En el presente estudio comparativo y analítico, seleccionamos un total de 74 pacientes, 30 hombres (40%) y 44 mujeres (60%), con edades comprendidas



entre 35 y 65 años, de los cuales 27 portaban implantes dentales y restauraciones de amalgamas (grupo A+I, n=27) durante al menos 10 años (media: 15 años), 34 con amalgamas dentales únicamente durante al menos 10 años (media: 15 años) (grupo A, n=34) y 13 controles sin restauraciones de amalgamas y sin implantes dentales (grupo Cont, n=13).

Los pacientes se eligieron en un rango de edad similar (44 años como media del grupo A y Cont.) y 54 años para el grupo de implantes dentales y amalgamas (A+I). Se incluyeron pacientes en el grupo (A+I) con al menos un mínimo de un implante de titanio (Ti-6Al-4V) y un máximo de 7 implantes (media: 4 implantes). Por ello, el grupo de pacientes con amalgamas e implantes (A+I) tiene un número medio de 4 implantes de titanio y de 4 amalgamas.

En el grupo de portadores de amalgamas dentales (A) hemos incluido un mínimo de 2 restauraciones de amalgamas y un máximo de 8. Por ello, el grupo con amalgamas dentales tiene una media de 5 amalgamas.

Los pacientes seleccionados tienen un status socio-económico medio/alto y todas viven en el área de Levante en España, siendo la mayoría de la región de Murcia (60%) y algunos de la provincia de Alicante (40%), España.

El presente diseño experimental carece de un grupo de pacientes únicamente con implantes dentales de titanio, debido a que es inusual la existencia del mismo, sin la historia de una amalgama previa en el tiempo. La selección de pacientes por encima de 30 años de edad que tienen implantes de titanio, en su mayoría previamente han sido tratados en su infancia o adolescencia con restauraciones de amalgamas dentales. Por ello, salvo en casos excepcionales como, accidentes de tráfico, traumatismos dentarios o anodoncia/oligodoncia, es posible encontrar pacientes únicamente con implantes dentales.



Por otra parte queremos destacar que los pacientes seleccionados para este estudio carecen de dispositivos de ortodoncia (brackets, arcos, ligaduras, etc.).

Al comparar la homogeneidad de las muestras del grupo de pacientes con implantes dentales y restauraciones de amalgamas (n=27), el grupo de pacientes con amalgamas y sin implantes dentales (n=34) y los individuos controles sin implantes y sin amalgamas dentales (n=13), observamos que eran homogéneos respecto a la edad, sexo, consumo de hábitos tóxicos (tabaco y alcohol) y situación demográfica.

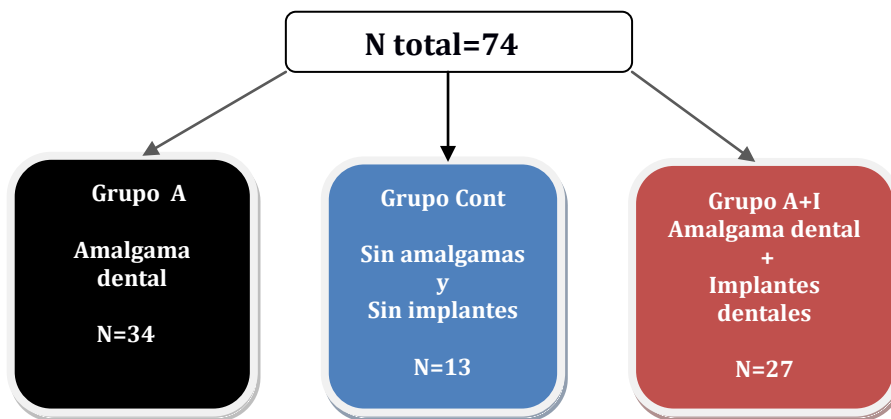
Cont= Controles (sin implantes dentales y sin amalgamas) **n=13**

A= Grupo de pacientes con al menos dos amalgama dental **n=34**

A+I= Grupo de pacientes con implantes y amalgamas dentales **n=27**

N total=74 pacientes

Figura 8: Descripción de la muestra de estudio.



3.1.2 Valoración de la muestra

En todos los grupos de pacientes seleccionados se siguió el mismo criterio de anamnesis, historia clínica, exploración clínica y radiográfica, donde se registraron los siguientes datos:



3.1.2.1 Historia Clínica:

- a- Datos personales.
- b- Características socio demográficas.
- c- Hábitos tóxicos: consumo de tabaco y/o alcohol.
- d- Presencia de enfermedades sistémicas concomitantes.
- e- Consumo de medicamentos.

3.1.2.2 Valoración dentaria:

Se realizó un odontograma completo para cada paciente. Se anotaron números de dientes con restauraciones de amalgamas dentales, ausencias dentarias y/o implantes dentales.

Figura 9: *Imagen intraoral de muestra grupo A.*



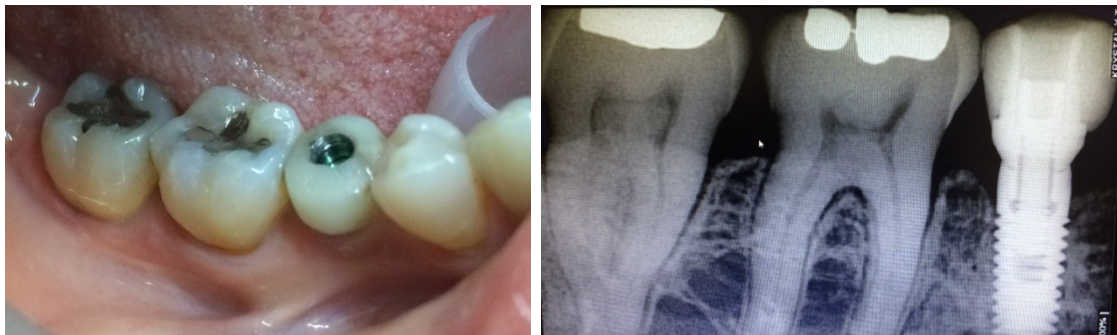
3.1.2.3 Valoración periodontal:

El criterio de exploración fue igual para todos los grupos. Las exploraciones se realizaron con un espejo bucal plano del número 5 (Hy-Friedy®, Madrid, España) y una sonda periodontal tipo OMS (PCP11 5B) (Hy-Friedy®, Madrid, España).

3.1.2.4 Valoración clínica periodontal y periimplantar:

- a- Comprobación de ausencia de movilidad dentaria.
- b- Comprobación de ausencia de movilidad de implante dental (grupo A+I).
- c- Comprobación de ausencia de dolor a la percusión dentaria o implante.
- d- Sondaje y comprobación de ausencia de sangrado al sondaje periodontal.
- e- Comprobación de ausencia de sangrado al sondaje periimplantario (A+I).
- f- Comprobación clínica de ausencia de supuración.
- g- Comprobación de ausencia de hiperplasia o granuloma.
- h- Comprobación de ausencia de inflamación gingival o edema gingival.
- i- Sondaje para comprobar ausencia de bolsa periodontal y periimplantaria (profundidad de sondaje).

Figura 10: *Imagen intraoral y radiovisiografía de muestra grupo (A+I).*



3.1.2.5 Estudio radiográfico:

Se realizaron radiografías panorámicas a cada paciente para valorar ausencias de quistes o granulomas periapicales.



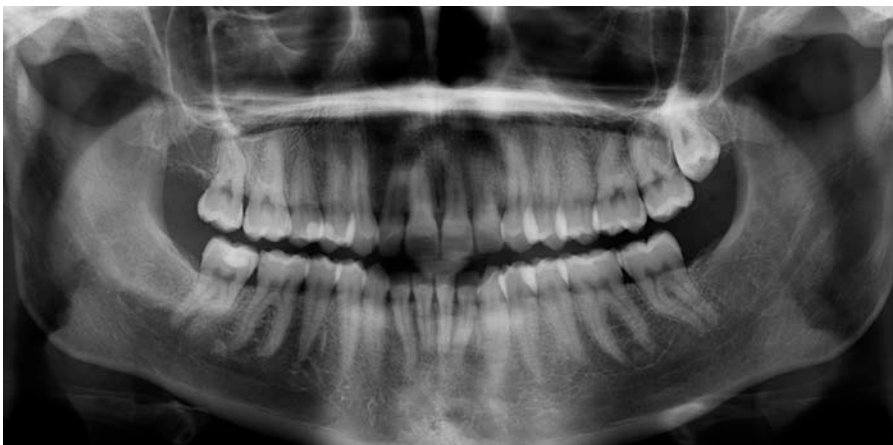
Figura 11: *Ejemplo de Rx Panorámica donde se puede apreciar las restauraciones de amalgamas y los implantes dentales rehabilitados con coronas de metal cerámica. Grupo (A+I).*



Figura 12: *Ejemplo de Rx Panorámica donde se observa las restauraciones de amalgamas sin implantes dentales. Grupo (A).*



Figura 13: *Ejemplo de Rx Panorámica sin restauraciones de amalgamas y sin implantes dentales. Grupo control (Cont).*



3.1.3 Criterio de inclusión

Los criterios de inclusión para las pacientes se indican a continuación.

3.1.3.1 Criterio de inclusión: para el grupo de pacientes con implantes dentales de Ti y restauraciones de amalgamas (A+I)

- Ser portadores de implantes dentales rehabilitados protéticamente durante al menos 10 años.
- Ser portadores de restauraciones de amalgamas durante al menos 10 años.
- Se incluyeron pacientes con al menos un implante dental de titanio y al menos dos restauraciones de amalgamas.
- Ausencia de periimplantitis en los implante dentales de pacientes seleccionados siguiendo los criterios de (Lindhe y Meyle, 2008) del 6º workshop europeo en periodoncia.
- No ser diagnosticado de enfermedad periodontal según los criterios del 5º workshop europeo en periodoncia (Tonetti y Claffey, 2005).

3.1.3.2 Criterio de inclusión del grupo de pacientes con restauraciones de amalgamas (grupo A)

- Presencia de empastes en boca durante al menos 10 años (media: 15 años).
- No ser portador de implantes dentales.
- No ser diagnosticado de enfermedad periodontal según los criterios del 5º workshop europeo en periodoncia (Tonetti y Claffey, 2005).



3.1.3.3 Criterios de inclusión para el grupo control (grupo Cont), sin implantes dentales y sin restauraciones de amalgamas

- No ser portador de implantes dentales, ni de restauraciones de amalgamas.
- Ausencia de enfermedad periodontal según los criterios del 5º workshop europeo en periodoncia (Tonetti y Claffey, 2005).

3.1.3.4 Criterios de inclusión comunes para los tres grupos

- Ausencia de patología psiquiátrica o de desórdenes neurológicos y/o metabólicos o patología tiroidea. Sin tratamiento ni uso de quelantes y sin presencia de enfermedad hepáticas, renal.
- Ausencia de cualquier enfermedad inflamatoria crónica sistémica.
- Haber firmado el consentimiento informado.

3.1.4 Criterios de exclusión para los tres grupos

- Pacientes con enfermedades metabólicas o desórdenes neurológicos de acuerdo al DMS IV.
- Pacientes que han tomado estimulantes, anti convulsionantes o la toma de drogas psicotrópica atípicas.
- Estar diagnosticado de cualquier enfermedad inflamatoria crónica sistémica. Ej.: pacientes con enfermedad de Cushing o artritis reumatoide, ausencia de diabetes, enfermedad tiroidea, etc.
- Hábitos tóxicos: fumadores y consumidores de alcohol.



- Ausencia de patología infecciosa bucal, ej. periimplantitis.
- Ingesta de suplementos dietéticos antioxidantes o suplementos nutricionales en los últimos 6 meses antes de la toma del pelo.
- No haber firmado el consentimiento informado.

3.2 MÉTODOS

Todas las exploraciones fueron realizadas por un único profesional previamente entrenado en el diagnóstico y selección de los pacientes involucrados para cada grupo experimental en cuestión.

Las muestras de pelo se tomaron en todos los pacientes, cortando con tijeras aproximadamente 0.25 g de la zona occipital, y se enviaron al laboratorio del Dr. DATA (USA) para la determinación de una serie de metales pesados/oligoelementos en pelo por Espectrometría de masas (ICP-MS).

Los niveles de metales pesados se midieron por ICP-MS en $\mu\text{g/g}$ (Al, Hg, Ag, Ba, Sb, As, Be, Bi, Cd, Pb, Pt, Tl, Th, U, Ni, Sn, Ti), así como los siguientes oligoelementos determinados (Ca^{++} , Mg^{++} , Na^+ , K^+ , Cu^{++} , Zn^{++} , Mn^{++} , Cr, V, Mo, B, I, Li, P, Se, Sr, S, Co^{++} , Fe^{++} , Ge, Rb).

En la tabla adjunta, se ilustra un ejemplo representativo de un mineralograma con sus valores de referencias normales según estudios poblacionales para todos los metales/oligoelementos reseñados en nuestro estudio por el laboratorio de referencia Dr. DATA (USA) y los valores obtenidos de un paciente en cuestión, medidos en $\mu\text{g/g}$ de pelo.

Figura 14: Ejemplo ilustrativo de los niveles de metales pesado/oligoelementos en pelo medidos por espectrometría de masas (ICP-MS).

Elementos Tóxicos & Esenciales; Pelo

METALES TÓXICOS							
	RESULTADO	INTERVALO DE LA	PERCENTILE				
	µg/g	REFERENCIA	68 th	95 th			
Aluminio (Al)	4,2	< 7,0					
Antimonio (Sb)	0,012	< 0,050					
Arsenico (As)	0,045	< 0,060					
Bario (Ba)	0,11	< 2,0					
Berilio (Be)	< 0,01	< 0,020					
Bismuto (Bi)	0,026	< 2,0					
Cadmio (Cd)	< 0,009	< 0,050					
Plomo (Pb)	0,07	< 0,60					
Mercurio (Hg)	1,4	< 0,80					
Platino (Pt)	< 0,003	< 0,005					
Talio (Tl)	0,001	< 0,002					
Torio (Th)	< 0,001	< 0,002					
Uranio (U)	0,028	< 0,060					
Niquel (Ni)	0,08	< 0,30					
Plata (Ag)	0,51	< 0,15					
Estano (Sn)	0,04	< 0,30					
Titanio (Ti)	0,58	< 0,70					
Total Toxic Representation							
ELEMENTOS ESENCIALES Y OTROS							
	RESULTADO	INTERVALO DE LA	PERCENTILE				
	µg/g	REFERENCIA	2.5 th	16 th	50 th	84 th	97.5 th
Calcio (Ca)	1950	300- 1200					
Magnesio (Mg)	300	35- 120					
Sodio (Na)	18	20- 250					
Potasio (K)	3	8- 75					
Cobre (Cu)	14	11- 37					
Cinc (Zn)	170	140- 220					
Manganeso (Mn)	0,07	0,08- 0,60					
Cromo (Cr)	0,28	0,40- 0,65					
Vanadio (V)	0,026	0,018- 0,065					
Molibdeno (Mo)	0,032	0,020- 0,050					
Boro (B)	1,3	0,25- 1,5					
Yodo (I)	0,36	0,25- 1,8					
Litio (Li)	< 0,004	0,007- 0,020					
Fosforo (P)	161	150- 220					
Selenio (Se)	0,39	0,55- 1,1					
Estroncio (Sr)	22	0,50- 7,6					
Azufre (S)	45000	44000- 50000					
Cobalto (Co)	0,11	0,005- 0,040					
Hierro (Fe)	8,7	7,0- 16					
Germanio (Ge)	0,029	0,030- 0,040					
Rubidio (Rb)	0,003	0,007- 0,096					
Circonio (Zr)	0,056	0,020- 0,42					
INFORMACIÓN MUESTRA			COCIENTES				

Por otra parte, se extrajo sangre a los pacientes y se aisló el plasma mediante la centrifugación a 2700 rpm de la sangre durante 10 minutos para la posterior determinación bioquímica de peróxidos lipídicos por TBARS (protocolo

adaptado de Tiwari, 2013) y de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β y MCP-1) por ELISA, para ello, seguimos protocolo adaptado de Merino y cols., 2000. Se separaron varias alícuotas del plasma para su posterior congelación y determinación de tales parámetros.

3.2.1 Técnica de TBARS (peroxidación lipídica Malonaldehído: MDA)

Los tetróxidos son inestables y pueden formar MDA (Malonaldehído) tras su degradación siendo los niveles de MDA un índice directo del grado de peroxidación lipídica (Devasagayam y cols., 2003). El MDA, formado durante las últimas etapas de la ruptura de los peróxidos lipídicos de los ácidos grasos ataca a los aminoácidos de proteínas (ej.: lisina) y a los grupos sulfidrilo (-SH), que forman parte del glutatión y de otros sistemas antioxidantes endógenos. En la lipoperoxidación se producen los 4-hidroxi-alquenoales y en particular el 4-HNE (4-hidroxinonenal), que constituye un oxidación del ácido araquidónico muy reactivo, que ataca al DNA y reacciona con las proteínas (Devasagayam y cols., 2003).

En nuestro estudio, los niveles de peróxidos lipídicos se han determinado mediante el procedimiento descrito por Tiwari y cols. (Tiwari y Chopra, 2011).

Brevemente, se introduce el reactivo TBARS en un baño a 100°C. Para la cuantificación se usa una recta patrón de concentraciones conocidas de ácido tiobarbitúrico (TBARS). El reactivo se añade a todas las muestras a determinar en tampón con tiobarbitúrico (TBA) a pH 6,8 según la técnica de Wills (1965).

Posteriormente, se añade 0,5 ml de TBARS a la fracción superior del plasma (previamente centrifugado a 1300 rpm) y 0.5 ml de Buffer Tris-HCl. Tras incubación a 37°C durante 2 horas, se añade 1 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0.67% y tras 10 minutos de incubación y una vez enfriados, se añaden 0.5 ml de agua destilada.



Finalmente, se mide la absorbancia en placas de Elisa de 96 pocillos a 532 nM. El ácido tiobarbitúrico se cuantifica mediante una recta patrón de concentraciones de ácido tiobarbitúrico MDA conocidos. Los niveles de MDA se expresan en miliM de malonaldehído (MDA)/mg de proteína y se expresaron como porcentaje frente al control, según protocolo descrito por Tiwari y Chopra (Tiwari y Chopra, 2011).

3.2.2 Determinación de los niveles de Glutación reducido (GSH)

La concentración de glutación reducido (GSH) ha sido medido siguiendo el protocolo descrito por Hissin y Hilf. en 1976 y adaptado de López y colaboradores (Lopez y cols., 2006). Para ello, se añadió tampón fosfato 0.1 M más EDTA 5 mM (Ph 8.0) y H₃PO₄ (25%) a todas las muestras. Para su determinación (GSH reducido) se añadieron 200 µl de 40 mM de N-Etilmaleimida y 100 µl de ortotalaldehído, midiéndose la fluorescencia a 350 nM de excitación y 420 nM de emisión tras 15 minutos de incubación a temperatura ambiente (Hissin y Hilf., 1976). Los resultados se expresan como porcentaje del control (sin restauraciones de amalgamas y sin implantes de titanio).

3.2.3 Técnica de Bradford para la cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas se determinó antes de realizar los ELISAs, ya que se cargaron entre 5-10 µg/ml de proteína total según kit de ensayo de Bradford comercial.

El ensayo se basa en el cambio diferencial de absorbancia producido cuando el compuesto azul brillante de Comasiee (G-250 o reactivo de Bradford), reacciona con los residuos aminoacídicos de las proteínas, y se une principalmente, a aminoácidos básicos y aromáticos, con lo que se produce un cambio de absorbancia de 465 nm a 595 nm.



Bradford demostró que el coeficiente de extinción molar del complejo formado por la albúmina (patrón) es constante durante un rango de concentración de 10 veces, con lo que se asegura un apropiado ratio de concentraciones en la linealidad del patrón. Por tanto, la variación de color será directamente proporcional a la cantidad de proteína existente en nuestra muestra, hasta el rango de linealidad del ensayo (último punto del estándar).

Para la determinación de la concentración de proteínas se cargan 10 microlitros de un estándar de concentraciones crecientes de albúmina y 10 microlitros de las muestras a determinar en la microplaca de proteínas. Tras cargar todas las muestras, se añaden 200 μl del reactivo de Bradford (previamente diluido 1:5 en agua MiliQ, y filtrado con papel de filtro en un embudo).

A continuación, se deja incubar a temperatura ambiente durante un tiempo máximo de 60 minutos, después del cual, se procede a la lectura densitométrica en un lector de microplacas de ELISA (TERMO) a 595 nm de longitud de onda.

En el aparato lector, las muestras son agitadas mecánicamente, durante 10 segundos; a continuación, se indica la primera lectura de absorbancia para cada una de las muestras. De esta manera, se calculará la concentración de proteínas existente en cada muestra y el volumen a cargar de las mismas en la placa de ELISA.

3.2.4 Técnica de ELISA para la detección de IL-1 β y MCP-1

Existe una diversidad de técnicas de ELISA para la detección de antígenos solubles o proteínas de membrana. La técnica de ELISA, se basa en que el antígeno a determinar (en este caso, Interleuquina IL-1 β o MCP-1), es reconocido específicamente por un anticuerpo primario.



A su vez, este anticuerpo primario es reconocido por un anticuerpo secundario, que está conjugado con la actividad enzimática de tipo peroxidasa (POD). Mediante ésta actividad enzimática, el agua oxigenada (H_2O_2) presente en el tampón, se desdobra en H_2O y oxígeno molecular (O_2), el cual produce una reacción colorimétrica, por la oxidación del sustrato ortofenilendiaminofosfato (OPD) (Merino y cols., 2000).

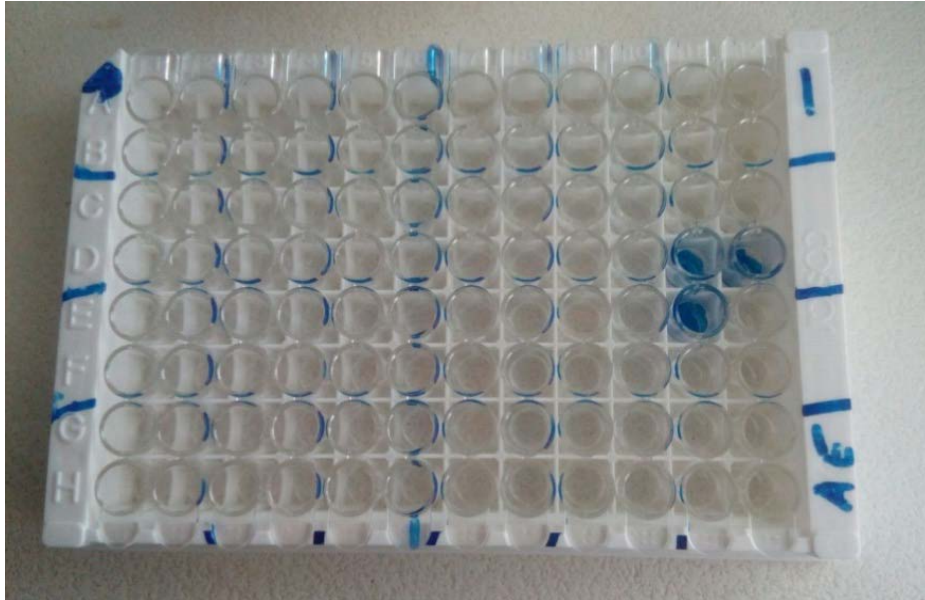
Esta reacción se ve favorecida por el pH ácido del medio, ya que la actividad catalasa y peroxidasa es óptima en un rango de pH de 4,5-5,2. Finalmente, la intensidad de la reacción colorimétrica, se cuantifica por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 495 nm de longitud de onda en el lector de placas de ELISA (TERMO).

Los niveles de IL-1 β y de MCP-1 se midieron siguiendo protocolo descrito por el Dr. Merino (Merino y cols., 2000, 2011) y adaptados del protocolo comercial empleado (LETI, Barcelona).

Los estándares se diluyen en las proteínas recombinantes (IL-1 β o MCP-1, según kit) en rango creciente de concentraciones según kit comercial (LETI, Barcelona). En ambos casos 50 μ l de cada estándar (proteínas recombinantes, bien IL-1 β o MCP-1) se incuban durante 24 horas a 4°C en sendas placas de ELISA de 96 pocillos. Figura 15.



Figura 15: placa de ELISA de 96 pocillos para la detección de IL-1 β o MCP-1.



Tras realizar 5 lavados en washing buffer (buffer de lavado), se proceden a bloquear los sitios de unión inespecífica por la adición de 100 μ l de buffer de bloqueo con albúmina (BSA) durante 60 minutos. El buffer de bloqueo contiene 0,02% de trimerosal, Tween-20 y PBS (buffer fosfato salino 1x) y 3% de BSA. Tras realizar 5 lavados con (washing buffer 1X), se añaden los respectivos anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C en nevera para cada mediador inflamatorio a todos los pocillos en sendas placas de ELISA.

Para el anticuerpo monoclonal de IL-1 β , se añaden 50 microlitros a 1:500 diluido y de MCP-1 a 1:400 diluidos en buffer de lavado. Tras incubación durante 60 minutos a temperatura ambiente en cámara humidificada, se procede a añadir un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa HRP, que reconoce específicamente el anticuerpo primario concreto (bien para IL-1 β o bien para MCP-1), produciéndose una reacción colorimétrica por oxidación del sustrato OPD.

Figura 16: Reactivos (estándares y anticuerpos primarios y secundarios para la determinación de IL-1 β y MCP-1 en plasma).



Finalmente, se realizan 5 lavados en buffer de lavado y se lee la absorbancia a 492 o 450 nm la adición del sustrato colorimétrico de revelado OPD (Orto-fenilendiamina) en 0.03% de agua oxigenada según protocolos propios (Merino y cols., 2011).

Para ello, se añaden 10 microlitros de OPD por cada 10 ml en buffer citrato y H₂O₂ al 3% (1 μ l/10 ml) y se procede al revelado durante 10 minutos a temperatura ambiente. El buffer citrato contiene 2 volúmenes de ácido cítrico y uno de citrato sódico (Merino y cols., 2000). Por último, se lee la absorbancia a 492/450 nm en espectrofotómetro y se anotan los valores de absorbancia.

3.2.4.1 Anticuerpos para IL 1 β o MCP-1 (LETI kit, Barcelona)

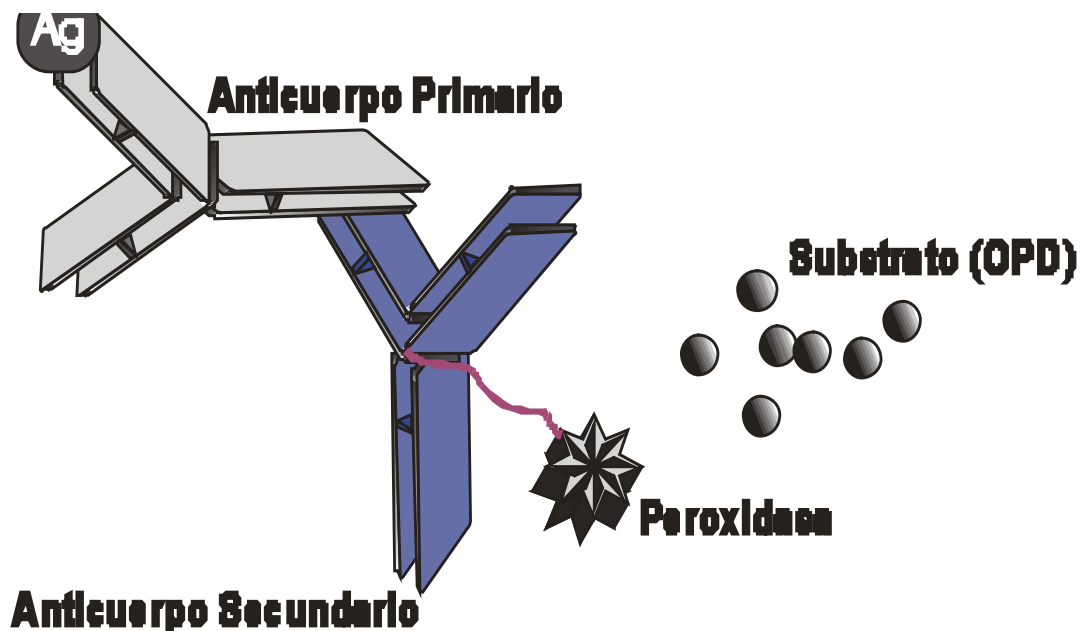
Los anticuerpos del kit comercial (LETI, Barcelona) reconocen las citoquinas IL-1 β y MCP-1 (Macrophage Colony protein-1) en plasmas mediante anticuerpos monoclonales específicos. El anticuerpo secundario comercial reacciona con todas las clases y subclases de inmunoglobulina G y reconoce el anticuerpo primario monoclonal para IL-1 β o MCP-1.

Figura 17: Representación esquemática del fundamento de las técnicas de ELISA.

Ag= Antígeno (IL-1 β o MCP-1)

Sustrato OPD= Ortofenilendiaminofosfato.

Reproducido con la autorización de Dr. José Joaquín Merino (Tesis Doctoral)





3.2.5 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el software (V17.0) y Sigma Plot 11.0. Para cada grupo experimental, se indica la media de cada metal pesado/oligoelemento obtenido en pelo y su error relativo.

El error relativo de la media se evalúa con la varianza del grupo dividido por la raíz de n , donde n es el tamaño muestral para cada grupo experimental (incluidos controles).

La prueba de Levene evaluó si existía homogeneidad de varianza. Cuando el test de Levene muestra un efecto significativo ($p < 0,05$), se presupone que no existe homogeneidad de varianza ($p < 0,05$) y los datos siguen una distribución no paramétrica. Por ello, se realizó un análisis de Kruskal Wallis y el análisis post-Hoc por el test U de Mann-Whitney entre los diferentes grupos experimentales. El análisis de Kruskal Wallis indica la media, el percentil 25% (Q1) y percentil 75% (Q3) para cada metal o oligoelemento analizado.

Por su parte, cuando el test de Levene indica un efecto no significativo ($p > 0,05$, n.s), existe homogeneidad de varianza. En éste caso, evaluamos las posibles diferencias mediante ANOVA y comparamos los diferentes grupos experimentales mediante análisis post-Hoc de Bonferroni.

Las correlaciones entre variables se han determinado mediante (r) de Spearman cuando no existe homogeneidad de varianza y mediante (r) de Pearson en casos de datos con una distribución homogénea.

Las diferencias son estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$ y altamente significativas si $p < 0,01$.



RESULTADOS

4 RESULTADOS

CAMBIOS EN LOS NIVELES SISTÉMICOS DE GLUTATION REDUCIDO (GSH), MALONALDEHÍDO (MDA), CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS (IL-1 Beta) y MCP-1) EN PACIENTES CON IMPLANTES DE TITANIO Y/O AMALGAMAS DENTALES

En esta sección de resultados se indica la media y el error relativo para todos los parámetros analizados en los diferentes grupos experimentales, con el siguiente tamaño muestral:

Cont= Controles (sin implantes dentales y sin amalgamas) n=13

A= Grupo de pacientes con al menos dos amalgama dental n=34

A+I= Grupo de pacientes con implantes y amalgamas dentales n=27

n total=74 pacientes

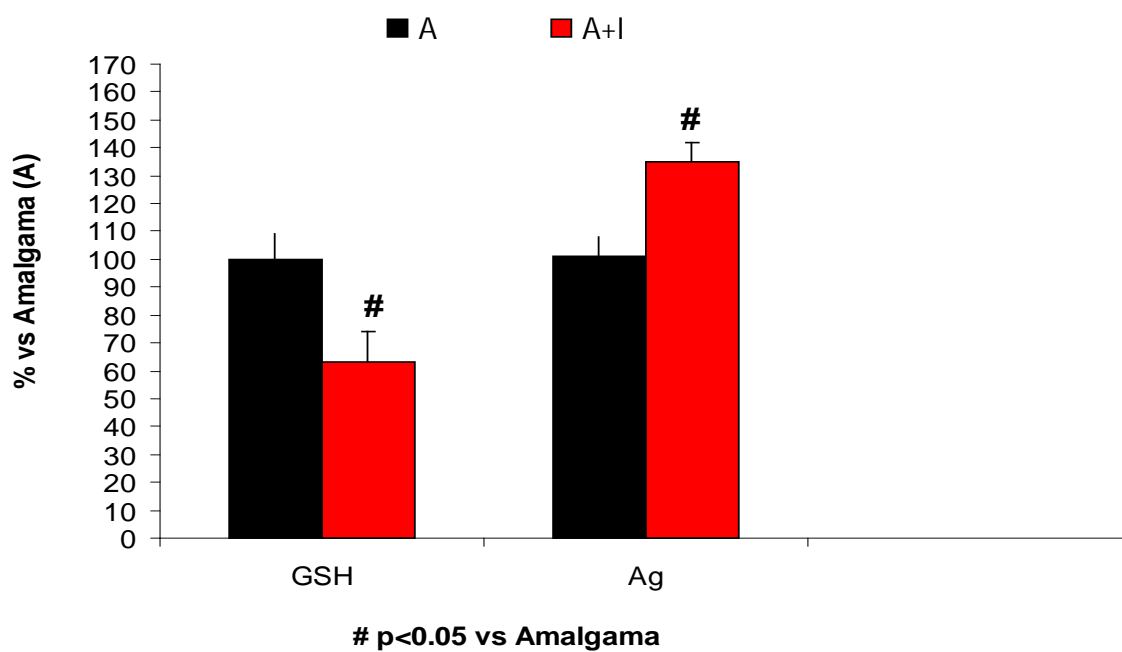
4.1 Niveles de Glutación reducido (GSH)

Los niveles de Glutación reducido (GSH) sistémico disminuyen significativamente en los pacientes con implantes de titanio y amalgamas dentales (A+I) frente a los portadores de amalgamas dentales según indica el análisis de Mann Withney ($p < 0,05$). Previamente hemos puesto de manifiesto que los portadores de amalgamas dentales (A) tiene niveles significativamente más altos que el grupo control (sin amalgamas y sin implantes dentales, $p < 0,05$; Cabaña-Muñoz y cols., 2015a).

Dicho descenso podría deberse, quizás, a los elevados niveles de plata (Ag) evidenciados en dicho grupo (A+I) frente al de portadores únicamente de amalgamas dentales (A). Los pacientes con amalgamas mostraron niveles significativamente más altos que los controles ($p < 0,05$; dato no mostrado, Cabaña-Muñoz y cols., 2015a).



Figura 18: Niveles más bajos de Glutación reducido y aumento de plata (Ag) en grupo (A+I) frente a grupo (A).

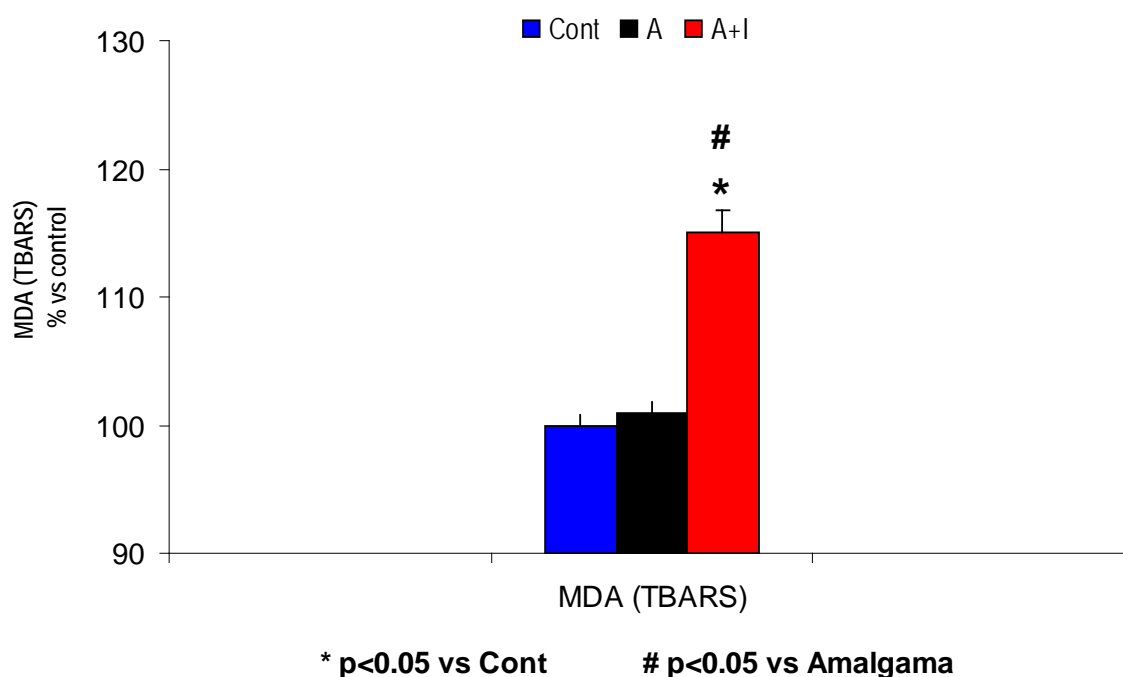


4.2 TBARS: incremento de los niveles de Malonaldehido (MDA) como índice de peroxidación lipídica en pacientes con implantes de titanio y amalgamas dentales.

Se observa un efecto significativo sobre los niveles sistémicos de peróxidos lipídicos (MDA, TBARS) mediante el análisis de Kruskal Wallis ($H=33.64$, $p<0.001$). El análisis mediante el test de Dunn's refleja un incremento significativo de la peroxidación lipídica en los pacientes con implantes y amalgamas (A+I) frente a los portadores de amalgamas dentales (A) ($p<0,05$) y a controles (C), respectivamente ($p<0.05$). Sin embargo, los pacientes únicamente con amalgamas dentales no mostraron un efecto significativo frente a los controles (Cont) ($p>0,05$, n.s).



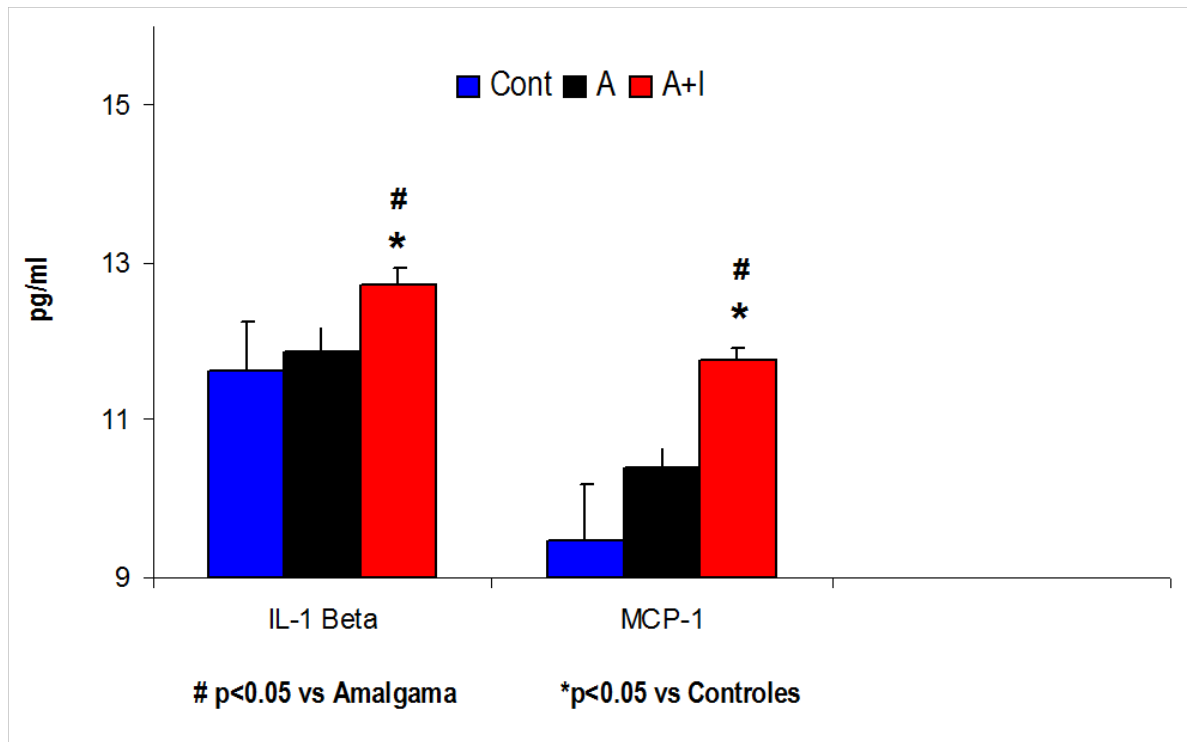
Figura 19: Incremento de peroxidación lipídica (TBARS) en pacientes con implantes y amalgamas (A+I) frente a portadores de amalgamas (A) y controles (Cont), respectivamente



4.3 Aumento significativo de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β y MCP-1 (Macrophage Colony Protein-1) en pacientes con implantes de titanio y amalgamas dentales (A+I) frente a los portadores de amalgamas dentales (A)

Se observa un efecto significativo sobre los niveles sistémicos de la citoquina proinflamatoria IL-1 β por ELISA en el análisis de Kruskal Wallis ($H=9,37$, $p=0.009$). El análisis post-Hoc por Mann Whitney evidencia un aumento significativo tanto de los niveles sistémicos de IL-1 β como de MCP-1 en los pacientes con implantes y amalgamas (A+I), frente a sus respectivos portadores de amalgamas dentales ($p<0,05$) y a sus controles ($p<0.05$ en ambos casos). Sin embargo el grupo de amalgamas dentales no mostró ningún efecto significativo en relación al grupo control (Cont).

Figura 20: Niveles significativos más altos de interleuquina IL-1 β y Macrophage Colony Protein-1 (MCP-1) en pacientes con implantes y amalgamas (A+I) frente a portadores de amalgamas (A) y controles (Cont)



4.4 Cambios sobre los niveles de metales pesados en pacientes odontológicos con implantes de titanio y/o amalgamas.

Los pacientes con implantes y amalgamas dentales tienen niveles más altos de plata (Ag) que los portadores de amalgamas dentales ($p < 0.05$, tabla 2, Ag color azul). Sin embargo, los niveles de metales pesados característicos de las amalgamas, como mercurio (Hg), zinc (Zn^{++}) o cobre (Cu^{++}) no aumentan significativamente en (A+I) frente a aquellos únicamente con amalgamas dentales (A) ($p > 0.05$ en todos los casos analizados).

Previamente, hemos puesto de manifiesto un aumento significativo de niveles de zinc (Zn^{++}) en portadores de amalgamas dentales frente a controles ($p < 0,05$ Cabaña-Muñoz y cols., 2015a), por lo que se omiten los datos del control en la tabla 2 para evitar la duplicidad de datos previamente publicados (Cabaña-Muñoz y cols., 2015a).

Por otra parte, los niveles de metales característicos de la aleación de implantes de titanio, como aluminio (Al), vanadio (Va) y titanio (Ti), no aumentaron significativamente en el grupo (A+I), frente a sus respectivos portadores de amalgamas dentales ($p > 0,05$, n.s, en todos los casos analizados).

Además los niveles de titanio no difieren significativamente entre el grupo (A+I) y el grupo control (Cont, $p > 0,05$ n.s, dato no mostrado). Por su parte, el grupo con amalgamas replica nuestros hallazgos previos que muestran un aumento significativo de aluminio (Al) frente a control (Cabaña-Muñoz y cols., 2015a).

Finalmente, analizamos los metales característicos de las coronas como son cromo (Cr), cobalto (Co) y níquel (Ni). El análisis estadístico mostró un aumento significativo en el grupo (A+I), tanto de (Co) como de (Ni) en portadores de implantes dentales y amalgamas frente a los portadores de amalgamas dentales ($p < 0,05$, tabla 2 color azul). Sin embargo, los niveles de cromo (Cr) no difieren en ambos grupos experimentales ($p > 0,05$, tabla 2, figura 21).

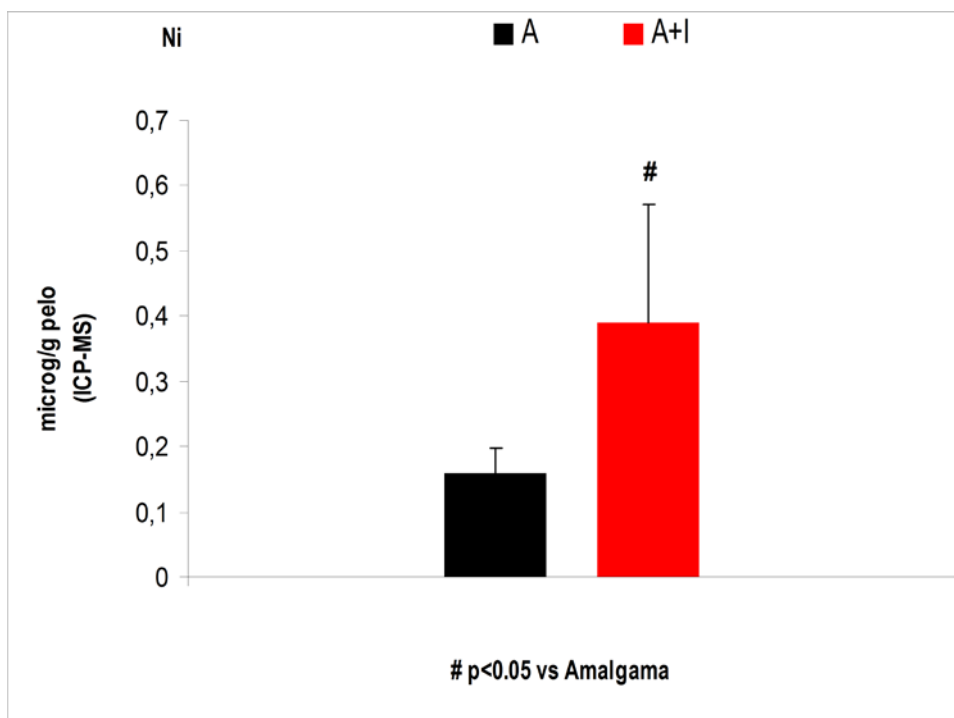
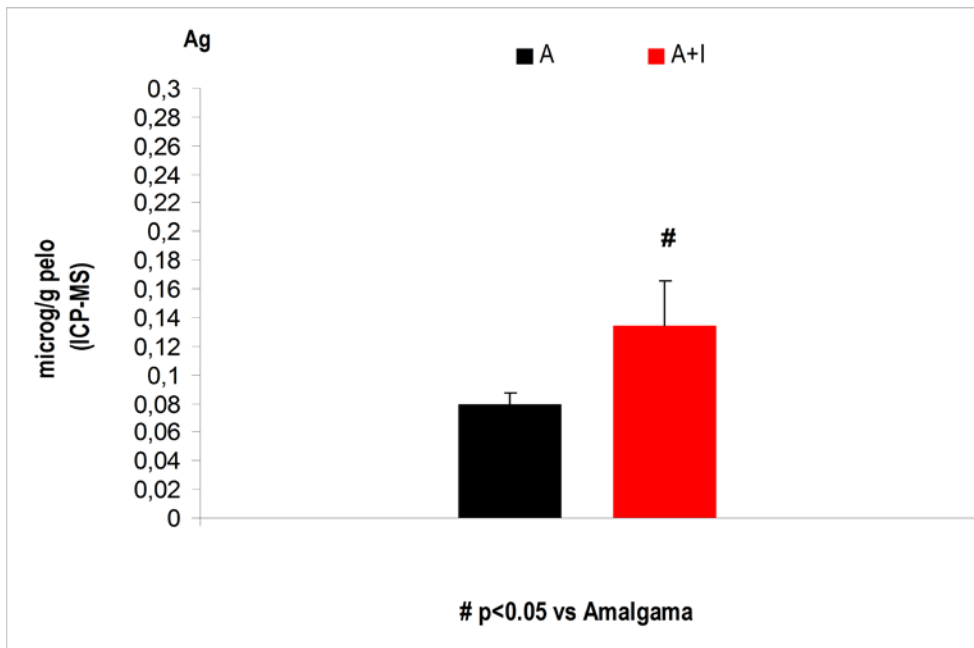


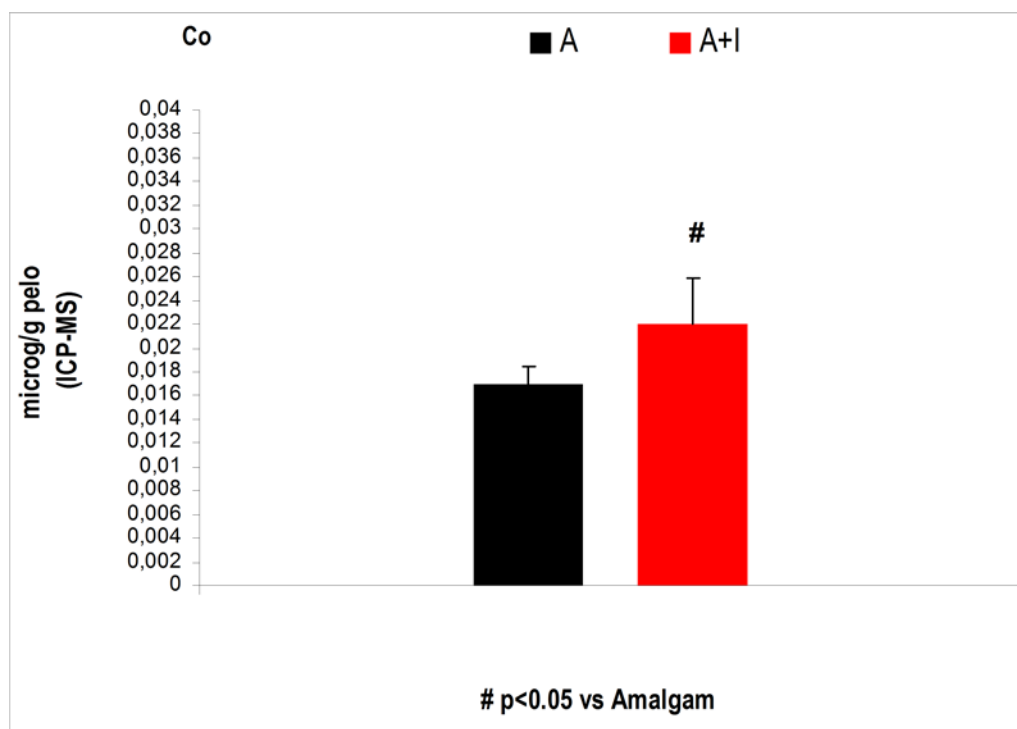
Tabla 2. Medias y error relativo de los niveles de metales pesados ($\mu\text{g/g}$ de pelo) en portadores de implantes dentales y amalgamas (A+I) frente a portadores únicamente de amalgamas dentales (A)

Metal ($\mu\text{g/g}$ pelo)	A	A+I	p
Hg	2,58 \pm 0,23	3,1 \pm 0,34	p>0,05; n.s
Ag	0,08 \pm 0,007	0,13 \pm 0,032 #	p<0,05
Sn	0,08 \pm 0,007	0,11 \pm 0,009	p>0,05; n.s
Cu ⁺⁺	0,31 \pm 0,004	0,42 \pm 0,05	p>0,05; n.s
Zn ⁺⁺	216 \pm 19,5	202 \pm 14,7	p>0,05; n.s
Implantes	A	A+I	P
Ti	0,46 \pm 0,062	0,5 \pm 0,077	p>0,05; n.s
Al	4,5 \pm 0,9	4,8 \pm 0,63	p>0,05; n.s
V	0,06 \pm 0,02	0,07 \pm 0,03	p>0,05; n.s
Mo	0,027 \pm 0,001	0,028 \pm 0,002	p>0,05; n.s
Coronas			
Ni	0,159 \pm 0,04	0,39 \pm 0,18#	p<0,05
Co	0,017 \pm 0,004	0,022 \pm 0,039#	p<0,05
Cr	0,32 \pm 0,015	0,33 \pm 0,01	p>0,05; n.s



Figura 21: Aumento significativo de plata (Ag), cobalto (Co) y níquel (Ni) en portadores de implantes de titanio y de amalgamas dentales frente a sus respectivos portadores de amalgamas





Dada la relevancia del oligoelemento selenio (Se) en el contexto de esta tesis Doctoral, hemos analizado sus niveles con metales como el mercurio (Hg), la plata (Ag) y el plomo (Pb) y sus ratios Se/Hg, Se/Ag y Se/Pb.

4.5 Selenio (Se)

Cabe destacar el efecto significativo observado sobre los niveles de selenio (Se) según el análisis ANOVA [F (1,72)=3.5; p=0.034]. El análisis post Hoc por Bonferroni muestra un descenso significativo entre los portadores de implantes dentales y amalgamas (A+I) y el grupo con amalgamas (A) (p<0.05). Sin embargo, los portadores únicamente de amalgamas dentales tienen niveles de selenio (Se) similares al grupo control (p>0.05; n.s, figura 22).

4.6 Relación entre los ratios de Selenio (Se), con plata (Ag), mercurio Hg) y plomo (Pb).

El análisis mediante Mann Withney indica un descenso significativo en pacientes con implantes y amalgamas de los ratios Se/Hg y Se/Ag frente a sus respectivos portadores de amalgamas dentales ($p < 0,05$). No se evidenció ningún efecto significativo entre los grupos para el ratio Se/Pb ($p < 0,05$, n.s figura 22 y 23).

Figura 22: Niveles más bajos de selenio (Se) y bajos ratios Se/Hg, Se/Ag en pacientes con implantes y amalgamas dentales (A+l) que los portadores de amalgamas dentales(A)

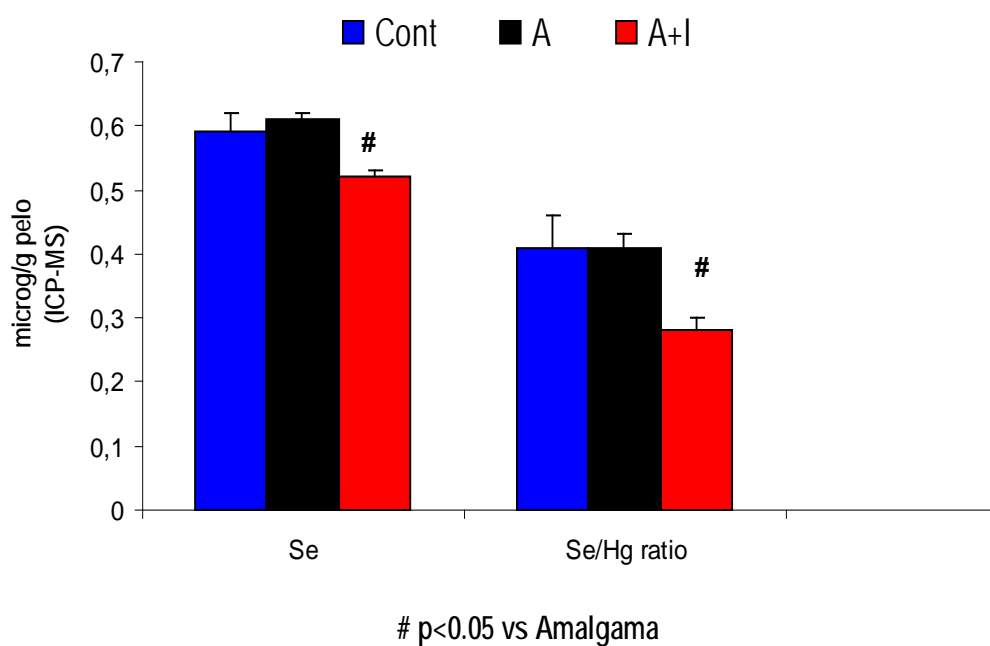




Figura 23: El ratio Se/Ag decrece en los pacientes con implantes de titanio y amalgamas dentales (A+I) frente a los portadores únicamente de amalgamas (A), sin efecto para el ratio Se/Pb.

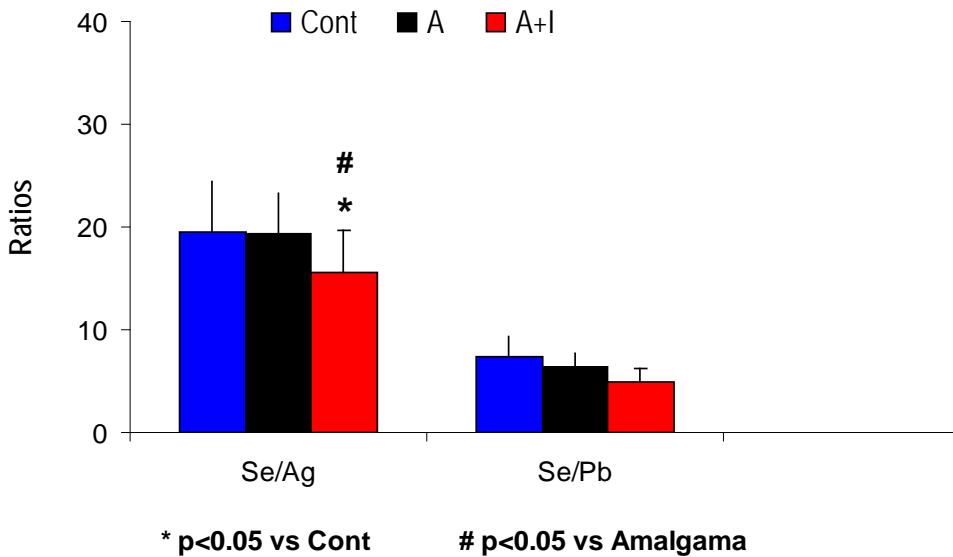


Figura 24: Correlaciones estadísticamente significativas entre metales pesados (Hg,Ag,Pb) y sus ratios Se/metal pesado por r de Spearman.

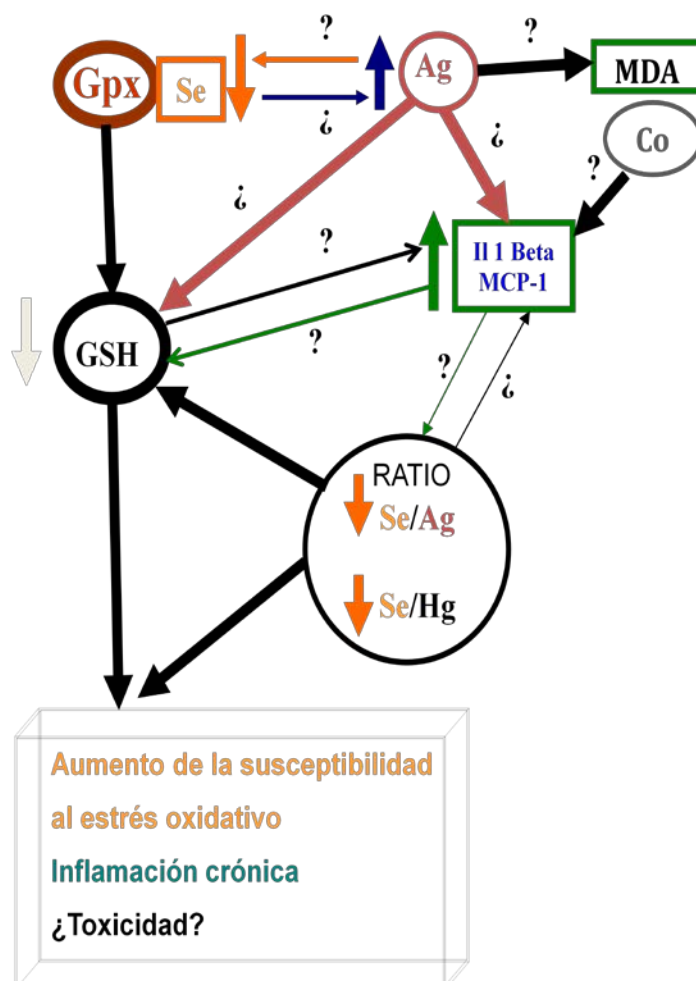
Se (A+I)* Ag (A+I); r= - 0,47; p=0,01
 Se (A+I)* Se/Ag (A+I); r= 0,48; p=0,001
 Hg (A+I)*Se/Hg (A+I); r= 0,74; p<0,001
 Hg (A+I)*Se/Ag (A+I) r= - 0,48; p=0,01
 Ag (A+I)*Se/Ag (A+I); r= - 0,48; p=0,01
 Ag (A) Se/Ag (A), r= - 0,5; p=0,02
 Ag (cont)*Se/Ag (cont); r= - 0,85; p<0,001
 Pb (A+I)*Se/Pb (A+I); r= - 0,74; p=0,001



Los ratios indicados evidencian importantes correlaciones entre los niveles de plata (Ag) y selenio y los ratios Se/Ag y Se/Hg en el grupo (A+I) (n=27) y también se muestran algunas correlaciones relevantes evidenciadas en el grupo de portadores de amalgamas (A). Figura 24.

Sin embargo, no puede establecerse una relación causa-efecto directa entre la depleción de selenio y las respuestas inflamatorias y/o el aumento de la susceptibilidad al estrés oxidativos evidenciado por los bajos niveles sistémicos de GSH y al aumento de lipoperóxidos en el grupo (A+I).

Figura 25: Posibles interrelaciones entre altos niveles de metales pesados (Ag,Co) y la susceptibilidad al estrés oxidativo y a la inflamación sistémica evidenciada en los portadores de implantes de titanio y amalgamas dentales (A+I)



El aumento de plata (Ag) por galvanismo y su migración a órganos distales podría aumentar la susceptibilidad al estrés oxidativo asociada al incremento de la peroxidación lipídica (MDA), y a la depleción de Glutati6n reducido (GSH). Como consecuencia, los niveles de citoquinas proinflamatorias sist6micas (IL-1 β y MCP-1) podrían aumentar en pacientes con implantes de titanio y amalgamas dentales frente a los portadores únicamente de amalgamas. Sin embargo, no podemos establecer una relación directa causa-efecto entre el aumento de plata (Ag) y la inflamación sist6mica detectada en los mismos, incluso a pesar de las correlaciones evidenciadas anteriormente.

4.7 Metales con implicaciones metabólicas

A continuación, se indican las medias de una serie de metales/oligoelementos medidos por ICP-MS en pelo de pacientes con implantes de titanio y amalgamas dentales (A+I) frente a portadores únicamente de amalgamas dentales (A) y controles (sin amalgamas y sin implantes dentales). El valor referenciado en las tablas como H corresponde al análisis de Kruskal Wallis. Tabla 3.

Tabla 3: Valores medios y error relativo de una serie de oligoelementos relacionados con funciones metabólicas medidos por ICP-MS en pelo

Olig. (µg/g pelo)	Control (Cont)	Amalgama (A)	Amalgama +Implante (A+I)	p
Ca⁺⁺	820±235	1259±247	1553±222 *	H=7.16, p=0.028
S	48088±426	47151±386	47684±286	H=3,83, p=0.14;n.s
B	0.59±0.09	0.91±0.1*	0.71±0,11	H=6.19, p=0.045
Sr	8.7±3.7	12±3.3	17±2.8 *	H=6.09, p=0.047
Mn⁺⁺	0.077±0.0068	0.076±0.0066	0.087±0.04	H=0.76, p=0.68, n.s
Fe⁺⁺	8±0.62	7.94±0.52	8.81±0.52	H=2.89, p=0.23, n.s
Ge	0.0285±0.0012	0.0285±0.00085	0.0291±0.00087	H=0.13, p=0.93, n.s
I	1.067±0.27	0.53±0.076	0.84±0.28	H=1.24, p=0.53, n.s
P	187±8.7	187.46±8.1	176.85±9.9	H=79, p=0.5, n.s

*p<0.05 vs Cont

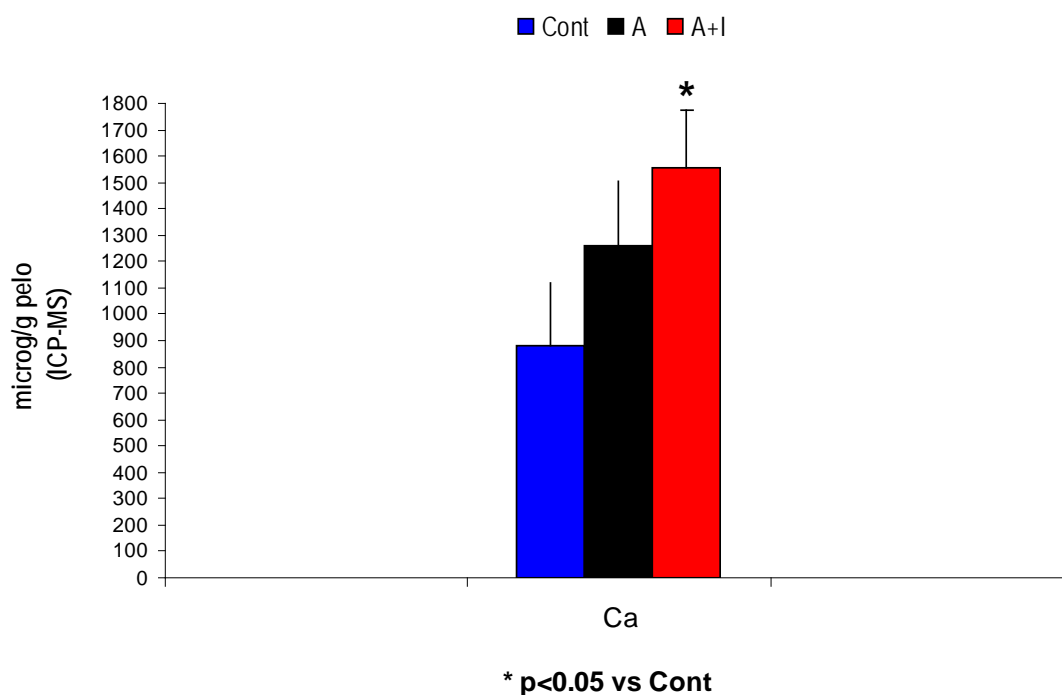
#p<0.05 vs Amalgama

4.7.1 Calcio (Ca⁺⁺)

El análisis de Kruskal Wallis indica un efecto significativo (H=7,16, p=0.028) para el calcio. El análisis post-Hoc indica que los pacientes con implantes y amalgamas (A+I) mostraban niveles de calcio (Ca⁺⁺) significativamente más elevados que los del grupo control (sin amalgamas y sin implantes) (p<0.05).
Tabla 3.

Por otro lado, el grupo (A+I) tiende a incrementar sus niveles (Ca^{++}) frente a los portadores únicamente de amalgamas dentales (A) ($p=0.12$, n.s). El grupo con amalgamas dentales (A) tiende a incrementar sus niveles frente al control (Cont).
 Figura 26

Figura 26: Niveles de calcio (Ca^{++}) significativamente más elevados en pacientes con implantes y amalgamas dentales (A+I) frente a los controles (Cont)



4.7.2 Azufre (S)

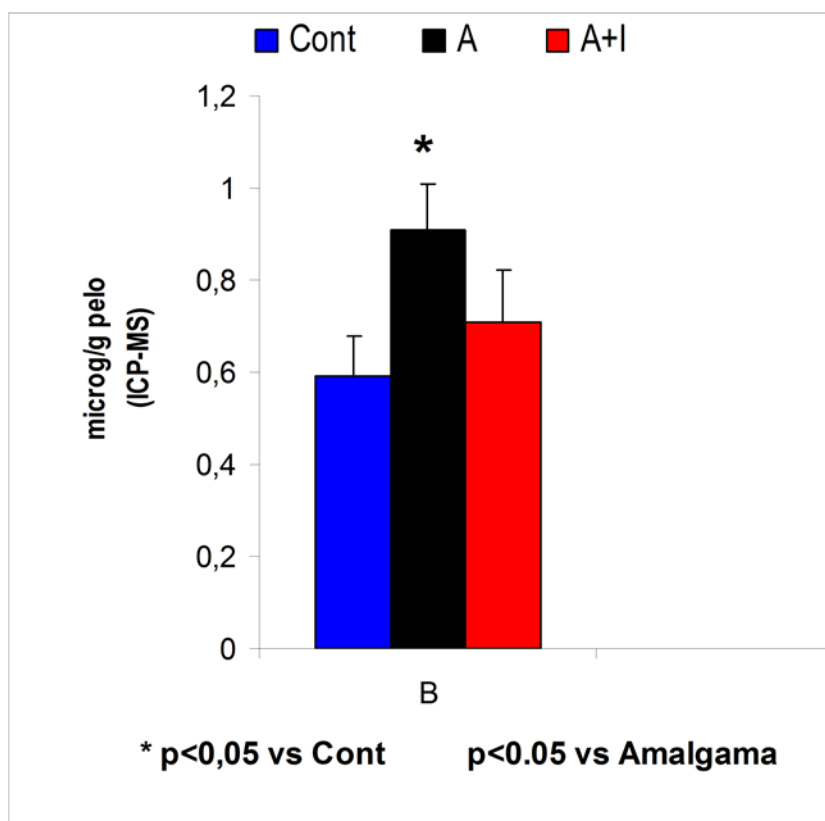
No se observó un efecto significativo para el azufre ($H=3,83$, $p=0,14$, n.s). El análisis por Mann Whitney únicamente identifica una tendencia a la significación estadística entre el grupo (A+I) versus (A) ($p=0,11$, n.s), y no se observó ningún efecto para el resto de los casos analizados ($p > 0,05$, n.s).

4.7.3 Boro

El análisis por Kruskal Wallis evidencia un efecto significativo sobre los niveles de boro (B) ($H=6.19$, $p=0.045$). El análisis post Hoc mediante Mann Whitney muestra un incremento significativo de los niveles de boro en los portadores de amalgamas dentales ($p<0.05$).Figura 27.

Además, el grupo (A+I) muestra una alta tendencia a reducir sus niveles de boro frente al grupo (A) ($p=0.056$,n.s).

Figura 27: Aumentos significativos de boro (B) en los pacientes únicamente con amalgamas dentales (A) frente al grupo control (Cont)



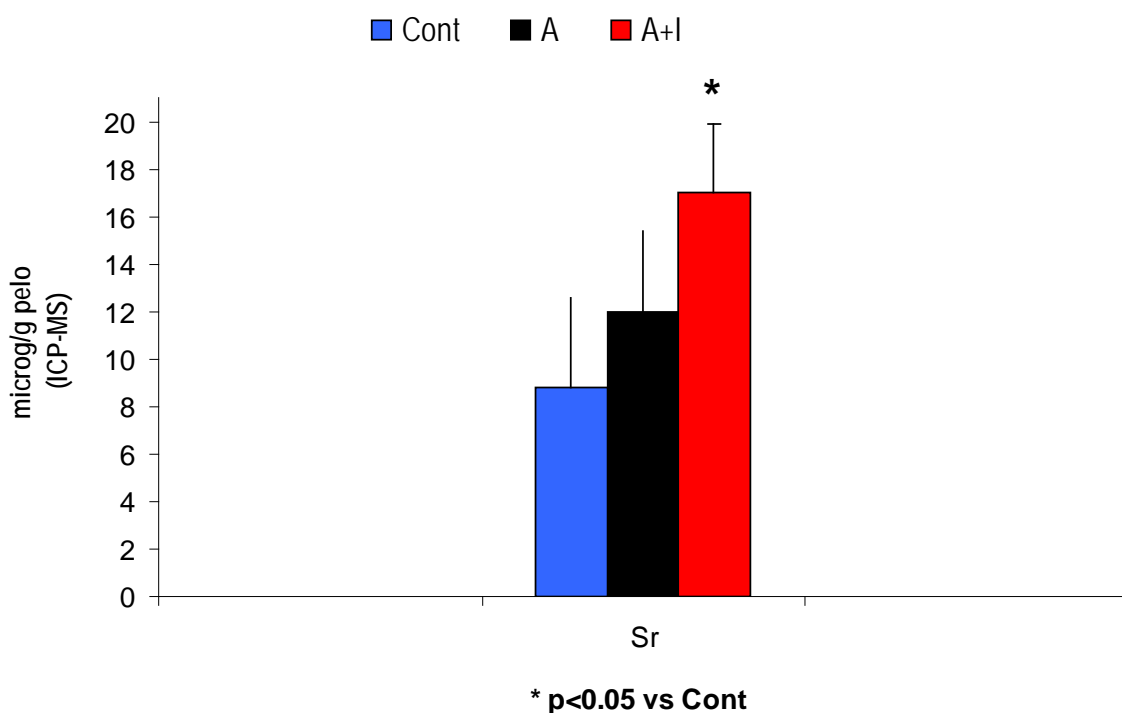


4.7.5 Estroncio (Sr)

Se evidencia un efecto significativo sobre sus niveles ($H=6.096$, $p=0.047$) mediante análisis de Kruskal Wallis (tabla 3).

Los análisis post-Hoc por Mann Whitney muestran que los pacientes con implantes de titanio y amalgamas dentales tienen niveles significativamente más elevados que los controles ($p<0.05$). Además, existe una tendencia a aumentar sus niveles en los portadores de amalgamas dentales frente a los controles ($p=0.11$; n.s). Figura 28.

Figura 28: Niveles de estroncio (Sr) significativamente más elevados en pacientes con implantes y amalgamas dentales (A+I) frente a controles (Cont)



4.8 Metales y oligoelementos implicados en funciones psicológicas

La tabla 4 indica las medias y el error estándar (S.E-M del inglés) de una serie de oligoelementos medidos en pelo por ICP-MS relacionados con funciones psicológicas o emocionales.

Tabla 4: Efectos sobre los niveles de litio (Li), rubidio (Rb), sodio (Na⁺), potasio (K⁺) y magnesio (Mg⁺⁺)

Metal (µg/g pelo)	Control (Cont)	Amalgama (A)	Implante+ Amalgama (A+I)	H
Li	0,011±0,0014	0.010±0,0016	0,0056±0,002 * #	H=6,22, p=0,044
Rb	0,034±0,012	0,051±0,019	0,0285±0,01 #	H=6, p=0,05
Na⁺	115,9±75,9	91±21,7	231±69,6 * #	H=10, p=0,007
Mg⁺⁺	134±49	142±30	245±36 * #	H=11,6, p=0,03
K⁺	28,7±12	33±12,1	65,6±17.2 *	H=5, p=0,082; n.s

*p<0.05 vs Cont

#p<0.05 vs Amalgama

4.8.1 Litio (Li)

El análisis de Kruskal Wallis muestra un efecto significativo sobre los niveles de litio (H=6,22, p=0,044). De hecho, el grupo de pacientes con implantes de titanio y amalgamas dentales tiene niveles de litio (Li) significativamente más bajos que los controles y los portadores de amalgamas (p<0.05, en ambos casos, tabla 4)

Sin embargo, no se observó un efecto significativo entre pacientes con amalgamas dentales frente a los controles (p>0,05, n.s, figura 29).

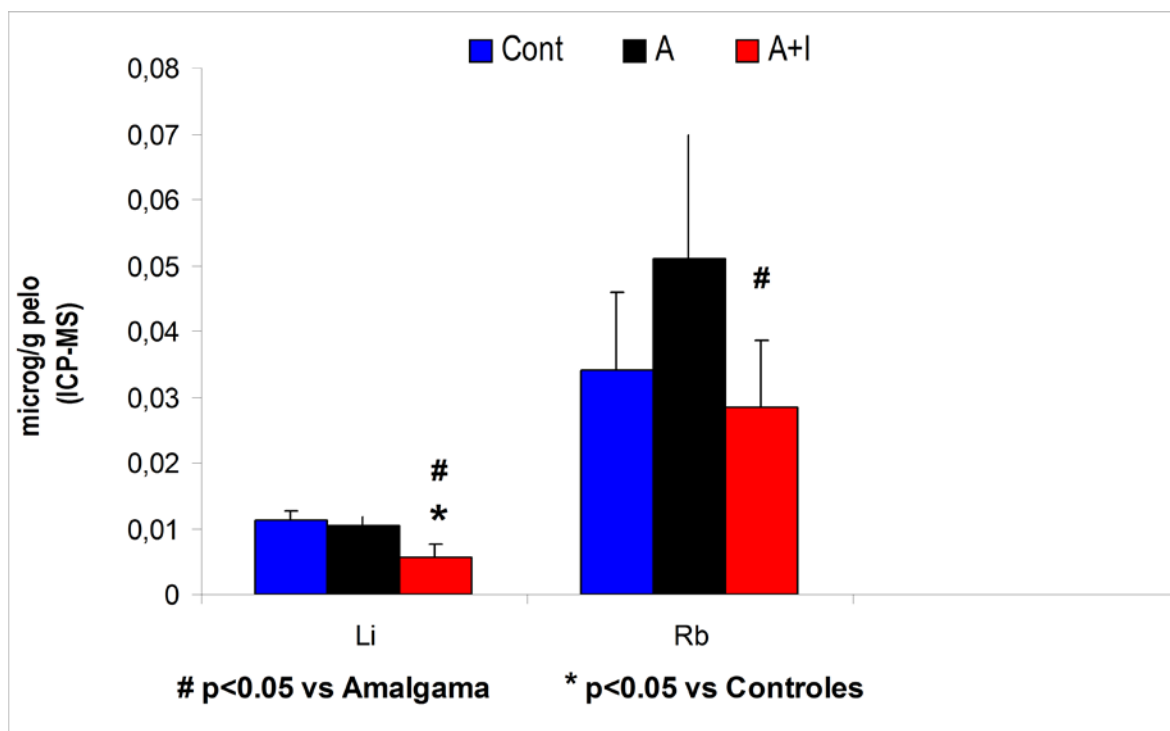


4.8.2 Rubidio (Rb)

El análisis de Kruskal Wallis muestra un efecto significativo para el rubidio (Rb) ($H=6.06$, $p=0.05$). El análisis de Mann Whitney indica una depleción significativa de los niveles de Rb en los pacientes con implantes y amalgamas dentales frente a los portadores de amalgamas ($p<0.05$).

Por otro lado, se evidencia una tendencia a la significación estadística entre los portadores de amalgamas dentales y los controles (sin implantes y sin amalgamas, ($p=0.06$; n.s, figura 29).

Figura 29: Niveles de litio (Li) y de rubidio (Rb) significativamente más bajos en pacientes con implantes y amalgamas dentales frente a sus respectivos portadores de amalgamas dentales.



4.8.3 Sodio (Na^+)

El análisis de Kruskal Wallis indica un efecto significativo para el sodio ($H=10, p=0,007$). El análisis mediante múltiples comparaciones por el test de Dunn's revela un aumento significativo en el grupo (A+I), tanto a los portadores de amalgamas (A) ($p<0,05$) y control ($p<0,05$), respectivamente. Figura 30.

Especialmente reseñable es la reducción significativa de sus niveles en pacientes con implantes dentales y amalgamas frente aquellos con amalgamas dentales ($p<0.05$). Figura 30.

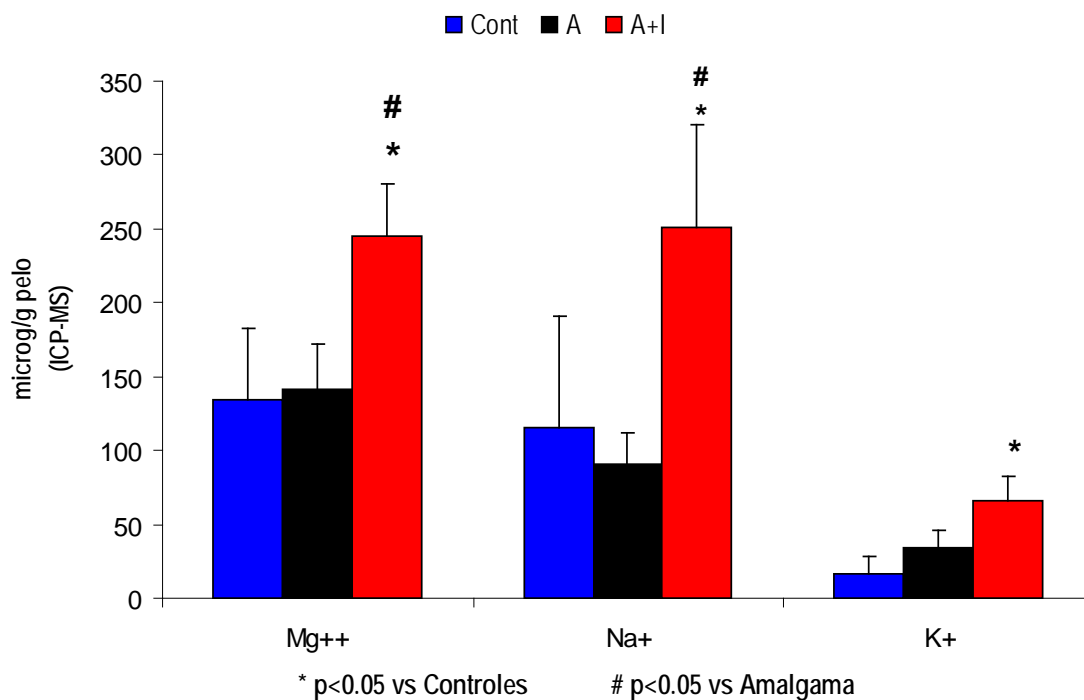
4.8.4 Magnesio (Mg^{++})

El análisis de Kruskal Wallis indica un efecto significativo sobre los niveles del mineral magnesio (Mg^{++}) en pelo ($H=11.6, p=0.03$). Los portadores de implantes y amalgamas aumentan significativamente sus niveles frente al grupo de amalgamas ($p=0,048$), y al grupo control, respectivamente (sin empastes y sin implante, $p<0.05$). Figura 30.

4.8.5 Potasio (K^+)

El análisis de Kruskal-Wallis muestra una tendencia a la significación estadística para el potasio (K^+) ($H=5, p=0.082$; n.s). Mediante análisis de Mann Whitney se observan niveles significativamente más altos en los pacientes con implantes dentales y amalgamas (A+I), frente a los controles (sin amalgamas y sin implantes, $p<0.05$). También se detecta una tendencia a incrementar sus niveles en los pacientes con implantes de titanio y amalgamas frente a los portadores de amalgamas dentales (A+I) vs (A) ($p=0,14$; n.s, figura 30).

Figura 30: Niveles significativamente de magnesio (Mg^{++}) y de sodio (Na^+) en pacientes con implantes y amalgamas (A+I) frente a portadores de amalgamas (A).



4.9 Metales de exposición ambiental

Tabla 5: Medias relativas a los niveles de metales pesados de exposición ambiental ($\mu\text{g/g}$ de pelo) en portadores de implantes dentales y amalgamas (A+I) y portadores de amalgamas dentales (A)

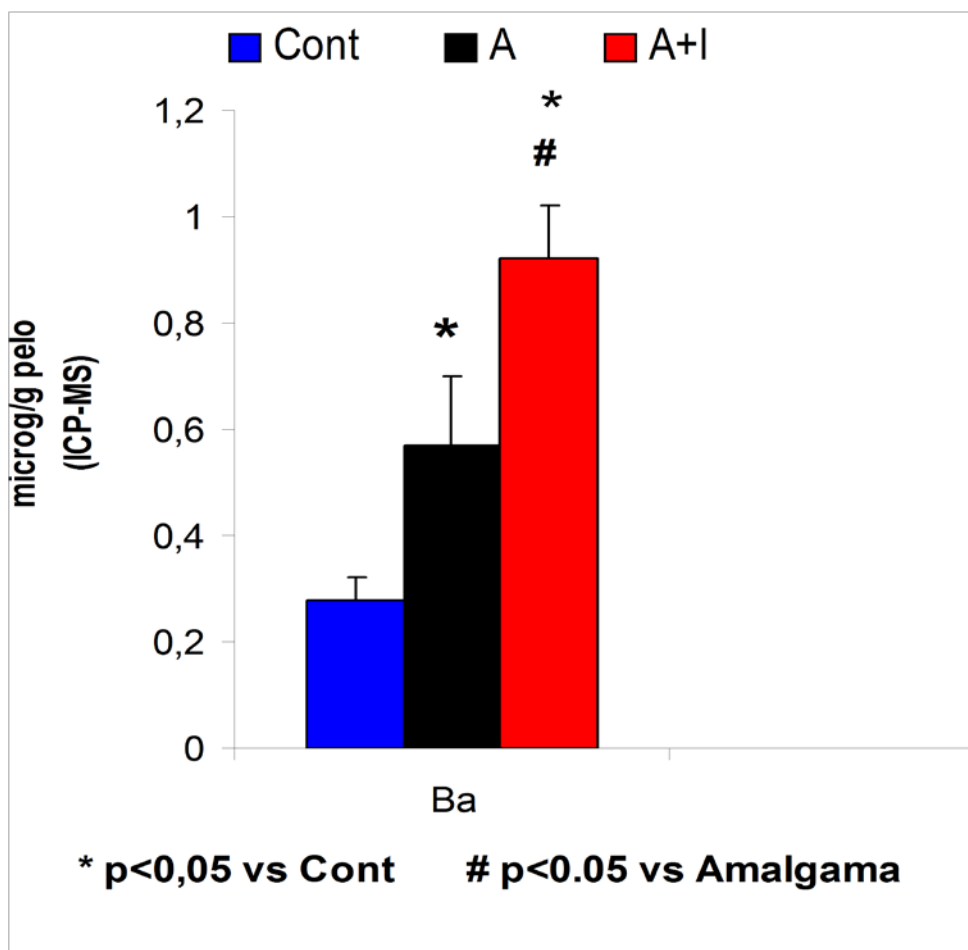
Metal ($\mu\text{g/g}$ pelo).	Control (Cont)	Amalgama (A)	Amalgama +Implante (A+I)		p
				H (KW)	
Ba	0,28±0,04	0,57±0,13*	0,92±0,13#	H=15,77	p<0,05
Pb	0,2±0,066	0,29±0,063	0,7±0,23	H=2,97	p=0,22; n.s
Cd	0,013±0,0026	0,01±0,005	0,03±0,02	H=3,43	p=0,18; n.s
Sb	0,01 ±0,0047	0,016±0,0029	0,013±0,0011	H=0,83	p=0,65; n.s
As	0,031±0,0033	0,033±0,0037	0,028±0,003	H=1,68	p=0,43; n.s
Pt	0,06 ±0,0098	0,074±0,0087	0,072±0,002		n.s
Ti	0,0010±0,0007	0,0011±0,0005	0,0011±0,0008		n.s
Th	0,0011 ±0,005	0,0010±0,0088	0,0010±0,006		n.s
U	0,001±0,0006	0,0012±0,0009	0,0011±0,0007		n.s

4.9.1 Bario (Ba)

El análisis de Kruskal Wallis mostró un efecto significativo (Ba) ($H=15.77$, $p=0.001$). Mediante Mann Whitney se evidenció un aumento significativo en ambos grupos experimentales con implantes y/o amalgamas en comparación al grupo control, respectivamente ($p<0.05$).Tabla 5.

Por otra parte, los pacientes con implantes de titanio y amalgamas muestran niveles significativamente más elevados que los portadores de amalgamas ($p<0.05$). Figura 31.

Figura 31: Niveles significativamente más altos de bario (Ba) en pacientes con implantes y amalgamas (A+) frente a portadores de amalgamas (A) y controles (Cont)



4.9.2 Plomo (Pb) y Cadmio (Cd)

El análisis de Kruskal Wallis no muestra un efecto significativo sobre los niveles de plomo (Pb) ($H=2.97$, $p=0.22$; n.s). Se observó una alta tendencia al aumento de plomo en los portadores de implantes y amalgamas frente a aquellos con amalgamas dentales ($p=0.11$; n.s).

Aunque no se evidencia un efecto significativo para el cadmio (Cd) en Kruskal Wallis ($H=3,43$, $p=0,18$, n.s) ($p>0.05$), los pacientes con implantes y amalgamas (A+I) tienen niveles más elevados que sus portadores con amalgamas (A), sin alcanzar la significación estadística. ($p=0.064$, n.s).

Finalmente, no se detectan diferencias estadísticamente significativas para otros elementos analizados (Mn^{++} , Fe^{++} , Ge, I, P, Sb, As, Pt, As, Sb, P, Tl, Th, U, $p>0.05$, n.s), cuyas medias y errores relativos se indican en las tablas 4 y 5.



DISCUSIÓN

5 DISCUSIÓN

Altos niveles de plata (Ag), de cobalto (Co) y de níquel (Ni) en pacientes con implantes de titanio y amalgamas dentales frente a los portadores únicamente de amalgamas dentales

Hemos incluido pacientes con implantes y/o amalgamas dentales en boca durante al menos 10 años, ya que los efectos detrimentales de las amalgamas dentales se caracterizan por un periodo mínimo de 7 a 10 años (Bellinger y cols., 2006; Jones y cols., 2007).

Factores como la estabilidad, el estrés mecánico y el propio galvanismo podrían influenciar la liberación de iones metálicos en boca (Soussa y cols., 2013; Barret y cols., 1993; Bishara y cols., 1993). En éste sentido, destacamos los incrementos significativos de cobalto (Co) y de níquel (Ni), ambos presentes en las coronas dentales, y el aumento de plata (Ag) de las amalgamas dentales en pacientes con implantes de titanio (A+I) frente a portadores de amalgamas (A). Sin embargo no se detectaron diferencias significativos para los niveles de Hg y aluminio en pacientes (A+I) en relación a (A). Estos resultados están de acuerdo con la ausencia de incrementos observadas para el mercurio (Hg) en saliva de pacientes odontológicos, también medidos por espectrometría de masas (Camacho-Alonso y cols., 2015).

La superficie del implante dental de titanio y sus aleaciones podrían aumentar la reactividad y la liberación de iones metálicos (Bishara y cols., 1993, Hanawa y cols., 2004; Meling y Odegaard., 2001). Además, puede existir migración de metales pesados a órganos distales (Olmedo y cols. 2003; Martin, 2004). En nuestro estudio únicamente aumentaban significativamente los niveles de plata (Ag), lo que sugiere que existe galvanismo en aquellos portadores de implantes dentales próximos a las restauraciones de amalgamas dentales según nuestros hallazgos. De hecho, observamos incrementos significativos tanto de los

niveles de mercurio (Hg) como de aluminio (Al) en los portadores de (A+I) frente a sus respectivos controles (datos no mostrados).

Además, no se detectaron cambios significativos por este método de análisis, relativos a los componentes de la aleación del implante de titanio (Ti, Al o V), ni tampoco en los niveles de molibdeno (Mo), lo que en principio apoya la estabilidad de la aleación Ti-6Al-4V del implante de titanio (Astrand y cols., 2008; Kim y cols., 2008).

En nuestro estudio, la tasa de fallo de los implantes a lo largo de los años posteriores es nula. Éste hecho, está en concordancia con la ausencia de cambios significativos detectados sobre los niveles de titanio en 67 pacientes con artroplastia (Omlor y cols., 2013), en consonancia con la ausencia de efectos significativos en los niveles de titanio observados en nuestro estudio. Aun cuando, no podemos comparar la liberación de titanio (Ti) en cadera/rodilla, con la del implante dental debido a su mayor superficie de contacto, no se observaron diferencias significativas en nuestro estudio y relatado sobre los niveles de Ti.

Los pacientes odontológicos del presente estudio tienen implantes dentales y portan también amalgamas dentales, con sus característicos metales; por ello, podrían estar expuesto a procesos de galvanismo por la interacción entre metales pesados en boca (Agaoglu y cols., 2001; Lim y cols., 2003; Zaffe y cols., 2003). Por otro lado, las coronas cerámicas y metálicas representan el 75% de las coronas utilizadas en odontología (Bertolotti, 1984; Roberts y cols., 2009). Los niveles de metales de las coronas como níquel (Ni) y cobalto (Co), incrementan significativamente en el grupo (A+I) frente al grupo (A), sin alcanzar límites de toxicidad. De hecho, son raros los casos de alergia por níquel en odontología (Thomas y Summer, 2015). Otros autores manifiestan que el níquel (Ni) dentro de la aleación, es el más común a la sensibilidad de Tipo IV, dado que provoca una dermatitis alérgica al metal (Geis-Gerstorfer y cols., 1993).

Además, no se observaron diferencias estadísticamente significativas para el cromo (Cr). El aumento tanto de cobalto (Co) como de níquel (Ni) observado en

pelo, están de acuerdo con el aumento detectado en saliva de pacientes por ICP-MS (Camacho-Alonso y cols., 2015).

El mercurio (Hg) representa el 50% y la plata (Ag) el 41% en peso de la amalgama dental (Shraim y cols., 2011, Bjorkman y cols., 2007).

Previamente, hemos puesto de manifiesto que mujeres con amalgamas dentales aumentan significativamente sus niveles de mercurio (Hg), aluminio (Al), bario (Ba) y plata (Ag) frente a sus respectivos controles (sin amalgamas y sin implantes dentales) (Cabaña-Muñoz y cols., 2015 a). Sin embargo, ni el mercurio, ni los componentes del implante de titanio o de las amalgamas (Zn^{++} , Cu^{++} , Sn) aumentaban significativamente en pacientes con implantes y amalgamas dentales (A+I) frente a los de amalgamas (A) en nuestro estudio, a pesar de la ya reconocida toxicidad del mercurio procedente de las amalgamas dentales en varios estudios (Zwicker y cols., 2014; Bjorkman y cols., 2007; Richardson y cols., 2011; Barcelos y cols., 2013; Stejskal y cols., 2013; Chen y cols., 2014; Varkey y cols., 2014). Tampoco se detectaron cambios significativos para otros metales de la aleación (Ti-6Al-4V) en pacientes con implantes de titanio y amalgamas (A+I) frente a los portadores de amalgama dentales (A).

Dado que los niveles de mercurio en orina reflejan más bien la exposición aguda a metales pesados y desestiman la retención de mercurio en los órganos internos (Pigatto y cols., 2013), decidimos medir ésta serie de metales pesados y/o oligoelementos por espectrometría de masas ICP-MS en pelo (Puchyr y cols., 1998).

De hecho, las determinaciones de mercurio en pelo son fiables y replicables tal como confirman varios estudios epidemiológicos (Jones y cols., 2007; Fakour y cols., 2010; Barghi y cols., 2012; Okati y cols., 2012).

En efecto, existe una correlación directa entre niveles de mercurio en pelo y en sangre (Somers y cols., 2015). Por ejemplo, el análisis del mineralograma en pelo para el mineral Mg^{++} es más fiable que en sangre, debido a que sus niveles están dentro de la normalidad en sangre, pero sí, refleja su deficiencia en las células y en los tejidos (Mutter, 2011).

En este sentido, el estudio clínico de Somers y colaboradores demuestra por ICP-MS en pelo, que existe una correlación altamente significativa entre niveles de mercurio en pelo (pero no de mercurio en orina) y los niveles sistémicos del antígeno nuclear ANA (marcador de Lupus Eritematoso Sistémico) en mujeres de edad reproductiva (USA-NHANES estudio; n=1352) (Somers y cols., 2015).

Sin embargo, el hecho de que no aumenten los niveles de mercurio en pacientes con implantes de titanio, no excluye que pueda retenerse en órganos como el riñón (Al-Saleh y cols., 2012), o acumularse en cerebro (Barcelos y cols., 2013; Custodio y cols., 2005; Park y Zheng, 2012).

No obstante, esta posibilidad no puede valorarse por meras cuestiones éticas que impiden la realización de biopsia en nuestro estudio; debemos destacar que el aumento sistémico de malonaldehído (MDA: índice directo de peroxidación lipídica) y de mediadores inflamatorios en los portadores de implantes de titanio y amalgamas dentales, sugieren la existencia de un mayor estrés metabólico y la existencia de capacidad de detoxificación endógena defectiva.

Los niveles sistémicos reducidos de glutatión (GSH: forma reducida) y descenso de los ratios de Se/Hg y Se/Ag, podrían aumentar los niveles de lipoperóxidos y de citoquinas proinflamatorias en pacientes portadores de amalgamas dentales e implantes de titanio con altos niveles de plata (Ag)

El selenio (Se) es un oligoelemento necesario para la actividad enzimática de la Glutatión peroxidasa (Gpx) (Xiao y cols., 2016). Como los niveles de selenio (Se) decrecen de forma significativa en pacientes con amalgamas dentales e implantes de titanio (Ti) frente a los de amalgamas, sugerimos que podrían tener respuestas antioxidantes endógenas defectivas. Desde esta perspectiva, pacientes con amalgamas dentales (A), tienen niveles adecuados tanto de selenio (Se) como de Glutatión sistémico (forma reducida); de hecho hemos puesto de

manifiesto que mujeres con amalgamas dentales evidencian una alta actividad de la SOD-1 y aumento significativo de Glutación (forma reducida) como respuesta antioxidante adaptativa para paliar los efectos perniciosos asociados a la liberación crónica de los metales pesados (Cabaña-Muñoz y cols., 2015 a). La plata liberada por galvanismo en pacientes con amalgamas dentales e implantes podría alcanzar órganos distales y promover efectos tóxicos (Olmedo y cols., 2003, Martín y cols., 2004).

Por tanto, los bajos niveles de selenio (Se) detectados en los pacientes con implantes y amalgamas dentales, podrían conducir a unos mecanismos endógenos antioxidantes defectivos; posiblemente el incremento de los niveles de plata (Ag) detectado en el grupo (A+I) podría inducir un aumento tanto de los niveles de lipoperóxidos como de citoquinas sistémicas en dichos pacientes. De hecho, el selenito sódico reduce la toxicidad de nanopartículas de plata (NPs Ag) "in vitro" (Ma y cols., 2015).

Por tanto, no podemos excluir que los bajos niveles de selenio del grupo (A+I) reflejen una menor capacidad endógena de eliminación de ciertos metales pesados (Ag o Pb). Finalmente, no podemos establecer una relación causa-efecto directa entre altos niveles de plata y unos bajos niveles de selenio, incluso a pesar de las altas correlaciones entre los ratios Se/Hg y Se/Ag con los niveles de selenio y de ambos metales pesados (Hg, Ag).

Aumento de la susceptibilidad al estrés oxidativo en pacientes con implantes dentales y amalgamas

Los niveles bajos de Glutación reducido (GSH) detectados en pacientes con implantes dentales y amalgamas (A+I) podrían explicarse por los bajos niveles de selenio (Se) detectados frente a los portadores de amalgamas dentales (A).

Este hecho, sugiere que existe un mayor estrés metabólico en dichos pacientes y una inflamación sistémica crónica exacerbada. Consecuentemente, los bajos niveles de GSH sistémicos y el aumento de lipoperóxidos sistémicos

aumentaría la susceptibilidad al estrés oxidativo en pacientes con altos niveles de plata (A+I).

Como los ratios Se/Hg y Se/Ag decrecen significativamente en el grupo (A+I) frente a los portadores de amalgamas dentales (A), sugerimos que los bajos niveles de selenio (Se) de los pacientes del grupo (A+I) podrían conducir tanto a un aumento de los Malonaldehido (TBARS) como de las citoquinas proinflamatorias sistémicas (IL-1 β y MCP-1), quizás también por los altos niveles de plata (Ag) observados.

Consecuentemente, la acumulación de plata podría conducir a un estrés oxidativo exacerbado debido a los bajos niveles de selenio (Se) evidenciados en el grupo (A+I) frente a aquellos con amalgamas dentales (A).

Por su parte, el selenio (Se) se requiere para la correcta eliminación de metales pesados por conjugación con Glutación (Stockler-Pinto y cols., 2015). De hecho, recientemente hemos puesto de manifiesto que la suplementación con selenio (Se) en la dieta y los precursores aminoacídicos, aumentan los niveles sistémicos de Glutación reducido (GSH) y reduce ostensiblemente los niveles de aluminio (Al), medidos en pelo de pacientes odontológicos por espectrometría de masas (Merino y cols., 2017). No obstante, también puede inactivarse el mercurio mediante la formación de seleniomercuriales, independientemente de los niveles de Glutación reducido (GSH) (Lytikanen y cols., 2015).

Aunque la formación de selenoproteínas quizás sólo podría detectarse en una biopsia, no excluimos que pudiera acumularse en tejidos grasos en forma de selenoproteínas, lo que justificaría los bajos niveles de selenio observados en aquellos pacientes con amalgamas e implantes dentales.

De hecho, El-Ansary y colaboradores recientemente, evidenciaron bajos ratios de Se/Hg en niños autistas, en pelo medidos por ICP-MS (El-Ansary y cols., 2017). Por ello, sugerimos que los bajos ratios de Se/Hg y Se/Ag detectados podrían reflejar alteraciones metabólicas y una mayor susceptibilidad al estrés oxidativo en el grupo (A+I) frente al grupo (A).

Además, la suplementación con selenio en la dieta conduce a la activación de sistemas antioxidantes endógenos con capacidad detoxificante para eliminar metales pesados (Stockler-Pinto y cols., 2015). Como el selenio no disminuye en los portadores de amalgamas dentales frente a sus controles, sugerimos que la excreción de selenio (Se), tampoco diferencia entre aquellos pacientes con y sin sintomatología por contaminación de mercurio procedente de las amalgamas dentales (Hol y cols., 2002).

Los bajos niveles de selenio (Se) detectados en los pacientes con (A+I) del presente estudio están de acuerdo con el aumento detectado en sangre de ciertos metales pesados en pájaros de la región de Murcia (Espin y cols., 2014). Los niveles de plata (Ag) y de selenio (Se) son antagónicos, por lo que no excluimos que su depleción cause la acumulación de otros metales pesados plomo (Pb). Si existen bajos niveles de selenio, se reduce la capacidad del selenio (Se) para conjugarse con el Glutati6n reducido (GSH) y se eliminaría menos cantidad de metal pesado (Ag o Pb) en el grupo (A+I). Éste hecho podría explicar el aumento de la inflamaci6n y de los niveles de lipoper6xidos detectados en el grupo (A+I) en comparaci6n al grupo de amalgamas dentales (A).

De hecho, los pacientes con implantes dentales y amalgamas (A+I) evidencian un aumento casi significativo de los niveles de metales de exposici6n ambiental como cadmio (Cd) o plomo (Pb). En principio, éste inquietante incremento (Cd, Pb) no se justifica por la liberaci6n del titanio en los portadores de implantes y amalgamas dentales, ya que metales constituyentes de la aleaci6n del implante de titanio no afectan sus niveles (Ti-6Al-4V).

Por otro lado, dado que el incremento de plomo (Pb) conduce a un aumento de la peroxidaci6n lipídica y tambi6n decrece la actividad SOD-1 (Eck, 1982), nuestros datos sugieren que el incremento de plomo (Pb) podría aumentar la peroxidaci6n lipídica (MDA) en los portadores de implantes dentales (A+I) frente al grupo con amalgamas (A).

Finalmente, el aumento de los niveles de bario (Ba) en dicho grupo (A+I), está de acuerdo con el incremento del bario (Ba) en dentistas en el ambiente del área de trabajo del gabinete dental (Khwaja y Abbasi, 2014).

A continuación, describimos los efectos de la inflamación medida por citoquinas proinflamatorias (IL-1 β e MCP-1) y el estrés metabólico asociado a cambios significativos de los niveles de oligoelementos como el Li, Rb, Na⁺, K⁺, Mg⁺⁺ y B. De hecho, existe una relación directa entre deficiencia de selenio y un aumento de la citocina proinflamatoria IL-6 (Prystupa y cols., 2017).

Aumento de la inflamación sistémica (IL-1 β y MCP-1) en pacientes con implantes de titanio y amalgamas dentales

Aunque los niveles de titanio (Ti) observados, no difieren significativamente entre los portadores de implantes y amalgamas dentales (A+I) y el grupo de amalgama (A), varios estudios describen un aumento de la liberación de citoquinas proinflamatorias en macrófagos y otros tipos celulares expuestos a partículas de titanio "in vitro" (Vallés y cols., 2006; Lai y cols., 2008).

En nuestro estudio, los niveles de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β y la citoquina quimiotáctica, MCP-1) incrementan en (A+I) versus (A). Estudios prospectivos muestran que polimorfismos para IL-1 β predicen el fallo de los implantes dentales (Jacobi-Gresser y cols., 2013).

Recientemente, se han descrito respuestas proinflamatorias en células endoteliales "in vitro" por aumento de interleuquina L-6 vía TLR-4 (Toll Like Receptor-4 del inglés), como consecuencia de la liberación de cobalto (Co⁺⁺) (Anjum y cols., 2016). El aumento de IL-1 β sistémico no es consecuencia de la liberación de titanio (Ti) en los portadores de implantes y amalgamas dentales y parece estar más asociado a la liberación de plata (Ag) procedente de las amalgamas dentales, o de cobalto (Co) de las coronas de prótesis, por galvanismo en los pacientes con implantes dentales. En este sentido, Lim y colaboradores han puesto de manifiesto que existe liberación de iones

procedentes de la amalgama dental en contacto con titanio cuando se sumerge en una solución de cloruro sódico al 0,9% a 37°C, siendo la superficie del área asociada al ratio Ti/amalgama de 1/10 1/1 o 10/1 (Lim y cols., 2003).

Por otro lado, un reciente estudio indica que los niveles de IL-1 β y TNF- α incrementan significativamente en los pacientes con implantes de zirconio en comparación a sus niveles detectados en diente (Cionca y cols., 2016). El aumento de los niveles de IL-1 β evidenciado en pacientes con (A+I) está en concordancia con un reciente estudio in vitro, en macrófagos derivados de hueso primario (BMDM) tratados con el inductor de inflamación denominado lipopolisacárido (LPS, 0,01 μ g/ml) y/o titanio (Eger y cols., 2017).

Por otra parte, los niveles de IL-1 β y MCP-1 no difieren significativamente entre portadores de amalgamas dentales y controles (sin amalgama y sin implantes dentales). Este hecho sugiere que la inflamación solo se produce en portadores de implantes y amalgamas frente a amalgamas únicamente, probablemente por la liberación de iones metálicos (Ag y/o Co) a órganos distales (Olmedo y cols., 2003, 2008), dado el aumento evidenciado para ambos metales en el presente estudio.

El aumento de la respuesta inflamatoria sistémica en portadores de amalgamas dentales e implantes del presente estudio, está de acuerdo con el incremento de IL-1 β detectado en células neurales expuestas a nano partículas de óxido de titanio (TiO₂) (Coccini y cols., 2015).

Otro estudio ha revelado, altos niveles de citoquinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6 y de TNF- α observadas en células polimorfonucleares (PMBC) "in vitro" procedentes de pacientes con alergia a implantes de titanio (Thomas y cols., 2013). En nuestro estudio no observamos alergias en los pacientes con implantes y amalgamas dentales. Un reciente estudio no detectó diferencias estadísticamente significativas de mediadores inflamatorios entre pacientes con implantes de titanio y de zirconio, excepto cambios significativos en los niveles de leptina (Barwacz y cols., 2015).

El aumento de IL-1 β observado en nuestro estudio no parece atribuirse a fallos de la estabilidad de los implantes a lo largo de los años, debido a que su tasa de éxito es del 100% y los niveles de titanio no difieren significativamente entre los grupos experimentales del presente estudio. Como existe una relación directa entre pérdida de estabilidad de los implantes y polimorfismos genéticos para IL-1 β (Geraets y cols., 2014), pensamos que el incremento de IL-1 β sistémico observado en pacientes con implantes dentales y amalgamas podría deberse a la migración distal de plata y/o cobalto, pero no se justifica ni por el titanio ni por la presencia de periimplantitis, ya que en el presente estudio hemos excluido pacientes con enfermedad periodontal y periimplantar.

No obstante, se ha descrito que las nanopartículas de titanio podrían inducir estrés oxidativo, citotoxicidad y genotoxicidad (Czajka y cols., 2015, Zhang y cols., 2015).

Niveles bajos de litio (Li) y rubidio (Rb) y alteraciones en los niveles de sodio (Na) y de potasio (K) como posibles indicadores de un mayor estrés en el grupo (A+I)

Se sabe que la deficiencia de litio o rubidio podría asociarse a depresión (Young, 2017), mientras que el déficit de litio se relaciona con el estado de la microbiota intestinal (Yano y cols., 2015). A pesar de que los niveles de titanio no difiere significativamente en nuestro estudio, se ha descrito que la administración de nanopartículas de dióxido de titanio (TiO₂) induce a conductas depresivas en ratas (Cui y cols., 2014).

Hemos detectados en nuestro estudio bajos niveles de los oligoelementos litio (Li) y rubidio (Rb) medidos por ICP-MS en pelo de pacientes con amalgamas e implantes dentales (A+I) frente a los portadores de amalgamas (A).

De hecho, la suplementación dietética con cloruro de rubidio (Rb) actúa sobre el sistema dopaminérgico (Brundusino y Cairoli, 1996), por lo que

sugerimos que el descenso observado en ambos oligoelementos (Li y Rb) podría reflejar conductas de ansiedad en pacientes con implantes y amalgamas dentales.

Por otro lado, se ha descrito la correlación existente entre bruxismo y estrés (Carvalho y cols., 2008; Ahlberg y cols., 2002), lo que afecta a la calidad de vida y también al sistema metabólico y podría alterar los niveles de neurotransmisores en pacientes (Cavallo y cols., 2016, Rajan y cols., 2017). La depleción de litio (Li) y rubidio (Rb) en nuestro estudio podría asociarse a alteraciones emocionales de ansiedad y bruxismo (Carvalho y cols., 2011), condición que afecta al eje hipotalámico-hipofisario adrenal y podría aumentar los niveles de cortisol.

Varios autores demostraron que el bruxismo está estrechamente relacionado con los niveles de estrés en profesionales en entornos de presión emocional, demostrando que los profesionales de tecnología de la información sufren bruxismo en una tasa de 59,2% (Rao y cols., 2011). En relación a otros estudios, también han observado que las personas que son más sensibles a los factores de estrés y producen más hormonas de estrés en respuesta a situaciones de presión, son más propensas a sufrir bruxismo (Abekura y cols., 2011).

Por otra parte, Vanaelst y cols., mostraron que la actividad de la glándula adrenal (implicada en la respuesta de estrés), se refleja directamente en el mineralograma (Vanaelst y cols., 2013). De hecho, también, alteraciones emocionales se han asociado a cambios en los niveles de oligoelementos (Mg^{++} , Na^+ y K^+) medidos en pelo (Malter, 2002). Dichos autores, consideran los niveles de magnesio (Mg^{++}) y de calcio (Ca^{++}) como minerales que actúan como "anti-estrés". Además, el aumento de sodio (Na^+) y de potasio (K^+) en pacientes con implantes de titanio y amalgamas (A+I) frente a sus respectivos controles, apoya el hecho de que la depleción de ambos oligoelementos (Li y Rb) pueda reflejar conductas bruxistas de ansiedad en el grupo (A+I).

Consecuentemente es conocido, que el estrés metabólico aumenta los niveles de la hormona aldosterona, lo que aumenta los niveles de sodio (Na^+) y

conduce a la retención de líquidos (Toering, 2017). En nuestro estudio, observamos un incremento significativo de sodio (Na^+) de los grupos experimentales (A+I) y (A) frente al grupo control (Cont). En este sentido, se requieren unos niveles fisiológicos adecuados de sodio (Na^+), para mantener una actividad adecuada de la bomba Na^+ - K^+ - ATP-asa, que está implicada en la producción de energía celular y cuya actividad se afecta por altos niveles de radicales libres (Figtree y cols., 2009). No obstante, el aumento de sodio (Na^+) es equilibrado por incremento de potasio (K^+), como mecanismo compensatorio evidenciados en los pacientes con (A+I) frente a controles (Cont).

Por otra parte, el aumento de los niveles de calcio (Ca^{++}) en pacientes con implantes dentales y amalgamas (A+I), podría aumentar la movilización del magnesio (Mg^{++}) de los depósitos intracelulares de magnesio (Watts, 1995). Además, el aumento de calcio (Ca^{++}) podría depositarse en tejidos blandos más que en dientes y en hueso (Malter, 2002). Dicho aumento (Ca^{++}), tiende a reducir los niveles de fósforo (P). No obstante, no se observan diferencias estadísticamente significativas para el fósforo del presente estudio.

Dado que el estrés metabólico o psicológico aumenta los niveles de sodio (Na^+), la célula podría movilizar el magnesio (Mg^{++}) y el zinc (Zn^{++}) de los depósitos intracelulares como mecanismo compensatorio. En efecto, pacientes con implantes y amalgamas dentales (A+I) en nuestro estudio, muestran un aumento significativo de magnesio (Mg^{++}) debido a la mayor movilización de los depósitos de magnesio (Mg^{++}) intracelular frente a los portadores de amalgamas dentales (A) y controles respectivamente. Consecuentemente, esta liberación sugiere que el aumento de magnesio (Mg^{++}), junto al sodio (Na^+) y al potasio (K^+) presupone un mayor estrés metabólico en el grupo de (A+I) que en los portadores de amalgamas dentales (A). Por el contrario, no observamos diferencias significativas para el magnesio (Mg^{++}) en pacientes con amalgamas frente al control.

Se sabe, que la necesidad de boro (B) es mayor cuando se necesita responder a un estrés nutricional que afecta negativamente al metabolismo del

calcio, incluyendo la deficiencia de magnesio (Mg^{++}) (Nielsen, 1990; Bakken y Hunt 2003).

El exceso de potasio (K^+) podría predisponer a una sobrecarga renal en pacientes con altos niveles séricos de mercurio (Hg), ya que existen polimorfismos genéticos para el Glutatión (GSH) que reflejan su toxicidad renal (Al-Saleh y cols., 2012). Sin embargo, los pacientes odontológicos de nuestro estudio no presentan historia previa de diabetes, ni enfermedades cardiovasculares, ni renales.

Por tanto, un control adecuado de su estilo de vida, regulando sus niveles de estrés y una ingesta adecuada de nutrientes esenciales, podría evitar riesgos futuros de padecer enfermedades emergentes como fibromialgia o síndrome químico múltiple, especialmente si existe acumulación de varios metales pesados en el organismo (Pigatto y cols., 2013).

Por último, nuestros hallazgos considerados de forma conjunta, indican que la presencia de implantes de titanio en portadores de amalgamas a largo plazo podría inducir alteraciones metabólicas, posiblemente por el déficit de oligoelementos relacionados con respuestas de estrés metabólicos (Na^+ , K^+ , Mg^{++} , B, Li, Rb) y conducir a un aumento de la susceptibilidad al estrés oxidativo.

Según lo evidenciado y considerando que la interacción de distintas aleaciones en la cavidad bucal es habitual encontrarla en la clínica odontológica, el abordaje de la toxicidad crónica de los metales a nivel científico y de las Instituciones gubernamentales es contradictorio, sería recomendable, adoptar el *Principio de Precaución* ante la incertidumbre y controversia, relativas al tema abordado en la presente tesis Doctoral. Como dice la ENCÍCLICA PAPAL, LAUDATO SÍ, en la cual cita la declaración de Rio de 1992, que sostiene que: “cuando haya peligro de daño grave o irreversible, la falta de certeza científica absoluta no deberá utilizarse como razón para postergar la adopción de medidas eficaces”. (Papa Francisco, 2015).



CONCLUSIONES

6 CONCLUSIONES

CONCLUSIÓN GENERAL

Los pacientes con implantes dentales de titanio y amalgamas (A+I) muestran una mayor susceptibilidad al estrés oxidativo y un aumento de la inflamación sistémica, que podría deberse tanto a los bajos ratios de Se/Ag y Se/Hg evidenciados, como a alteraciones significativas de ciertos oligoelementos frente a aquellos portadores únicamente de amalgamas dentales (A).

CONCLUSIONES ESPECÍFICAS

1 a) Pacientes con implantes dentales de titanio y amalgamas (A+I) muestran niveles significativamente más elevados de plata (Ag) y de bario (Ba), así como de níquel (Ni) y cobalto (Co) en pelo, frente a los portadores únicamente de amalgamas dentales (A). No se observaron cambios significativos para otros metales pesados analizados (Hg, Zn⁺⁺, Cu⁺⁺, Ti, V, Al).

b) Pacientes portadores de implantes de titanio y amalgamas dentales (A+I), muestran niveles significativamente disminuidos de ciertos oligoelementos como el litio (Li) y rubidio (Rb), frente a los portadores únicamente de amalgamas dentales (A); hecho que está en consonancia con el aumento significativo de los niveles de magnesio (Mg⁺⁺) y de sodio (Na⁺) detectados, frente a sus respectivos portadores de amalgamas dentales.

c) El aumento significativo de los niveles de calcio (Ca⁺⁺), estroncio (Sr) y de potasio (K⁺) sugiere una mayor predisposición a sufrir alteraciones metabólicas en pacientes con amalgamas e implantes de titanio (A+I), frente a sus respectivos controles.

2. El aumento significativo de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β y MCP-1) sistémicas, podría asociarse a la presencia crónica de implantes de titanio en los portadores de amalgamas dentales (A+I), frente a aquellos con amalgamas dentales (A).



3. El aumento de los niveles sistémicos de malonaldehído (MDA) y la reducción de los niveles de glutatión (GSH: forma reducida) detectados, sugiere que los pacientes con implantes dentales de titanio y amalgamas (A+I), muestran una mayor susceptibilidad al estrés oxidativo que aquellos con amalgamas dentales (A).

4. Los pacientes con implantes de titanio y amalgamas dentales (A+I) evidencian niveles de selenio (Se) significativamente más bajos y también ratios de Se/Hg y Se/Ag reducidos, frente a portadores únicamente de amalgamas dentales (A). Este hecho, sugiere que se requieren niveles de selenio (Se) adecuados, para contrarrestar la posible toxicidad asociada a la liberación de plata a órganos distales en el organismo.





BIBLIOGRAFÍA

7 BIBLIOGRAFÍA

1. Abekura H, Tsuboi M, Okura T, Kagawa K, Sadamori S, Akagawa Y. Association between sleep bruxism and stress sensitivity in an experimental psychological stress task. *Biomedical Research*. 2011; 32(6): 395-399.
2. Agaoglu G, Arun T, Izgu B, Yarat A. Nickel and chromium levels in the saliva and serum of patients with fixed orthodontic appliances. *Angle Ortho*. 2001; 71:375-379.
3. Ahlberg J, Rantala M, Savolainen A, Suvinen T, Nissinen M, Sarna S, Lindholm H, Könönen M. Reported bruxism and stress experience. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2002; 30(6):405-8.
4. Ahlqwist M, Bengtsson C, Lapidus L, Gergdahl IA, Schütz A. Serum mercury concentration in relation to survival, symptoms, and diseases: results from the prospective population study of women in Gothenburg, Sweden. *Acta Odontol Scand*. 1999; 57(3):168-74.
5. Albrektsson T, Isidor F. Consensus report: implant therapy in Berlin. *Proceedings of the 1st European Workshop on Periodontology Quintessence*. 1994; 25:365-69.
6. Albrektsson T. A multicenter report on osseointegrated oral implants. *J Prosthet Dent*. 1998; 60:75-84.
7. Albrektsson T, Donos N. Implant survival and complications. The Third EAO consensus conference. *Clin Oral Implants Res*. 2012; 23(6):63-65.
8. Alman AC, Johnson LR, Calverley DC, Grunwald GK, Lezotte DC, Harwood JEF, Hokanson JE. Loss of alveolar bone due to periodontal disease exhibits a threshold on the association with coronary heart disease. *J Periodontol*. 2011; 82:1304-13.
9. Al-Saleh I, Al-Sedairi Aa, Elkhatib R. Effect of mercury (Hg) dental amalgam fillings on renal and oxidative stress biomarkers in children. *Sci Total Environ*. 2012; 1;431:188-96.

10. Ames B, Shigenaga M, Hagen T. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90(17): 7915-22.
11. Andersen JK. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nature Medicine* 10. 2004; S:18-25.
12. Andreiotelli M, Koutayas SO, Madianos PN, Strub JR. Relationship between interleukin-1 genotype and peri-implantitis: a literature review. *Quintessence Int*. 2008; 39(4):289-98.
13. Anjun SA, Lawrence H, Deehan DJ, Tyson-Capper AJ. Effect of cobalt-mediated Toll-like receptor 4 activation on inflammatory response in endothelial cells. *Oncotarget*. 2016; 7(47):76471-76478.
14. Anthony HL, Tjan, Peach KD, Vanuenburgh SL, Zbaraschuk ER. Marginal accuracy of complete crowns made from alternative casting alloys. *J Prosthet Dent*. 1991, 66(2):157-164.
15. Anusavice K. Aleaciones dentales vaciadas. En *La ciencia de los materiales dentales de Phillips*. 10^a ed. México: McGraw-Hill Interamericana. 1998; 441- 479.
16. Armitage SA, White MA, Wilson HK. The determination of silver in whole blood and its application to biological monitoring of occupationally exposed groups. *Ann Occup Hyg*. 1996; 40:331-8.
17. Astrand P, Ahlquist P, Gunne J, Nilson H. Implant treatment of patients with edentulous jaws: a 20-year follow-up. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2008; 10:207-17.
18. Atieh MA, Alsabeeha NH, Faggion CM Jr, Duncan WJ. The frequency of peri-implant diseases: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Periodontology*. 2013; 84(11):1586-98.
19. Bakken NA, Hunt CD. Dietary boron decreases peak pancreatic in situ insulin release in chicks and plasma insulin concentrations in rats regardless of vitamin or magnesium status. *J Nutr*. 2003; 133(11):3577-83.
20. Baldi C, Minoia C, Di Nucci A, Capodaglio E, Manzo L. Effects of silver in isolated rath epatocytes. *Toxicol Lett*. 1988; 41(3):261-8.

21. Barcelos GR, Grotto D, de Marco KC, Valentini J, Lengert Av, de Oliveira AÁ, Garcia SC, Braga GÚ, Schläwicke Engström K, Cólus IM, Broberg K, Barbosa F Jr. Polymorphisms in glutathione-related genes modify mercury concentrations and antioxidant status in subjects environmentally exposed to methylmercury. *Sci Total Environ.* 2013; (1)463-464:319-25.
22. Barghi M, Behrooz RD, Esmaili-Sari A, Ghasempouri SM. Mercury exposure assessment in Iranian pregnant women's hair with respect to diet, amalgam filling, and lactation. *Biol Trace Elem Res.* 2012; 148(3):292-301.
23. Barregard L. Biological monitoring of exposure to mercury vapour. *Scand J Work Environ Health.* 1993; 19:45-9.
24. Barrett RD, Bishara SE, Quinn JK. Biodegradation of orthodontic appliances. Part I. Biodegradation of nickel and chromium in vitro. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1993; 103(1):8-14.
25. Bartold PM, Kuliwaba JS, Lee V, Shah S, Marino V, Fazzalari NL. Influence of surface roughness and shape on microdamage of the osseous surface adjacent to titanium dental implants. *Clin Oral Implants Res.* 2011; 22(6):613-18.
26. Barwacz CA, Brogden KA, Stanford CM, Dawson DV, Recker EN, Blanchette D. Comparison of pro-inflammatory cytokines and bone metabolism mediators around titanium and zirconia dental implant abutments following a minimum of 6 months of clinical function. *Clin Oral Implants Res.* 2015; 26(4):35-41.
27. Beckett GJ, Arthur JR. Selenium and endocrine systems. *J Endocrinol.* 2005; 184(3):455-65.
28. Beliles, RP. The Metals. In: Patty's Industrial Hygiene and Toxicology, 4th ed., G.D. Clayton and F. E. Clayton, eds. John Wiley & Sons, New York. 1994; pp. 1925-1929.
29. Bellinger DC, Trachtenberg F, Barregard L, Tavares M, Cernichiari E, Daniel D, McKinlay S. Neuropsychological and renal effects of dental amalgam in children: a randomized clinical trial. *Journal of the American Medical Association.* 2006; 295(15):1775-83.

30. Berglundh T, Zitzmann N, Donati M. Are peri-implant lesions different from periodontitis lesions? *Journal of Clinical Periodontology*. 2011; Supl. 11 (38): 188-202.
31. Bertello LF. Oligoelementos en Medicina. En 1ª Ed. Generalidades. Editorial Dunken. Buenos Aires. 2015; pag. 14-24. ISBN: 978-987-02-8279-2.
32. Bertolotti RL. Selection of alloys for today s crown and fixed partial denture restorations. *J. Am Dent Assoc*. 1984; 108(6):959-966.
33. Bezzon O, Mattos M, Ribeiro R, Almeida R. Effect of berillium on the castibility and resistance of ceramometal bonds in niquel-chromium alloys. *J Prosthet Dent*. 1998; 80(5):570-574.
34. Bhasin P, Singla N, Dhawan DK. Protective role of zinc during aluminum-induced hepatotoxicity. *Environ Toxicol*. 2014; 29(3):320-7.
35. Bishara SE, Barrett RD, Selim MI. Biodegradation of orthodontic appliances. Part II. Changes in the blood level of nickel. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1993; 103:115-9.
36. Bjørklund G. Selenium as an antidote in the treatment of mercury intoxication. *Biometals*. 2015; 28(4):605-14.
37. Björkman L, Lundekvam BF, Laegreid T, Bertelsen BI, Morild I, Lilleng P, Lind B, Vahter M. Mercury in human brain, blood, muscle and toenails in relation to exposure: an autopsy study. *Environ Health*. 2007; 11; 6:30.
38. Bormann KH, Gellrich NC, Kniha H, Dard M, Wieland M Gahlert M. Biomechanical evaluation of a microstructured zirconia implant by a removal torque comparison with a standard Ti-SLA implant. *Clin Oral Implants Res*. 2012; 23(10):1210-6.
39. Brånemark PI, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindström J, Hallén O, Ohman A. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10 year period. *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl*. 1977; 16:1-132.
40. Brownley KA, Boettiger CA, Young L, Cefalu WT. Dietary chromium supplementation for targeted treatment of diabetes patients with comorbid depression and binge eating. *Med Hypotheses*. 2015; 85(1):45-8.

41. Brundusino AO, Cairoli S. The pharmacological action of rubidium chloride in depression. *Minerva Psichiatr.* 1996; 37(1):45-9.
42. Burdairon G. "Propiedades mecánicas de los Biomateriales" en *Manual de Biomateriales Dentarios*. 1ª ed. Barcelona. Ed. Masson. 1991: 33-52.
43. Cabaña-Muñoz ME, Parmigiani-Izquierdo JM, Bravo-González LA, Kyung HM, Merino JJ. Increased Zn/Glutathione Levels and Higher Superoxide Dismutase-1 Activity as Biomarkers of Oxidative Stress in Women with Long-Term Dental Amalgam Fillings: Correlation between Mercury/Aluminium Levels (in Hair) and Antioxidant Systems in Plasma, *Plos One*. 2015a; 15:1(6): e0126339.
44. Cabaña-Muñoz ME, Parmigiani-Izquierdo JM, Parmigiani- Cabaña JM, Merino JJ. Safe Removal of Amalgam Fillings in Dental Clinic: Use of Synergic Nasal Filters (Active Carbon) and Phytonaturals. *International Journal of Science and Research (IJSR)*. 2015b. Volume 4 Issue 3, 2391-95.
45. Cadosch D, Chan E, Gautschi OP, Filgueira L. Metal is not inert: role of metal ions released by biocorrosion in aseptic loosening--current concepts. *J Biomed Mater Res A*. 2009; 91(4):1252-62.
46. Calzavara D, Herrero M, Lázaro P, Sanz, M. Enfermedad periodontal como factor de riesgo de enfermedad periimplantaria. *Periodoncia* 2003; 13 (Nº 5) Fasc. 7:381-96.
47. Camacho-Alonso F, Sánchez-Siles M, Gilbel-del Águila O. No Evidence of Genotoxic Damage in a Group of Patients with Titanium Dental Implants and Different Metal Restorations in the Oral Cavity. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2015; 17(4):811-821.
48. Carneiro-Campos LE, Fernandes CP, Balduíno A., Leite ME, Leitao M. The effect of titanium topography features on mesenchymal human stromal cells' adhesion. *Clin Oral Implants Res*. 2010; 21:250-54.
49. Carpenter TO, DeLucia MC, Zhang JH, Bejnerowicz G, Tartamella L, Dziura J, Petersen KF, Befroy D, Cohen D. A randomized controlled study of effects of dietary magnesium oxide supplementation on bone mineral content in healthy girls. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; 91(12):4866-72.

50. Carvalho AL, Cury AA, García RC. Prevalence of bruxism and emotional stress and the association between them in Brazilian police officers. *Braz Oral Res.* 2008; 22(1):31-5.
51. Case CP, Langkamer VG, James C, Palmer MR, Kemp AJ, Heap PF, Solomon L. Widespread dissemination of metal debris from implants. *J Bone Joint Surg Br.* 1994; 76(5):701-12.
52. Castellano JJ, Shafii SM, Ko F, Donate G, Wright TE, Mannari RJ, Payne WG, Smith DJ, Robson MC. Comparative evaluation of silver-containing antimicrobial dressings and drugs, *Int Wound J.* 2007; 4(2):114-122.
53. Cavallo P, Carpinelli L, Savarese G. Perceived stress and bruxism in university students. *BMC Res Notes.* 2016; 9(1):514.
54. Chaturvedi TP. An overview of the corrosion aspect of dental implants (titanium and its alloys). *Indian J Dent Res.* 2009; 20(1):91-8.
55. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull.* 1993; 49(3):481-93.
56. Chen Z, Myers R, Wei T, Bind E, Kassim P, Wang G, Ji Y, Hong X, Caruso D, Bartell T, Gong Y, Strickland P, Navas-Acien A, Guallar E, Wang X. Placental transfer and concentrations of cadmium, mercury, lead, and selenium in mothers, new borns, and young children. *Sci Environ Epidemiol.* 2014; 24(5):537-44.
57. Chrcarnovic BR, Albrektsson T, Wennerberg A. Diabetes and oral implant failure: asystematic review. *J Dent Res* 2014; 93:859-67.
58. Cimasoni G. Crevicular fluid updated *Monogr Oral Sci.* 1983; 12: III-VII, 1-152.
59. Cionca N, Hashim D, Cancela J, Giannopoulou C, Mombelli A. Pro inflammatory cytokines at zirconia implants and teeth. A cross sectional assessment. *Clin Oral Investg.* 2016; 20(8):2285-2291.
60. Clarkson TW, Hursh JB, Sager PR, Syversen TLM. Mercury In: *Biological Monitoring of Toxic Metals* Plenum Press, New York. 1988; 199-246.
61. Clarkson TW, Magos L. The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Crit Rev Toxicol.* 2006; 36(8):609-62.

62. Coccini T, Grandi S, Lonati D, Locatelli C, De Simone U. Comparative cellular toxicity of titanium dioxide nanoparticles on human astrocyte and neuronal cells after acute and prolonged exposure. *Neurotoxicology*. 2015; 48:77-89.
63. Combs GF Jr. *Nutrients*. 2015; 7(4):2209-36.
64. Cook SD, Dalton JE. Biocompatibility and biofunctionality of implanted materials. *Alpha Omegan*. 1992; 85 (4):41-47.
65. Cosaro E, Bonafini S, Montagnana M, Danese E, Trettene MS, Minuz P, Delva P, Fava C. Effects of magnesium supplements on blood pressure, endothelial function and metabolic parameters in healthy young men with a family history of metabolic syndrome. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2014; 24(11):1213-20.
66. Council on Dental Materials. Instruments and Equipment. Report on base metal alloys for crown and bridge applications: benefits and risks. *J Am Dent Assoc*. 1985; 111(3):479-83.
67. Craig R. Aleaciones de metales nobles y soldaduras. En *Materiales en Odontología Restauradora*. 10ª ed. Madrid: Harcourt Brace. 1998; p. 383-395.
68. Cui Y, Chen X, Zhou Z, Lei Y, Ma M, Cao R, Sun T, Xu J, Huo M, Cao R, Wen C, Che Y. Prenatal exposure to nanoparticulate titanium dioxide enhances depressive-like behaviors in adult rats. *Chemosphere*. 2014; 96: 99-104.
69. Custodio HM, Harari R, Gerhardsson L, Skerfving S, Broberg K. Genetic influences on the retention of inorganic mercury. *Arch Environ Occup Health*. 2005; 60(1):17-23.
70. Czajka M, Sawicki K, Sikorska K, Popek S, Kruszewski M, Kapka-Skrzypczak L. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles in central nervous system. *Toxicol In Vitro*. 2015; 29(5):1042-52.
71. Danesh-Meyer MJ. Dental implants. Part I: Biological basis, implant types, and the peri-implants ulcus. *J N Z Soc Periodontol*. 1994; 77:15-22.

72. Daood U, Bandey N, Bin-Qasim S, Omar H, Saad K. Surface characterization analysis of failed dental implants using scanning electron microscopy. *Acta Odon Scan* 2011; 69:367-73.
73. Davies KJ. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects. *J Biol Chem.* 1987; 262:9895-901.
74. de Jonge LT, Leeuwenburgh SC, Wolke JG, Jansen JA. Organic-inorganic surface modifications for titanium implant surfaces. *Pharm Res.* 2008; 25(10):2357-69.
75. de Mello Filho AC, Meneghini R. Protection of mammalian cells by o-phenanthroline from lethal and DNA-damaging effects produced by active oxygen species. *Biochim Biophys Acta.* 1985; 847(1):82-89.
76. de Morais LS, Serra GG, Albuquerque Palermo EF, Andrade LR, Müller CA, Meyers MA, Elias CN. Systemic levels of metallic ions released from orthodontic mini-implants. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2009; 135(4):522-9.
77. Demirci K, Nazıroğlu M, Övey İS, Balaban H. Selenium attenuates apoptosis, inflammation and oxidative stress in the blood and brain of aged rats with scopolamine-induced dementia. *Metab Brain Dis.* 2017; 32(2):321-329.
78. Devasagayam TP, Boloor KK, Ramasarma T. Methods for estimating lipid peroxidation: an analysis of merits and demerits. *Indian J of Biochem Biophys.* 2003; 40(5)300-8.
79. Dolbec J, Mergler D, Larribe F, Roulet M, Lebel J, Lucotte M. Sequential analysis of hair mercury levels in relation to fish diet of an Amazonian population, Brazil. *Sci Total Environ.* 2001; 271 (1-3):87–97.
80. Drake PL, Hazelwood KJ. Exposure-related health effects of silver and silver compounds: a review. *Ann Occup Hyg.* 2005; 49(7):575-85.
81. Duarte PM, Serrão CR, Miranda TS, Zanatta LC, Bastos MF, Faveri M, Figueiredo LC, Feres M. Could cytokine levels in the peri-implant crevicular fluid be used to distinguish between healthy implants and implants with peri-implantitis? A systematic review. *J Periodontal Res.* 2016; 51(6):689-698.

82. Echeverria D, Aposhian HV, Woods JS, Heyer NJ, Aposhian MM, Bittner AC Jr, Mahurin RK, Cianciola M. Neurobehavioral effects from exposure to dental amalgam Hg(o): new distinctions between recent exposure and Hg body burden. *FASEB J* 1998; 12(11):971-80.
83. Edwards M, Hall J, O'Bryant S. Higher vanadium levels differentially impacted neuropsychological functioning in cases of normal cognition and mild cognitive impairment: A project FRONTIER study. Volume 8, Issue 4, Supplement, 2012, P316.
84. Eger M, Sterer N, Liron T, Kohavi D, Gabet Y. Scaling of titanium implants entrains inflammation-induced osteolysis. *Sci Rep.* 2017; 7:39612.
85. Eisenberg MJ. Magnesium deficiency and cardiac arrhythmias. *N Y State J Med.* 1986; 86(3):133-6.
86. El-Ansary A, Bjørklund G, Tinkov AA, Skalny AV, Al Dera H. Relationship between selenium, lead, and mercury in red blood cells of Saudi autistic children. *Metab Brain Dis.* 2017; 32(4):1073-1080.
87. Engfors I, Ortorp A, Jemt T. Fixed implant-supported prostheses in elderly patients: a 5-year retrospective study of 133 edentulous patients older than 79 years. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2004; 6(4):190-8.
88. Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr Top Med Chem.* 2001; 1(6):529-39.
89. Espín S, Martínez-López E, Jiménez P, María-Mojica P, García-Fernández AJ. Effects of heavy metals on biomarkers for oxidative stress in Griffon vulture (*Gyps fulvus*). *Environ Res.* 2014; 129:59-68.
90. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biol Med.* 1991; 11(1):81-128.
91. Fairweather-Tait SJ, Collings R, Hurst R. Selenium bioavailability: current knowledge and future research requirements. *Am J Clin Nutr.* 2010; 91(5):1484-1491.

92. Fakour H, Esmaili-Sari A, Zayeri F. Scalp hair and saliva as biomarkers in determination of mercury levels in Iranian women: amalgam as a determinant of exposure. *J Hazard Mater.* 2010; 177(1-3):109-13.
93. Feng X, Chen A, Zhang Y, Wang J, Shao L, Wei L. Application of dental nanomaterials: potential toxicity to the central nervous system. *Int J Nanomedicine.* 2015; 10:3547-65.
94. Ferreira SD, Silva GL, Cortelli JR, Costa JE, Costa FO. Prevalence and risk variables for peri-implant disease in Brazilian subjects. *J Clin Periodontol.* 2006; 33(12): 929-35.
95. Figtree GA, Liu GC, Bibert S, Hamilton EJ, Garcia A, White C et al. Reversible oxidative modifications: a key mechanism of Na⁺-K⁺ pump regulation. *Circ Res.* 2009; 105(2):185-93.
96. Finkel T, Holbrook N. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* 2000; 408 (6809): 239-47.
97. Firoz M, Graber M. Bioavailability of US commercial magnesium preparations. *Magnes Res.* 2001; 14(4):257-62.
98. Flores-Mateo G, Navas-Acien A, Pastor-Barrius R, Guallar E. Selenium and coronary heart disease: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* 2006; 84(4):762-73.
99. Folin M, Contiero E, Vaselli GM. Trace element determination in humans. The use of blood and hair. *Biol Trace Elem Res.* 1991; 31(2):147-58.
100. Frankel EN. Chemistry of free radical and singlet oxidation of lipids. *Prog Lipid Res.* 1984; 23:197-221.
101. Fransson C, Wennström J, Berglundh T. Clinical characteristics at implants with a history of progressive bone loss. *Clin Oral Implants Res.* 2008; 19(2):142-7.
102. Frick A, Åhs F, Engman J, Jonasson M, Alaie I, Björkstrand J, Frans Ö, Faria V, Linnman C, Appel L, Wahlstedt K, Lubberink M, Fredrikson M, Furmark T. Serotonin Synthesis and Reuptake in Social Anxiety Disorder: A Positron Emission Tomography Study. *JAMA Psychiatry.* 2015; 72(8):794-802.

103. Frisken KW, Dandie GW, Lugowski S, Jordan G. A study of titanium release into body organs following the insertion of single threaded screw implants into the mandibles of sheep. *Aust Dent J.* 2002; 47(3):214-7.
104. Gahlert M, Burtscher D, Pfundstein G, Grunert I, Kniha H, Roehling S. Dental zirconia implants up to three years in function: a retrospective clinical study and evaluation of prosthetic restorations and failures. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2013; 28(3):896-904.
105. Gahlert M, Roehling S, Sprecher CM, Kniha H, Milz S, Bormann K. In vivo performance of zirconia and titanium implants: a histomorphometric study in mini pig maxillae. *Clin Oral Implants Res.* 2012; 23(3):281-6.
106. Gao X, Topping VD, Keltner Z, Sprando RL, Yourick JJ. Toxicity of nano-and ionic silver to embryonic stem cells: a comparative toxicogenomic study. *J Nanobiotechnology.* 2017.11;15(1):3.
107. García E, Pérez-Arizti JA, Márquez-Ramírez SG, Delgado-Buenrostro NL, Chirino YI, Iglesias GG, López-Marure R. Titanium dioxide nanoparticles induce strong oxidative stress and mitochondrial damage in glial cells. *Free Radic Biol Med.* 2014; 73:84-94.
108. García-Delaney C, Sánchez-Garcés MA, Figueiredo R, Sánchez-Torres A, Gay-Escoda C. Clinical significance of interleukin-1 genotype in smoking patients as a predictor of peri-implantitis: A case-control study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2015; 20(6):737-43.
109. Geier DA, Carmody T, Kern JK, King PG, Geier MR. A significant relationship between mercury exposure from dental amalgams and urinary porphyrins: a further assessment of the Casa Pia Children's dental amalgam trial. *Biometals.* 2011; 24(2): 215-24.
110. Geis-Gerstorfer J, Wirz J, Schille C, Schmidli F. The effect of the aeration status of de corrosion behavior of Ni-Cr alloys. *Schweiz-Monatsschr-Zahnmed* 1993; 103(9): 1103-1106.
111. Geraets L, Oomen AG, Krystek P, Jacobsen NR, Wallin H, Laurentie M, Verharen HW, Brandon EF, de Jong WH. Tissue distribution and elimination after oral and intravenous administration of different titanium dioxide nanoparticles in rats. *Part Fibre Toxicol.* 2014;11:30.

112. Goldberg JR, Gilbert JL. The electrochemical and mechanical behaviour of passivated and TiN/AlN-coated CoCrMo and Ti6Al4V alloys. *Biomaterials*. 2004; 25(5):851-64.
113. Golvano I, Garcia I, Conde A, Tato W, Aginagalde A. Influence of fluoride content and pH on corrosion and tribocorrosion behaviour of Ti13Nb13Zr alloy in oral environment. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2015; (49):186-96.
114. Gosney MA, Hammond MF, Shenkin A, Allsup S. Effect of micronutrient supplementation on mood in nursing home residents. *Gerontology*. 2008; 54(5):292-9.
115. Gu N, Hu H, Guo Q, Jin S, Wang C, Oh Y, Wu Q. Effects of oral administration of titanium dioxide fine-sized particles on plasma glucose in mice. *Food Chem Toxicol*. 2015; 86:124-3.
116. Gul N, Khan S, Khan A, Ahmad SS. Mercury health effects among the workers extracting gold from carpets and dusted clays through amalgamation and roasting processes. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2015; (22):17965-74.
117. Gurer H, Ercal N. Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? *Free Radic Biol Med*. 2000; 29(10):927-45.
118. Halliwell BG, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med*. 1992; 119:598-620.
119. Han Q, Cai S, Yang L, Wang X, Qi C, Yang R, Wang C. Molybdenum Disulfide Nanoparticles as Multifunctional Inhibitors against Alzheimer's Disease. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017; 9(25):21116-21123.
120. Hanawa T. Metal ion release from metal implants. *Mater SciEng C*. 2004; 24:745-52.
121. Handelman GJ. The evolving role of carotenoids in human biochemistry. *Nutrition*. 2001; 17(10):818-22.
122. Hansen JM, Watson WH, Jones DP. Compartmentation of Nrf-2 redox control: regulation of cytoplasmic activation by glutathione and DNA binding by thioredoxin-1. *Toxicol Sci*. 2004; 82(1):308-17.

123. Heinemann G, Fichtl B, Vogt W. Pharmacokinetics of vanadium in humans after intravenous administration of a vanadium containing albumin solution. *Br J Clin Pharmacol*. 2003; 55(3):241–245.
124. Hernández Ramos F. En: *Ortomolecular*. Ed: Rba. 2012; pag. 67-72.
125. Hissin PJ, Hilf RA. Fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem*. 1976; 74:214-226.
126. Hol PJ, Vamm JS, Gjerdet NR, Eide R, Isrenn R. Dental amalgam affects urinary selenium excretion. *Biol Trace Elem Res*. 2002; 85(2):137-47.
127. Homme KG, Kern JK, Haley BE, Geier DA, King PG, Sykes LK, Geier MR. New science challenges old notion that mercury dental amalgam is safe. *Biometals*. 2014; 27(1):19 24.
128. House K, Sernetz F, Dymock D, Sandi JR, Ireland AJ. Corrosion of orthodontic appliances. Should we care? *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2008; 133:584-92.
129. Hu H, Guo Q Wang C, Ma X, He H, Oh Y, Feng Y, Wu Q, Gu N. Titanium dioxide nanoparticles increase plasma glucose via reactive oxygen species-induced insulin resistance in mice. *J Appl Toxicol*. 2015; 35(10):1122-32.
130. Hwang CJ, Shin JS, Cha JY. Metal release from simulated fixed orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2001; 120(4):383-91.
131. Jacob KD, Hooten N, Tizeciak AR, Evans MK. Markers of oxidant stress that are clinically relevant in aging and age-related disease. *Mech Ageing Dev*. 2013; 134(3-4):139-57.
132. Jacobi-Gresser E, Huesker K, Schutt S. Genetic and immunological markers predict titanium implant failure: a retrospective study. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2013; 42:537-5.
133. Jallad KN. Heavy metal exposure from ingesting rice and its related potential hazardous health risks to humans. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2015.

134. Javed F, Al-Hezaimi K, Salameh Z, Almas K, Romanos GE. Pro inflammatory cytokines in the crevicular fluid of patients with peri-implantitis. *Cytokine* (2011) 53:8-12.
135. Jenkins RR. Free radicals chemistry. Relationship to exercise. *Sport Med* 1988; 5:156-70.
136. Jiang X, Wang L, Ji Y, Tian X, Cao M, Li J, Bi S, Wu X, Chen C, Yin JJ. Interference of Steroidogenesis by Gold Nanorod Core/Silver Shell Nanostructures: Implications for Reproductive Toxicity of Silver Nanomaterials. *Small*. 2017; 13(10).
137. Johnson AC, Tremble SM, Chan SL, Moseley J, LaMarca B, Nagle KJ, Cipolla MJ. Magnesium sulfate treatment reverses seizure susceptibility and decreases neuroinflammation in a rat model of severe preeclampsia. *PLoS One*. 2014; 9(11):e113670.
138. Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*. 2011; 283(2-3):65-87.
139. Jones L, Bunnell J, Stillman J. A 30-year follow-up of residual effects on New Zealand School Dental Nurses, from occupational mercury exposure. *Hum Exp Toxicol*. 2007; 26: 367-74.
140. Jozefczak M, Remans T, Vangronsveld J, Cuypers A. Glutathione is a key player in metal-induced oxidative stress defenses. *Int J Mol Sci*. 2012; 13(3):3145-75.
141. Justo R, Venereo G. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cub Med Milit*. 2002; 31:126-33.
142. Karimi M, Aboufazeli F, Zhad HR, Sadegui O, Najafi E. Experimental design methodology applied to mercury determination: hair samples as a mercury bioindicator. *J AOAC Int*. 2015; 98(1):176-82.
143. Karoussis IK, Müller S, Salvi GE, Heitz-Mayfield LJ, Brägger U, Lang NP. Association between periodontal and peri-implant conditions: a 10-years prospective study. *Clinical Oral Implants Research*. 2004; 15:1-7.
144. Khan DA, Ansari WM, Khan FA. Synergistic effects of iron deficiency and lead exposure on blood lead levels in children. *World J Pediatr*. 2011; 7(2):150-4.

145. Khwaja MA, Abbasi MS. Mercury poisoning dentistry: high-level indoor air mercury contamination at selected dental sites. *Rev Environ Health*. 2014. 29(1-2):29-31.
146. Kim DM, Badovinac RL, Lorenz RL, Fiorellini JP, Weber HP. A 10-year prospective clinical and radiographic study of one-stage dental implants. *Clin Oral Implants Res*. 2008; 19(3):254-258.
147. Kinane DF, Winstanley FP, Adonogianaki E, Moughal NA. Bioassay of interleukin 1 (IL-1) in human gingival crevicular fluid during experimental gingivitis. *Arch Oral Biol*. 1992; 37(2):153-6.
148. Klaassen cd, Liu J, Diwan BA. Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009; 238(3):215-20.
149. Klokkevold PR, Han TJ. How do smoking, diabetes, and periodontitis affect outcomes of implant treatment? *Int J Oral Maxillofac Implants* 2007; 22:173-202.
150. Kordowiak AM, Klein A, Goc A, Dabrós W. Comparison of the effect of VOSO₄, Na₃VO₄ and NaVO₃ on proliferation, viability and morphology of H35-19 rat hepatoma cell line. *Pol J Pathol*. 2007; 58(1):51-7.
151. Krinsky NI. Mechanism of action of biological antioxidants. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1992; 200:248-54.
152. Kuppusamy UR, Dharmani M, Kanthimathi MS, Indran M. Antioxidant enzyme activities of human peripheral blood mononuclear cells exposed to trace elements. *Biol Trace Elem Res*. 2005; 106(1):29-40.
153. Lai JC, Lai MB, Jandhyam S, et al. Exposure to titanium dioxide and other metallic oxide nanoparticles induces cytotoxicity on human neural cells and fibroblasts. *Int J Nanomedicine*. 2008; 3(4):533-545.
154. Laine ML, Leonhardt A, Roos-Jansaker AM, Peña AS, van Winkelhoff J, Winkel EG, Renvert S. IL-1RN gene polymorphism is associated with peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res*. 2006; 17:380-85.
155. Lang NP, Wilson TG, Corbet EF. Biological complications with dental implants: their prevention, diagnosis and treatment. *Clin oral Implants Res* 2000; 11:146 55.

156. Lee EG, Sung MS, Yoo HG, Chae HJ, Kim HR, Yoo WH. Increased RANKL-mediated osteoclastogenesis by interleukin-1 β and endoplasmic reticulum stress. *Joint Bone Spine* 2014; 81(6): 520-6.
157. Li YF, Chen C, Li B, Wang J, Gao Y, Zhao Y, Chai Z. Scalp hair as a biomarker in environmental and occupational mercury exposed populations: suitable or not?. *Environ Res.* 2008; 107(1):39-44.
158. Li YF, Chen C, Li B, Li W, Qu L, Dong Z, Nomura M, Gao Y, Zhao J, Hu W, Zhao Y, Chai Z. Mercury in human hair and blood samples from people living in Wanshan mercury mine area, Guizhou, China: an XAS study. *J Inorg Biochem.* 2008; 102(3):500-6.
159. Lim SD, Takada Y, Kim KH, Okuno O. Ions released from dental amalgams in contact with titanium. *Dent Mater J.* 2003; 22:96-110.
160. Limón-Pacheco J, Gonsebatt ME. The role of antioxidants and antioxidant related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat Res.* 2009; 31; 674(1-2):137-47.
161. Lindhe J, Berglundh T, Ericsson I, Liljenberg B, Marinello C. Experimental breakdown of peri-implant and periodontal tissues. A study in the beagle dog. *Clin Oral Implants Res* 1992; 3:9-16.
162. Lindhe J, Meyle J. Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *Journal of Clinical Periodontology.* 2008; 35(8):282–285.
163. Lohren H, Bornhorst J, Galla HJ, Schwerdtle T. The blood-cerebrospinal fluid barrier-first evidence for an active transport of organic mercury compounds out of the brain. *Metallomics.* 2015; 7(10):1420-30.
164. López E, Arce C, Oset-Gasque MJ, Cañadas S, Gonzalez MP. Cadmium induces reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture. *Free Radical Biology and Medicine* 40 (2006) 940-951.
165. Luoma H, Seppä L, Koskinen M, Syrjänen S. Effect of chlorhexidine-fluoride applications without and with Sr and Zn on caries, plaque, and gingiva in rats. *J Dent Res.* 1984; 63:1193-6.

166. Lyytikäinen M, Pätynen J, Hyvärinen H, Sipilä T, Kunnasranta M. Mercury and Selenium Balance in Endangered Saimaa Ringed Seal depend on Age and Sex. *Environ Sci Technol.* 2015; 6:49(19):11808-16.
167. Ma W, Jing L, Valladares A, Mehta SL, Wang Z, Li PA, Bnag JJ. Silver nanoparticle exposure induced mitochondrial stress, caspase-3 activation and cell death: amelioration by sodium selenite. *Int J Biol Sci* 2015; 11(8):860-7.
168. Macchi RL. Materiales metálicos. En: *Materiales dentales*. Editorial Panamericana. 2002. 3ª edición. P 41-80.
169. Mackert JR. Factors affecting estimation of dental amalgam mercury exposure from measurements of mercury vapor levels in intra-oral and expired air. *J Dent Res.* 1987; 66(12):1775-80.
170. Maldonado S, Jiménez E, Guapillo M, Ceballos G, Méndez E. Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico degenerativas. *Rev Med UV.* 2010; 2:32-9.
171. Malter R. *The Strands of Health; A Guide To Understanding Hair Mineral Analysis, Education & Health Resources of Arizona*, Cottonwood, AZ 2002.
172. Manca D, Ricard AC, Trottier B, Chevalier G. Studies on lipid peroxidation in rat tissues following administration of low and moderate doses of cadmium chloride . *Toxicology.* 1991; 67(3):303-23.
173. Marco Chover A. *Medicina Ortomolecular*. Editorial Club Universitario. 2011. ISBN: 978-84-9948-007-7.
174. Marco Chover A. *Revisión de los oligoelementos ampliada y revisada*. Valencia. Editorial Papallona. 2003. ISBN 978-84-612-5971-7.
175. Martin SF. T lymphocyte-mediated immune responses to chemical haptens metal ions: implications for allergic and autoimmune disease. *Int Arch Allergy Immunol.* 2004; 134(3):186-98.
176. Marzonk MA, Saleh L et al. Clinical behavior of silver palladium alloy casting: A five-year comparative clinical study. *J Prosthet Dent.* 1991; 65 (1):19-26.

177. Matasa C.G., "Materiales usados por los ortodoncistas. Aceros", *Journal of orthopedics, orthodontics and pediatric*. 27, (1.996).
178. Mauer S, Vergne D, Ghaemi SN. Standard and trace-dose lithium: a systematic review of dementia prevention and other behavioral benefits. *Aust N Z J Psychiatry*. 2014; 48(9):809-18.
179. Mc Ginley EL, Moran GP, Fleming GJ. Biocompatibility effects of indirect exposure of base-metal casting alloys to a human-derived three-dimensional oral mucosal model. *J Dent*. 2013; 41(11):1091-100.
180. Meling TR, Odegaard J. The effect of short-term temperature changes on superelastic nickel-titanium archwires activated in orthodontic bending. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2001; 119:263-73.
181. Mengel R, Behle M, Flores-de-Jacoby L. Osseointegrated implants in subjects treated for generalized aggressive periodontitis: 10-year results of a prospective, long-term cohort study. *J Periodontol* 2007; 12:2229-37.
182. Merino JJ, Parmigiani-izquierdo JM, Cabaña-Muñoz ME. The Nutritional Supplementation during 80 Consecutive Days with Glutathione (GSH), Alpha Lipoic Acid among other Bioactive Phytomolecules Significantly Rise Systemic (GSH) Levels and Reduces Hair's Aluminium (Al) in Patients. *I Journal of Science and Research*. 2017; 2319-7064.
183. Merino JJ, Roncero C, Oset-Gasque MJ, Naddaf A, González MP. Antioxidant and protective mechanisms against hypoxia and hypoglycaemia in cortical neurons in vitro. *Int J Mol Sci*. 2014; 15:2475-93.
184. Merino JJ, Aller MA, Rubio S, Arias N, Nava MP, Loscertales M, Arias J. Gut-brain chemokine changes in portal hypertensive. *Dig Dis Sci*. 2011; 56:2309-17.
185. Merino JJ, Cordero MI, Sandi C. Regulation of hippocampal cell adhesion molecules NCAM and L1 by contextual fear conditioning is dependent upon time and stressor intensity. *Eur J Neurosci*. 2000; 12(9):3283-90.
186. Meyle J, Chapplel. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol* 2000. 2015; 69:7-17.

187. Mikulewicz M, Chojnacka K. Release of metal ions from orthodontic appliances by in vitro studies: a systematic literature review. *Biol Trace Elem Res.* 2011; 139(3):241-56.
188. Moffa JP, Jenkins WA, Ellison JA, Hamilton JC. A clinical evaluation of two base metal alloys and a gold alloy for use in fixed prosthodontics: A five- year study. *J Prosthet Dent.* 1984, 52(4): 491-499.
189. Mombelli A, Buser D, Lang NP. Colonization of osseointegrated titanium implants in edentulous patients. Early results. *Oral Microbiol Immunol* 1998; 3:113-20.
190. Morcillo P, Esteban MÁ, Cuesta A. Heavy metals produce toxicity, oxidative stress and apoptosis in the marine teleost fish SAF-1 cell line. *Chemosphere.* 2016; 144:225-33.
191. Morris HF. Veterans administration cooperative studies project N.º 7. Part IV: Biocompatibility of base metal alloys. *J Prosthet Dent.* 1987; 58:14.
192. Morris G, Puri BK, Frye RE. The putative role of environmental aluminium in the development of chronic neuropathology in adults and children. How strong is the evidence and what could be the mechanisms involved? *Metab Brain Dis.* 2017 Jul 27. doi: 10.1007/s11011-017-0077-2.
193. Morrissette J, Takser L, St-Amour G, Smargiassi A, Lafond J, Mergler D. Temporal variation of blood and hair mercury levels in pregnancy in relation to fish consumption history in a population living along the St Lawrence River. *Environ Res.* 2004; 95:363-74.
194. Mortazavi G, Mortazavi SM. Increased mercury release from dental amalgam restorations after exposure to electromagnetic fields as a potential hazard for hypersensitive people and pregnant women. *Rev Environ Health.* 2015; 30(4):287-92.
195. Moskovitz J, Stadtman ER. Selenium-deficient diet enhances protein oxidation and affects methionine sulfoxide reductase (MsrB) protein level in certain mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci USA .* 2003; 100(13):7486-90.

196. Mutter J. Is dental amalgam safe for humans? The opinion of the scientific committee of the European Commission. *J Occup Med Toxicol.* 2011; 6:2. 10.1186/1745-6673-6-2.
197. NaBadalung D, Power J, Connelly M. Comparison of bond strengths of three Denture base resins to treated nickel chromium-berillium alloy. *J Prosthet Dent.* 1998; 80 (3): 354-361.
198. Nacional Institute of Dental Reserarch. Workshop: Biocompatibility of metals in dentistry. *J Am Dent Assoc.* 1984; 109:469.
199. Naghii MR. The significance of dietary boron, with particular reference to athletes. *Nutr Health* 1999; 13(1):31-7.
200. Natella F, Fidale M, Tubaro F, Ursini F, Scaccini C. Selenium supplementation prevents the increase in atherogenic electronegative LDL (LDL minus) in the postprandial phase. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2007; 17(9):649-56.
201. Nielsen FH. Studies on the relationship between boron and magnesium which possibly affects the formation and maintenance of bones. *Magnes Trace Elem.* 1990; 9(2):61-69.
202. Nielsen JP, Tuccillo JJ. Grain size in cast gold alloys. *J. Dent. Res.* 1966; 45(3)964-9.
203. Norowski PA Jr, Bumgardner JD. Biomaterial and antibiotic strategies for peri-implantitis: a review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009; 88(2):530-43.
204. Ohkubo C, Watanabe I, Hosoi T, Okabe T. Shear bond strengths of polymetyl methacrylate to cast titanium and cobalt-chromium frameworks using five metal primers. *J Prosthet Dent.* 2000; 83(1):50-7.
205. Okati N, Sari AE, Ghasempouri SM. Hair mercury concentrations of lactating mothers and breastfed infants in Iran (fish consumption and mercury exposure). *Biol Trace Elem Res.* 2012; 149(2)155-62.
206. Oliva J, Oliva X, Oliva DJ. One year follow-up of first consecutive 100 zirconia dental implants in humans. A comparison of two different rough surfaces. *Int J Oral Maxiillofac Implants.* 2007; 22:430-435.

207. Olmedo D, Fernández MM, Guglielmotti MB, Cabrini RL. Macrophages related to dental implant failure. *Implant Dent.* 2003; 12(1):75-80.
208. Olmedo DG, Duffo G, Cabrini RL, Guglielmotti MB. Local effect of titanium implant corrosion. An experimental study in rats. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2008; 37:1032-1038.
209. Olsson S, Bergman M. Daily dose calculations from measurements of intra-oral mercury vapor. *J Dent Res.* 1992; 71(2) 414-23.
210. Omlor GW, Kretzer JP, Reinders J, Streit MR, Bruckner T, Gotterbarm T, Aldinger PR, Merle C. In vivo serum titanium ion levels following modular neck hip arthroplasty --10 year results in 67 patients. *Acta Biomater.* 2013; 9(4):6278-82.
211. Oruc S, Tulunoglu Y. Fit of titanium and a base metal alloy metal-ceramic crown. *J Prosthet Dent.* 2000; 83 (3):314-318.
212. Papa Francisco, Carta Encíclica, LAUDATO SI'. Declaración de Rio sobre el medio ambiente y el desarrollo (14 de Junio 1992), Principio 15. Editrici Vaticana, 2015, Ciudad del Vaticano.
213. Park JD, Zheng W. Human exposure and health effects of inorganic and elemental mercury. *J Prev Med Public Health.* 2012; 45:344-52.
214. Parmigiani-Izquierdo JM, Cabaña-Muñoz Me, Merino JJ, Sánchez Pérez A. Zirconia implants and peek restorations for the replacement of upper molars. *Int J Implant Dent.* 2017; 3(1):5.
215. Peterson SH, McHuron EA, Kennedy SN, Ackerman JT, Rea LD, Castellini JM, O'Hara TM, Costa DP. Evaluating Hair as a Predictor of Blood Mercury: The Influence of Ontogenetic Phase and Life History in Pinnipeds. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2016; 70(1):28-45.
216. Petković AB, Matić SM, Stamatović NV, Vojvodić DV, Todorović TM, Lazić ZR, Kozomara RJ. Proinflammatory cytokines (IL-1beta and TNF-alpha) and chemokines (IL-8 and MIP-1alpha) as markers of peri-implant tissue condition. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2010; 39(5):478-85.

217. Peyton & Craig. Naturaleza de los materiales y aleaciones. En Materiales dentales restauradores. 2ª ed. Buenos Aires: Ed. Mundi. 1974; P.134-160.
218. Phillips RW. La Ciencia de los Materiales Dentales. De Skinner. México. Ed. Interamericana, 1986.
219. Phillips RW. Metals: Solidification and structure. En Skinners science of dental materials. 8ª ed. Philadelphia: Saunders. 1973; p. 237-281.
220. Pigatto PD, Minoia C, Ronchi A, Brambilla L, Ferrucci SM, Spadari F, Pasoni M, Somalvico F, Bombeccari GP, Guzzi G. Allergological and Toxicological aspects in a multiple chemical sensitivity cohort. *Oxid Med Cell Longev*. 2013; 2013: 356235.
221. Pinon-Zarate G, Rodriguez-Lara V, Rojas-Lemus M, Martinez-Pedraza M, Gonzalez-Villalva A, Mussali-Galante P, Fortoul TI, Barquet A, Masso F, Montano LF. Vanadium pentoxide inhalation provokes germinal center hiperplasia and suppressed humoral immune responses. *J Immunotoxicol*. 2008; 5(2):115-22.
222. Pontoriero R, Tonelli MP, Carnevale G, Mombelli A, Nyman SR, Lang NP. Experimentally induced peri-implant mucositis. A clinical study in humans. *Clin Oral Implants Res*. 1994; 5(4):254-9.
223. Preston J D, Berger R. Some Laboratory variables affecting ceramo-metal alloys. *Dent Clin North Am*. 1977; 21(4):717-728.
224. Prystupa A, Kiciński P, Luchowska-Kocot D, Błażewicz A, Niedziałek J, Mizerski G, Jojczuk M, Ochal A, Sak JJ, Załuska W. Association between Serum Selenium Concentrations and Levels of Proinflammatory and Profibrotic Cytokines-Interleukin-6 and Growth Differentiation Factor-15, in Patients with Alcoholic Liver Cirrhosis. *Int J Environ Res Public Health*. 2017; 14(4).
225. Puchyr RF, Bass DA, Gajewski R, Calvin M, Marquardt W, Urek K, Druyan ME, Quig D. Preparation of hair for measurement of elements by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS). *Biol Trace Elem Res*. 1998; 628(3):167-82.

226. Quig D. Cysteine metabolism and metal toxicity. *Altern Med Rev.* 1998; 3(4):262-70.
227. Raimond Ch, Williams C. *Química*. 7ª ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2003.
228. Rajae M, Sánchez BN, Renne EP, Basu N. An Investigation of Organic and Inorganic Mercury Exposure and Blood Pressure in a Small-Scale Gold Mining Community in Ghana. *Int J Environ Res Public Health.* 2015; 12(8):10020-38.
229. Rajan R, Sun YM. Reevaluating Antidepressant Selection in Patients With Bruxism and Temporomandibular Joint Disorder. *J Psychiatr Pract.* 2017; 23(3):173-179.
230. Ramseier CA, Eick S, Bronnimann C, Buser D, Bragger U, Salvi GE. Host-derived biomarkers at teeth and implants in partially edentulous patients. A 10-year retrospective study. *Clin Oral Implants Res.* 2016; 27(2):211-7.
231. Rao SK, Bhat M, David J. Work, Stress, and Diurnal Bruxism: A pilot Study among Information Technology Professionals in Bangalore City, India. *Int J Dent.* 2011; 2011; 650489.
232. Recker EN, Ávila-Ortiz G, Fischer CL, et al. A cross-sectional assessment of biomarker levels around implants versus natural teeth in periodontal maintenance patients. *J Periodontol.* 2015; 86:264-272.
233. Renvert S, Roos-Jansaker AM, Lindhal C, Renvert H, Persson G. Infection at titanium implants with or without a clinical diagnosis of inflammation. *Clin Oral Implants Res.* 2007; 18(4):509-16.
234. Richardson GM, Wilson R, Allard D, Purtill C, Douma S, Gravière J. Mercury exposure and risks from dental amalgam in the US population, post-2000. *Sci Total Environ.* 2011; 409(20):4257-68.
235. Richter C. Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes. *Chem Phys Lipids.* 1987; 44:175-89.
236. Roberts HW, Berzins DW, Moore BK, Charlton DG. Metal-Ceramic Alloys in Dentistry: a review. *J Prosthodont.* 2009; 18(2):188-94.

237. Roberts HW, Charlton DG. The release of mercury from amalgam restorations and its health effects: a view. *Oper Dent*. 2009; 34(5): 605-14.
238. Roche E, Romero-Alvira D. Changes in DNA induced by oxidative stress. *Med Clin*. 1996; 106:144-53.
239. Rollerova E, Tulinska J, Liskova A, Kuricova M, Kovriznych J, Miynarcikova A, Kiss A, Scsukova S. Titanium dioxide nanoparticles: some aspects of toxicity/focus on the development. *Endocr Regul*. 2015; 49(2):97-112.
240. Roos-Jansaker AM, Renvert H, Lindahl C, Renvert S. Nine to fourteen year follow-up of implant treatment. Part II: factors associated with periimplant lesions. *J Clin Periodontol*. 2006; 33:296-301.
241. Rosenberg ES, Cho SC, Elian N, Jalbout ZN, Froum S, Evian CI. A comparison of characteristics of implant failure and survival in periodontally compromised and periodontally healthy patients: a clinical report. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2004; 19(6):873-79.
242. Ryder KM, Shorr RI, Bush AJ, Kritchevsky SB, Harris T, Stone K, Cauley J, Tyllavsky FA. Magnesium intake from food and supplements is associated with bone mineral density in healthy older white subjects. *J Am Geriatr Soc*. 2005; 53(11):1875-80.
243. Saha MK, Agrawal P, Saha SG, Vishwanathan V, Pathak V, Saiprasad SV, Dhariwal P, Dave M. Evaluation of Correlation between Salivary Calcium Alkaline Phosphatase and Osteoporosis. A Prospective, Comparative and Observational Study. *J Clin Diagn Res*. 2017; 11(3):ZC63-ZC66.
244. Sánchez-Siles M, Lucas-Azorin J, Salazar-Sánchez N, Carbonell-Meseguer L, Camacho-Alonso F. Salivary Concentration of Oxidative Stress Biomarkers in a Group of Patients with Peri-Implantitis: A Transversal Study. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2016; 18(5):1015-1022.
245. Savery LC, Viñas R, Nagy AM, Pradeep P, Merrill SJ, Hood AM, Malghan SG, Goering PL, Brown RP. Deriving a provisional tolerable intake for intravenous exposure to silver nanoparticles released from medical devices. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2017; 85:108-118.

246. Schamschula RG, Bunzel M, Agus HM, Adkins BL, Barmes DE, Charlton G. Plaque minerals and caries experience: associations and interrelationships. *J Dent Res.* 1978; 57(3):427-32.
247. Sheuhammer AM. The chronic toxicity of aluminium, cadmium, mercury, and lead in birds: a review. *Environ Pollut.* 1987; 46(4):263-95.
248. Schou S, Holmstrup P, Worthington HV, Esposito M. Outcome of implant therapy in patients with previous tooth loss due to periodontitis. *Clin Oral Implants Res* 2006; 17 Suppl 2:104-23.
249. Schroeder H. *The Trace Elements and Man*, Devin-Adair Company, 1975.
250. Sedarat C, Harmand MF, Naji A, Nowzari H. In vitro kinetic evaluation of titanium alloy biodegradation. *J Periodontal Res.* 2001; 36(5): 269-74.
251. Seethal HS, Uma K, Rao K, Priya NS, Umadevi HS, Smitha T. A quantitative analysis of mast cells in inflammatory periapical and gingival lesions. *J Contemp Dent Pract.* 2014; 15:300-05.
252. Sevenian A, Hochstein P. Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Annu Rev Nutr.* 1985; 5:365-90.
253. Severino VO, Beghini M, de Araújo MF, de Melo ML, Miguel CB, Rodrigues WF, de Lima Pereira SA. Expression of IL-6, IL-10, IL-17 and IL-33 in the peri-implant crevicular fluid of patients with peri-implant mucositis and peri-implantitis. *Arch Oral Biol.* 2016; 72:194-199.
254. Shi H, Magaye R, Castranova V, Zhao J. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Part Fibre Toxicol.* 2013; 10:15.
255. Shraim A, Alsuhami A, Al-Thakafy JT. Dental clinics: a point pollution source, not only of mercury but also of other amalgam constituents. *Chemosphere.* 2011; 84:1133-9.
256. Sicilia A, Cuesta S, Coma G, Arregui I, Guisasola C, Ruiz E, Maestro A. Titanium allergy in dental implant patients: a clinical study on 1500 consecutive patients. *Clin Oral Implants Res.* 2008; 19(8):823-835.

257. Sies H, Arteel GE. Interaction of peroxynitrite with selenoproteins and glutathione peroxidase mimics. *Free Radic Biol Med.* 2000; 28(10):1451-5.
258. Simic M, Taylor K. Introduction to peroxidation and antioxidation mechanisms. *Basic Life Sci.* 1998; 49:1-10.
259. Soares S, Martins H, Gutiérrez-Merino C, Aureliano M. Vanadium and cadmium in vivo effects in teleost cardiac muscle: metal accumulation and oxidative stress markers. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2008 Mar; 147(2):168-78.
260. Solsona C, Kahn TB, Badilla CL, Álvarez-Zaldiernas C, Blasi J, Fernandez JM, Alegre-Cebollada J. Altered thiol chemistry in human amyotrophic lateral sclerosis linked mutants of superoxide dismutase 1. *J Biol Chem.* 2014; 289(39):26722-32.
261. Somers EC, Ganser MA, Warren JS, Basu N, Wang L, Zick SM, Park SK. Mercury Exposure and Antinuclear Antibodies among Females of Reproductive Age in the United States: NHANES. *Environ Health Perspect.* 2015; 123:792-8.
262. Soussa E, Shalaby Y, Maria AM, Maria OM. Evaluation of oral tissue response and blood levels of mercury released from dental amalgam in rats. *Arch Oral Biol.* 2013; 58:981-8.
263. Stadtman ER, Starke-Reed PE, Oliver CN, Carney JM, Floyd RA. Protein modification in aging. *EXS* 1992; 62:64-72.
264. Stejskal V, Ockert K, Bjørklund G. Metal-induced inflammation triggers fibromyalgia in metal-allergic patients. *Neuro Endocrinol Lett.* 2013; 34:559-65.
265. Barcza Stockler-Pinto M, Carrero JJ, De Carvalho Cardoso WeideL, Franciscato Cozzolino SM, Mafra D. Effect of selenium supplementation via Brazil Nut (*Bertholletia Excelsa*, HBK) on thyroid hormones levels in hemodialysis patients: a pilot study. *Nutr Hosp* 2015; 32 (n04):1803-1812.
266. Stohs SJ, Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med.* 1995; 18(2):321-36.

267. Strietzel FP, Reichart PA, Kale A, Kulkarni M, Wegner B, Kuchler I. Smoking interferes with the prognosis of dental implant treatment: a systematic review and metaanalysis. *J Clin Periodontol* 2007; 34:523-44.
268. Sundaram G, Ramakrishnan T, Parthasarathy H, Moses J, Lalitha T. Evaluation of Micronutrient (Zinc, Magnesium, and Copper) Levels in Serum and Glycemic Status after Nonsurgical Periodontal Therapy in Type 2 Diabetic Patients with Chronic Periodontitis. *Contemp Clin Dent*. 2017; 8(1):26-32.
269. Svensson S, Trobos M, Hoffman M, Norlindh B, Petronis S, Lausmaa J, Suska F, Thomsen P. A novel soft tissue model for biomaterial-associated infection and inflammation-bacteriological, morphological and molecular observations. *Biomaterials*. 2015; 41:106-21.
270. Takemoto AS, Berry MJ, Bellinger FP. Role of seleno protein P in Alzheimer's disease. *Ethn Dis*. 2010; 20(S1):S1-92-5.
271. Thewes M, Kretschmer R, Gfesser M, Rakoski J, Nerlich M, Borelli S, Ring J. Immunohistochemical characterization of the perivascular infiltrate cells in tissues adjacent to stainless steel implants compared with titanium implants. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2001; 121(4):223-6.
272. Thierse HJ, Gamerding K, Junkes C, Guerreiro N, Weltzien HU. T cell receptor (TCR) interaction with haptens: metal ions as non-classical haptens. *Toxicology*. 2005; 209(2):101-7.
273. Thomas P, Summer B. Diagnosis and management of patients with allergy to metal implants. *Expert Rev Clin Immunol*. 2015; 11:501-9.
274. Thomas P, Iglhaut G, Wollenberg A, Cadosh D, Summer B. Allergy or tolerance: reduced inflammatory cytokine response and concomitant IL-10 production of lymphocytes and monocytes in symptom-free titanium dental implant patients. *Biomed Res Int*. 2013; 2013:539834.
275. Tiwari V, Chopra K. Resveratrol prevents alcohol induced cognitive deficits and brain damage by blocking inflammatory signalling and cell death cascade in neonatal rat brain. *J Neurochem*. 2011; 117(4):678-90.
276. Toering TJ, Gant CM, Visser FW, van der Graaf AM, Laverman GD, Danser AHJ, Faas MM, Navis G, Lely AT. Gender Differences in Renin

- Angiotensin Aldosterone System Affect Extra Cellular Volume in Healthy Subjects. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2017; 7: ajprenal.00109.2017.
277. Tonetti MS, Claffey N. Advances in the progression of periodontitis and proposal of definitions of a peri-odontitis case and disease progression for use in risk factor research. Group C consensus report of the 5th European Workshop in Periodontology. *J Clin Periodontol* 2005; 32(6):210-213.
278. Tsuji JS, Williams PR, Edwards MR, Allamneni KP, Kelsh MA, Paustenbach DJ, Sheehan PJ. Evaluation of mercury in urine as an indicator of exposure to low levels of mercury vapor. *Environ Health Perspect*. 2003; 111(4):623-30.
279. UNEP (United Nations Environment Programme). Minamata Conventional greed by nations. United Nations Environment Programme. [Http://www.unep.org/newscentre/default.aspx? Document ID= 2702& Article ID=9373](http://www.unep.org/newscentre/default.aspx?DocumentID=2702&ArticleID=9373). Accessed 26 Dec 2013.
280. USEPA (United States Environmental Protection Agency). Mercury study report to the congress, 1997; EPA 452/R-97-0003. Washington: USEPA.
281. Valenzuela A. The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. *Life Sci*. 1991; 48:301-09.
282. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007; 39(1):44-84.
283. Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem*. 2005; 12(10):1161-208.
284. Valko M, Jomova K, Rhodes CJ, Kuča K, Musílek K. Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Arch Toxicol*. 2016; 90(1):1-37.
285. Vallés G, Gil-Garay E, Munuera L, Vilaboa N. Modulation of the cross-talk between macrophages and osteoblasts by titanium-based particles. *Biomaterials*. 2008; 29(15):2326-35.

286. Vallés G, González-Melendi P, González-Carrasco JL, Saldaña L, Sánchez-Sabaté E, Munuera L, Vilaboa N. Differential inflammatory macrophage response to rutile and titanium particles. *Biomaterials*. 2006; 27(30):5199-211.
287. Vanaelst B, Michels N, Huybrechts I, Clays E, Flórez MR, Balcaen L, Resano M, Aramendia M, Vanhaecke F, Rivet N, Raul JS, Lanfer A, De Henauw S. Cross-sectional relationship between chronic stress and mineral concentrations in hair of elementary school girls. *Biol Trace Elem Res*. 2013; 153(1-3):41-9.
288. Van del Veen BS, de Winther MP, Heeringa P. Myeloperoxidase: molecular mechanism of action and their relevance to human health and disease. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11:2899-937.
289. Varkey M, Shetty R, Hegde A. Mercury exposure levels in children with dental amalgam fillings. *Int J Clin Pediatr Dent*. 2014; 7:180-5.
290. Venugopal B, Luckey TP. Toxicology of non-radioactive heavy metals and their salts. *Environ Qual Saf Suppl*. 1975; 1:4-73, 104-14.
291. Venugopal A, Muthuchamy N, Tejani H, Gopalan AI, Lee KP, Lee HJ, Kyung HM. Incorporation of silver nanoparticles on the surface of orthodontic microimplants to achieve antimicrobial properties. *Korean J Orthod*. 2017; 47(1):3-10.
292. Wataha J. Alloys for prosthodontic restorations. *J Prosthet Dent*. 2000; 87(4):351-363.
293. Wataha, J. Biocompatibility of dental casting alloys: A review. *J Prosthet Dent*. 2000; 83 (2):223-233.
294. Watts DL, Trace Elements and Other Essential Nutrients, T.E.I., 1995.
295. Weffers H, Sies H. The protection by ascorbate and glutathione against microsomal lipid peroxidation is dependent on vitamin E. *Eur J Biochem*. 1988; 174:353-57.
296. Welander M, Abrahamsson I, Berglundh T. The mucosal barrier at implant abutments of different materials. *Clin Oral Implants Res*. 2008; 19:635-41.140.

297. White JM, Powell AM, Brady K, Russell-Jones R. Severe generalized argyria secondary to ingestion of colloidal silver protein. *Clin Exp Dermatol.* 2003; 28(3):254-6.
298. WHO (World Health Organization). Environmental health criteria 101 methylmercury. Geneva: WHO; 1990.
299. Willis MS, Monaghan SA, Miller ML, McKenna RW, Perkins WD, Levinson BS, Bhushan V, Kroft SH. Zinc-induced copper deficiency: a report of three cases initially recognized on bone marrow examination. *Am J Clin Pathol.* 2005; 123(1):125-31.
300. Wolff SP, Dean RT. Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of "autoxidative glycosylation" in diabetes. *Biochem J* 1987; 245:243-50.
301. Xiao X, Yuan D, Wang YX, Zhan XA. The protective effects of different sources of maternal selenium on oxidative stressed chick embryo liver. *Biol Trace Elem Res.* 2016; 172(1):201-8.
302. Guo CY, Matinlinna JP, Tang AT. Effects of surface charges on dental implants: past, Present, and future. *Int J Biomater.* 2012. 2012;381535.
303. Yano JM, Yu K, Donaldson GP, Shastri GG, Ann P, Ma L, Nagler CR, Ismagilov RF, Mazmanian SK, Hsiao EY. Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. *Cell.* 2015; 9,161(2): 264-76.
304. Yilmaz MI, Sonmez A, Caglar K, Celik T, Yenicesu M, Eyileten T, Acikel C, Oguz Y, Yavuz I, Vural A. Effect of antihypertensive agents on plasma adiponectin levels in hypertensive patients with metabolic syndrome. *Nephrology (Carlton).* 2007; 12(2):147-53.
305. Yoneda S, Suzuki KT. Equimolar Hg-Se complex binds to selenoprotein P. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 231(1):7-11.
306. Young AH. Lithium for long-term treatment of unipolar depression. *Lancet Psychiatry.* 2017; 4(7):511-512.

307. Zaffe D, Bertoldi C, Consolo U. Element release from titanium devices used in oral and maxillo facial surgery. *Biomaterials*. 2003; 24(6):1093-9.
308. Zhang X, Li W, Yang Z, Toxicology of nanosized titanium dioxide: an update. *Arch Toxicol*. 2015; 89(12):2207-17.
309. Zitzmann N, Berglundh T, Marinello C, Lindhe J. Experimental peri-implant mucositis in man. *Journal of Clinical Peridontology*. 2011; 28:217-23.
310. Zitzmann N, Berglundh T. Definition and prevalence of peri-implant diseases. *Journal of Clinical Peridontology*. 2008; 8(35):286-91.
311. Zwicker JD, Dutton DJ, Emery JC. Longitudinal analysis of the association between removal of dental amalgam, urine mercury and 14 self-reported health symptoms. *Environ Health*. 2014; 18:13-95.



ANEXOS

8 ANEXOS

8.1 ANEXO

DECLARACION DE HELSINKI DE LA ASOCIACION MÉDICA MUNDIAL

Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos

Adoptada por la

18ª Asamblea Médica Mundial, Helsinki, Finlandia, junio 1964

y enmendada por la

29ª Asamblea Médica Mundial, Tokio, Japón, octubre 1975

35ª Asamblea Médica Mundial, Venecia, Italia, octubre 1983

41ª Asamblea Médica Mundial, Hong Kong, septiembre 1989

48ª Asamblea General Somerset West, Sudáfrica, octubre 1996

52ª Asamblea General, Edimburgo, Escocia, octubre 2000

Nota de Clarificación del Párrafo 29, agregada por la Asamblea General de la AMM,

Washington 2002

Nota de Clarificación del Párrafo 30, agregada por la Asamblea General de la AMM,

Tokio 2004

59ª Asamblea General, Seúl, Corea, octubre 2008

A. INTRODUCCION

1. La Asociación Médica Mundial (AMM) ha promulgado la Declaración de Helsinki como una propuesta de principios éticos para investigación médica en seres humanos, incluida la investigación del material humano y de información

identificables.

La Declaración debe ser considerada como un todo y un párrafo no debe ser aplicado sin considerar todos los otros párrafos pertinentes.

2. Aunque la Declaración está destinada principalmente a los médicos, la AMM insta a otros participantes en la investigación médica en seres humanos a adoptar estos principios.

3. El deber del médico es promover y velar por la salud de los pacientes, incluidos los que participan en investigación médica. Los conocimientos y la conciencia del médico han de subordinarse al cumplimiento de ese deber.

4. La Declaración de Ginebra de la Asociación Médica Mundial vincula al médico con la fórmula "velar solícitamente y ante todo por la salud de mi paciente", y el Código Internacional de Ética Médica afirma que: "El médico debe considerar lo mejor para el paciente cuando preste atención médica".

5. El progreso de la medicina se basa en la investigación que, en último término, debe incluir estudios en seres humanos. Las poblaciones que están subrepresentadas en la investigación médica deben tener un acceso apropiado a la participación en la investigación.

6. En investigación médica en seres humanos, el bienestar de la persona que participa en la investigación debe tener siempre primacía sobre todos los otros intereses.

7. El propósito principal de la investigación médica en seres humanos es comprender las causas, evolución y efectos de las enfermedades y mejorar las intervenciones preventivas, diagnósticas y terapéuticas (métodos, procedimientos y tratamientos).

Incluso, las mejores intervenciones actuales deben ser evaluadas continuamente

a través de la investigación para que sean seguras, eficaces, efectivas, accesibles y de calidad.

8. En la práctica de la medicina y de la investigación médica, la mayoría de las intervenciones implican algunos riesgos y costos.

9. La investigación médica está sujeta a normas éticas que sirven para promover el respeto a todos los seres humanos y para proteger su salud y sus derechos individuales. Algunas poblaciones sometidas a la investigación son particularmente vulnerables y necesitan protección especial. Estas incluyen a los que no pueden otorgar o rechazar el consentimiento por sí mismos y a los que pueden ser vulnerables a coerción o influencia indebida.

10. Los médicos deben considerar las normas y estándares éticos, legales y jurídicos para la investigación en seres humanos en sus propios países, al igual que las normas y estándares internacionales vigentes. No se debe permitir que un requisito ético, legal o jurídico nacional o internacional disminuya o elimine cualquiera medida de protección para las personas que participan en la investigación establecida en esta Declaración.

B. PRINCIPIOS PARA TODA INVESTIGACION MÉDICA

11. En la investigación médica, es deber del médico proteger la vida, la salud, la dignidad, la integridad, el derecho a la autodeterminación, la intimidad y la confidencialidad de la información personal de las personas que participan en investigación.

12. La investigación médica en seres humanos debe conformarse con los principios científicos generalmente aceptados y debe apoyarse en un profundo conocimiento de la bibliografía científica, en otras fuentes de información pertinentes, así como en experimentos de laboratorio correctamente realizados y en animales, cuando sea oportuno. Se debe cuidar también del bienestar de los

animales utilizados en los experimentos.

13. Al realizar una investigación médica, hay que prestar atención adecuada a los factores que puedan dañar el medio ambiente.

14. El proyecto y el método de todo estudio en seres humanos debe describirse claramente en un protocolo de investigación. Este debe hacer referencia siempre a las consideraciones éticas que fueran del caso y debe indicar cómo se han considerado los principios enunciados en esta Declaración. El protocolo debe incluir información sobre financiamiento, patrocinadores, afiliaciones institucionales, otros posibles conflictos de interés e incentivos para las personas del estudio y estipulaciones para tratar o compensar a las personas que han sufrido daños como consecuencia de su participación en la investigación. El protocolo debe describir los arreglos para el acceso después del ensayo a intervenciones identificadas como beneficiosas en el estudio o el acceso a otra atención o beneficios apropiados.

15. El protocolo de la investigación debe enviarse, para consideración, comentario, consejo y aprobación, a un comité de ética de investigación antes de comenzar el estudio. Este comité debe ser independiente del investigador, del patrocinador o de cualquier otro tipo de influencia indebida.

El comité debe considerar las leyes y reglamentos vigentes en el país donde se realiza la investigación, como también las normas internacionales vigentes, pero no se debe permitir que éstas disminuyan o eliminen ninguna de las protecciones para las personas que participan en la investigación establecidas en esta Declaración. El comité tiene el derecho de controlar los ensayos en curso. El investigador tiene la obligación de proporcionar información del control al comité, en especial sobre todo incidente adverso grave. No se debe hacer ningún cambio en el protocolo sin la consideración y aprobación del comité.

16. La investigación médica en seres humanos debe ser llevada a cabo sólo por personas con la formación y calificaciones científicas apropiadas. La investigación

en pacientes o voluntarios sanos necesita la supervisión de un médico u otro profesional de la salud competente y calificada apropiadamente. La responsabilidad de la protección de las personas que toman parte en la investigación debe recaer siempre en un médico u otro profesional de la salud y nunca en los participantes en la investigación, aunque hayan otorgado su consentimiento.

17. La investigación médica en una población o comunidad con desventajas o vulnerable sólo se justifica si la investigación responde a las necesidades y prioridades de salud de esta población o comunidad y si existen posibilidades razonables de que la población o comunidad, sobre la que la investigación se realiza, podrá beneficiarse de sus resultados.

18. Todo proyecto de investigación médica en seres humanos debe ser precedido de una cuidadosa comparación de los riesgos y los costos para las personas y las comunidades que participan en la investigación, en comparación con los beneficios previsibles para ellos y para otras personas o comunidades afectadas por la enfermedad que se investiga.

19. Todo ensayo clínico debe ser inscrito en una base de datos disponible al público antes de aceptar a la primera persona.

20. Los médicos no deben participar en estudios de investigación en seres humanos a menos de que estén seguros de que los riesgos inherentes han sido adecuadamente evaluados y de que es posible hacerles frente de manera satisfactoria. Deben suspender inmediatamente el experimento en marcha si observan que los riesgos que implican son más importantes que los beneficios esperados o si existen pruebas concluyentes de resultados positivos o beneficiosos.

21. La investigación médica en seres humanos sólo debe realizarse cuando la importancia de su objetivo es mayor que el riesgo inherente y los costos para la



persona que participa en la investigación.

22. La participación de personas competentes en la investigación médica debe ser voluntaria. Aunque puede ser apropiado consultar a familiares o líderes de la comunidad, ninguna persona competente debe ser incluida en un estudio, a menos que ella acepte libremente.

23. Deben tomarse toda clase de precauciones para resguardar la intimidad de la persona que participa en la investigación y la confidencialidad de su información personal y para reducir al mínimo las consecuencias de la investigación sobre su integridad física, mental y social.

24. En la investigación médica en seres humanos competentes, cada individuo potencial debe recibir información adecuada acerca de los objetivos, métodos, fuentes de financiamiento, posible conflictos de intereses, afiliaciones institucionales del investigador, beneficios calculados, riesgos previsibles e incomodidades derivadas del experimento y todo otro aspecto pertinente de la investigación. La persona potencial debe ser informada del derecho de participar o no en la investigación y de retirar su consentimiento en cualquier momento, sin exponerse a represalias. Se debe prestar especial atención a las necesidades específicas de información de cada individuo potencial, como también a los métodos utilizados para entregar la información. Después de asegurarse de que el individuo ha comprendido la información, el médico u otra persona calificada apropiadamente debe pedir entonces, preferiblemente por escrito, el consentimiento informado y voluntario de la persona. Si el consentimiento no se puede otorgar por escrito, el proceso para lograrlo debe ser documentado y atestiguado formalmente.

25. Para la investigación médica en que se utilice material o datos humanos identificables, el médico debe pedir normalmente el consentimiento para la recolección, análisis, almacenamiento y reutilización. Podrá haber situaciones en las que será imposible o impracticable obtener el consentimiento para dicha



investigación o podría ser una amenaza para su validez. En esta situación, la investigación sólo puede ser realizada después de ser considerada y aprobada por un comité de ética de investigación.

26. Al pedir el consentimiento informado para la participación en la investigación, el médico debe poner especial cuidado cuando el individuo potencial está vinculado con él por una relación de dependencia o si consiente bajo presión. En una situación así, el consentimiento informado debe ser pedido por una persona calificada adecuadamente y que nada tenga que ver con aquella relación.

27. Cuando el individuo potencial sea incapaz, el médico debe pedir el consentimiento informado del representante legal. Estas personas no deben ser incluidas en la investigación que no tenga posibilidades de beneficio para ellas, a menos que ésta tenga como objetivo promover la salud de la población representada por el individuo potencial y esta investigación no puede realizarse en personas competentes y la investigación implica sólo un riesgo y costo mínimos.

28. Si un individuo potencial que participa en la investigación considerado incompetente es capaz de dar su asentimiento a participar o no en la investigación, el médico debe pedirlo, además del consentimiento del representante legal. El desacuerdo del individuo potencial debe ser respetado.

29. La investigación en individuos que no son capaces física o mentalmente de otorgar consentimiento, por ejemplo los pacientes inconscientes, se puede realizar sólo si la condición física/mental que impide otorgar el consentimiento informado es una característica necesaria de la población investigada. En estas circunstancias, el médico debe pedir el consentimiento informado al representante legal. Si dicho representante no está disponible y si no se puede retrasar la investigación, el estudio puede llevarse a cabo sin consentimiento informado, siempre que las razones específicas para incluir a individuos con una enfermedad que no les permite otorgar consentimiento informado hayan sido estipuladas en el

protocolo de la investigación y el estudio haya sido aprobado por un comité de ética de investigación. El consentimiento para mantenerse en la investigación debe obtenerse a la brevedad posible del individuo o de un representante legal.

30. Los autores, directores y editores todos tienen obligaciones éticas con respecto a la publicación de los resultados de su investigación. Los autores tienen el deber de tener a la disposición del público los resultados de su investigación en seres humanos y son responsables de la integridad y exactitud de sus informes. Deben aceptar las normas éticas de entrega de información. Se deben publicar tanto los resultados negativos e inconclusos como los positivos o de lo contrario deben estar a la disposición del público..En la publicación se debe citar la fuente de financiamiento, afiliaciones institucionales y conflictos de intereses. Los informes sobre investigaciones que no se ciñan a los principios descritos en esta Declaración no deben ser aceptados para su publicación.

C. PRINCIPIOS APLICABLES CUANDO LA INVESTIGACION MEDICA SE COMBINA CON LA ATENCION MÉDICA

31. El médico puede combinar la investigación médica con la atención médica, sólo en la medida en que tal investigación acredite un justificado valor potencial preventivo, diagnóstico o terapéutico y si el médico tiene buenas razones para creer que la participación en el estudio no afectará de manera adversa la salud de los pacientes que toman parte en la investigación.

32. Los posibles beneficios, riesgos, costos y eficacia de toda intervención nueva deben ser evaluados mediante su comparación con la mejor intervención probada existente, excepto en las siguientes circunstancias:

- El uso de un placebo, o ningún tratamiento, es aceptable en estudios para los que no hay una intervención probada existente.
- Cuando por razones metodológicas, científicas y apremiantes, el uso de un

placebo es necesario para determinar la eficacia y la seguridad de una intervención que no implique un riesgo, efectos adversos graves o daño irreversible para los pacientes que reciben el placebo o ningún tratamiento. Se debe tener muchísimo cuidado para evitar abusar de esta opción.

33. Al final de la investigación, todos los pacientes que participan en el estudio tienen derecho a ser informados sobre sus resultados y compartir cualquier beneficio, por ejemplo, acceso a intervenciones identificadas como beneficiosas en el estudio o a otra atención apropiada o beneficios.

34. El médico debe informar cabalmente al paciente los aspectos de la atención que tienen relación con la investigación. La negativa del paciente a participar en una investigación o su decisión de retirarse nunca debe perturbar la relación médico-paciente.

35. Cuando en la atención de un enfermo las intervenciones probadas han resultado ineficaces o no existen, el médico, después de pedir consejo de experto, con el consentimiento informado del paciente o de un representante legal autorizado, puede permitirse usar intervenciones no comprobadas, si, a su juicio, ello da alguna esperanza de salvar la vida, restituir la salud o aliviar el sufrimiento. Siempre que sea posible, tales intervenciones deben ser investigadas a fin de evaluar su seguridad y eficacia. En todos los casos, esa información nueva debe ser registrada y, cuando sea oportuno, puesta a disposición del público.



8.2 FIGURAS

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Metales base y nobles utilizados en aleaciones en Odontología 4
Figura 2: Tabla periódica de Mendeléyev 9
Figura 3: Metales y Oligoelementos estudiados en la presente Tesis 18
Figura 4: Sistemas antioxidantes con capacidad detoxificante en la célula 79
Figura 5: Adaptado de Andersen JK. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? <i>Natre Medicine</i> 10 Suppl: S18-S25, 2004. 79
Figura 6: Ilustración de folículo de pelo. Adaptado de Sobotta. <i>Histología. 3º Edición. 2014. Editorial Panamericana.</i> 84
Figura 7: Resultados de muestras de metales tóxicos y oligoelementos en pelo 87
Figura 8: Descripción de la muestra de estudio 99
Figura 9: Imagen intraoral de muestra grupo (A) 100
Figura 10: Imagen intraoral y radiovisiografía de muestra grupo (A+I) 101
Figura 11: Ejemplo de Rx Panorámica de grupo (A+I). 102
Figura 12: Ejemplo de Rx Panorámica de grupo (A). 102
Figura 13: Ejemplo de Rx Panorámica de grupo control (Cont). 102
Figura 14: Ejemplo ilustrativos de niveles de metales pesado/oligoelementos en pelo medidos por espectrometría de masas (ICP-MS) 106
Figura 15: placa de ELISA de 96 pocillos para la detección de IL-1 Beta o MCP-1	... 111
Figura 16: Reactivos (estándares y anticuerpos primarios y secundarios para la determinación de IL-1 beta y MCP-1 en plasma) 112
Figura 17: Representación esquemática del fundamento de las técnicas de ELISA....	113
Figura 18: Niveles más bajos de Glutación reducido y aumento de plata (Ag) en grupo (A+I) frente a grupo (A) 118
Figura 19: Incremento de peroxidación lipídica (TBARS) en grupo (A+I) frente a grupo (A) y grupo (Cont), respectivamente 119
Figura 20: Niveles significativos más altos de IL-1 Beta y de MCP-1 en grupo (A+I) frente a grupo (A) y controles (Cont) 120
Figura 21: Aumento significativo de plata (Ag), cobalto (Co) y níquel (Ni) en grupo (A+I) frente a grupo (A) 123
Figura 22: Reducidos niveles de selenio (Se) y bajos ratios Se/Hg, Se/Ag en grupo (A+I) frente a grupo (A) 125



Figura 23: <i>El ratio Se/Ag decrece en grupo (A+I) frente a grupo (A)</i> 126
Figura 24: <i>Correlaciones estadísticamente significativas entre metales pesados (Hg,Ag,Pb) y sus ratios Se/metal pesado</i> 126
Figura 25: <i>posibles interrelaciones entre aumentos de metales pesados (Ag,Co) y susceptibilidad al estrés oxidativo y a la inflamación sistémica en (A+I)</i> 127
Figura 26: <i>Niveles de calcio (Ca⁺⁺) significativamente más elevados en (A+I) frente a controles (Cont)</i> 130
Figura 27: <i>Niveles reducidos de boro (B) en grupo (A+I) frente a grupo (A)</i> 131
Figura 28: <i>Niveles de estroncio (Sr) significativamente más elevados en (A+I) frente a controles (Cont)</i> 132
Figura 29: <i>Niveles de litio (Li) y rubidio (Rb) significativamente más bajos en (A+I) frente a grupo (A).</i> 134
Figura 30: <i>Niveles significativamente más altos de magnesio (Mg⁺⁺), sodio (Na⁺) y potasio (K⁺) en grupo (A+I) frente a grupo (A)</i> 136
Figura 31: <i>Niveles significativamente más altos de bario (Ba) en grupo (A+I) frente a grupo (A) y controles (Cont)</i> 138

8.3 TABLAS

Tabla 1. *Estrés Oxidativo: sistemas antioxidantes y mecanismo de actuación* (pag. 76).

Tabla 2. *Medias y error relativo de los niveles de metales pesados ($\mu\text{g/g}$ de pelo) en portadores de implantes dentales y amalgamas (A+I) frente a portadores únicamente de amalgamas dentales (A)* (pag. 122).

Tabla 3. *Valores medios y error relativo de una serie de oligoelementos relacionados con funciones metabólicas medidos por ICP-MS en pelo* (pag. 129).

Tabla 4. *Efectos sobre los niveles de litio (Li), rubio (Rb), sodio (Na^+), potasio (K^+) y Magnesio (Mg^{++})* (pag. 133).

Tabla 5. *Medias relativas a los niveles de metales pesados de exposición ambiental ($\mu\text{g/g}$ de pelo) en portadores de implantes dentales y amalgamas (A+I) frente a los portadores de amalgamas dentales (A)* (pag. 137).



8.4 GLOSARIO

Aenor: Agencia española de normalización de materiales.

Bioacumulación: El término hace referencia a la acumulación neta, con el paso del tiempo, de metales [u otras sustancias persistentes] en un organismo a partir de fuentes tanto bióticas (otros organismos) como abióticas (suelo, aire y agua).

Biocompatibilidad: Propiedad de un material o sustancia de poder implantado en un ser vivo, generalmente en el ser humano, sin producirle efectos indeseables.

Biocompatible: Que es compatible con el organismo humano. Es el material que puede ser utilizado en algún implante o prótesis.

Biomagnificación: Tendencia de algunos productos químicos a acumularse a lo largo de la cadena trófica, exhibiendo concentraciones sucesivamente mayores al ascender el nivel trófico. La concentración del producto en el organismo consumidor es mayor que la concentración del mismo producto en el organismo consumido.

Biomarcadores: Biomarcador o marcador biológico es aquella sustancia utilizada como indicador de un estado biológico. Debe poder medirse objetivamente y ser evaluado como un indicador de un proceso biológico normal, estado patogénico o de respuesta a un tratamiento farmacológico.

Biomonitorizar: La biomonitorización en humanos está definida como la estimación de la exposición a sustancias químicas presentes en el medio ambiente mediante la medida directa de dichas sustancias o de sus derivados en muestras biológicas como sangre, orina, pelo, etc.

Catalasa: Es una enzima perteneciente a la categoría de las oxidoreductasas que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en oxígeno y agua. Esta enzima utiliza como cofactor al grupo hemo y al manganeso.

Ciclo Nictemeral: Ritmo biológico de los seres vivos.

Osteointegración: Unión mecánica firme, directa, estable y duradera entre un hueso vivo y un biomaterial.

Pasivación: Formación de una película relativamente inerte, sobre la superficie de un material que lo enmascara frente a la acción de agentes externos.



Toxicidad: Es la capacidad de cualquier sustancia química de producir efectos perjudiciales sobre un ser vivo, al entrar en contacto con él.

Tóxicos: Son moléculas ajenas al organismo que pueden bloquear los mecanismos celulares. Ej: metales pesados (Cd, Plomo, Hg, etc.); contaminantes (pesticidas, detergentes, disolventes, etc.); medicamentos y contaminación electromagnética.

Toxinas: Proceden casi siempre de un organismo vivo. Pueden acumularse de eliminación en los diferentes emuntorios del organismo (piel, riñones, pulmones e intestino).

Xenobióticos: deriva del griego xeno ('extraño') y bio ('vida'). Se aplica a los compuestos cuya estructura química en la naturaleza es poco frecuente o inexistente debido a que son compuestos sintetizados por el ser humano en el laboratorio. La mayoría han aparecido en el medio ambiente durante los últimos 200 años.

Hapteno: El hapteno es una molécula de xenobióticos (exterior al cuerpo) pequeño (menos de 1000 daltons), electrofílico (electrones codicioso), capaces de cruzar fácilmente la barrera de la piel. El hapteno tiene, por definición, los grupos funcionales químicamente reactivos, de manera primaria o después de metabolismo de la piel. Por tanto, es capaz de unirse a las proteínas epidérmica grande, mediante la unión a los grupos amino de los aminoácidos que llevan (NH_2) o tiol (SH) nucleófilos, donantes de electrones. Esto conducirá a la formación de una proteína "hapténizada" o simplemente el alérgeno real, que puede ser presentado a las células inmunes específicas.

MPO: Mieloperoxidasa, es una enzima encontrada en los gránulos de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) y se utiliza para estimar el número de gránulos de PMN en los tejidos. La actividad MPO refleja indirectamente el nivel de la inflamación.



8.5 PUBLICACIONES RELACIONADAS

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Esta tesis doctoral titulada: *“Análisis comparativo de los niveles sistémicos de citocinas, lipoperóxidos y de metales pesados/oligoelementos en pelo de portadores de implantes dentales y/o amalgamas dentales”*

Ha recibido colaboración de:

➤ **CLÍNICA CIROM** (Centro de Implantología y Rehabilitación Oral Multidisciplinaria).

PUBLICACIONES RELACIONADAS CON ESTA TESIS DOCTORAL

Parmigiani-Izquierdo JM, Cabaña-Muñoz ME, Merino JJ, Sánchez-Pérez A. Zirconia implants and peek restorations for the replacement of upper molars. Int J Implant Dent. 2017 Dec; 3(1):5.

Parmigiani-Izquierdo JM, Cabaña-Muñoz ME. “Peek. Alternativa a aleaciones metálicas en la boca. Odontología sin metal”. Revista Maxillaris. Mayo 2015. p. 160-171.

Cabaña-Muñoz ME, Parmigiani-Izquierdo JM, Parmigiani- Cabaña JM, Merino JJ. Safe Removal of Amalgam Fillings in Dental Clinic: Use of Synergic Nasal Filters (Active Carbon) and Phytonaturals. International Journal of Science and Research (IJSR). March 2015. Volume 4 Issue 3, Pag.2391-95.

Cabaña-Muñoz ME, Parmigiani-Izquierdo JM, Bravo-González LA, Kyung HM, Merino JJ. Increased Zn/Glutathione Levels and Higher Superoxide Dismutase-1 Activity as Biomarkers of Oxidative Stress in Women with Long-Term Dental

Amalgam Fillings: Correlation between Mercury/Aluminium Levels (in Hair) and Antioxidant Systems in Plasma. Plos One 2015; 15; 10(6): e0126339.

Parmigiani-Izquierdo JM, Sánchez-Pérez A, Cabaña-Muñoz ME. A pilot study of postoperative pain felt after two implant surgery techniques: a randomized blinded prospective clinical study. Int J Oral Maxillofac Implants. 2013; Sep-Oct; 28(5):1305-10.

Cabaña Muñoz ME, Parmigiani Izquierdo JM. Contribución de los microimplantes a la Ortodoncia. En: Padrós Serrat E. Bases diagnósticas, terapéuticas y posturales del funcionalismo craneofacial. Tomo III. Madrid: editorial Ripano; 2012. p. 2088-99.

Cabaña-Muñoz ME, Parmigiani-Izquierdo JM. Tesina “Ventajas de los microimplantes a la Ortodoncia. Peek, alternativa a metales en boca”. Máster de Terapia Neural y Odontología Neurofocal. EUI Sant Joan de Deu-Universitat de Barcelona, 2012-2014.