



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS
EN ODONTOLOGÍA
“DR. KEISABURO MIYATA”**

**DETECCIÓN DE POLIMORFISMOS
DEL GEN GLUTATIÓN S-TRANSFERASA
EN INDIVIDUOS CON CARIES
EXPUESTOS OCUPACIONALMENTE A PLAGUICIDAS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS**

P R E S E N T A

E. EN E. MARIANA GABRIELA LECOURTOIS AMÉZQUITA

TUTOR ACADÉMICO

DR. EN E. P. ALBERTO SALGADO VALDÉS

TUTOR ADJUNTO

DRA EN C.Q.B JULIETA CASTILLO CADENA

TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO. AGOSTO 2013



DEDICATORIA

*Para empezar un gran proyecto, hace falta valentía.
Para terminar un gran proyecto, hace falta perseverancia.*

A mis padres.

Con mucho cariño por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, sobre todo la espiritual. Con sus ejemplos de perseverancia me han enseñado seguir adelante, pero más que nada, por su amor incondicional. Los admiro por ser unos grandes luchadores

A mi esposo.

Por siempre estar a mi lado, brindándome todo su amor, y siempre motivándome nunca me dejaste caer y sobre todo por tenerme mucha comprensión y paciencia durante estos años de mi vida. Mil gracias porque siempre estas a mi lado sin condiciones.

Mis maestros.

Dra. Julieta Castillo Cadena por su gran apoyo, motivación y paciencia que siempre me ofreció, fue un gusto y honor haber trabajado con usted. Dr. Alberto Salgado Valdés por su disponibilidad en todo momento y por impulsar el desarrollo de esta investigación. Dr. Angel Visoso Salgado por su tiempo compartido y apoyo ofrecido en este trabajo e impulsar el desarrollo de nuestra formación profesional.

INDICE

I. RESUMEN.....	4
II. INTRODUCCIÓN.....	7
III. ANTECEDENTES.....	7
1. La Caries.....	7
1.1 Factores etiológicos	8
1.2 Clasificación de caries.....	15
1.3 Diagnóstico de caries dental	16
2. Los Plaguicidas.....	16
2.1. Toxicidad de los plaguicidas.....	17
2.2. Clasificación de los plaguicidas.....	17
2.3. Uso de plaguicidas en la floricultura.....	19
2.4. Genotoxicidad por plaguicidas.....	20
2.5. Susceptibilidad por exposición a plaguicidas.....	22
3. Polimorfismos Genéticos.....	23
3.1 Polimorfismos de Nucleótido Sencillo (SNP).....	23
3.2 Polimorfismos de Secuencias Repetidas (VNTR).....	23
3.3. Polimorfismos de la glutatión S-transferasa.....	24
3.4 Identificación de polimorfismos genéticos.....	28
3.5. Polimorfismos de la GST y exposición a plaguicidas.....	29
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	31
V. JUSTIFICACIÓN.....	32
VI. HIPÓTESIS.....	33
VII. OBJETIVOS.....	34
VIII. DISEÑO METODOLÓGICO	35
8.1. Diseño de la Investigación.....	35
8.2. Población y/o universo.....	35
8.3. Límites de espacio y tiempo.....	35
8.4. Muestreo.....	35
8.5. Criterios de selección.....	35

8.6. Operación de variables.....	37
8.7. Materiales.....	42
8.8. Métodos.....	43
8.8.1. Aplicación de cuestionario.....	43
8.8.2. Toma de muestras.....	43
8.8.3. Identificación de caries.....	43
8.8.4. Genotipificación.....	44
8.8.5. Detección de polimorfismos.....	44
8.9. Instrumentos de recolección de información.....	48
8.10. Levantamiento y análisis de la información.....	49
IX. RESULTADOS.....	50
9.1. Artículo científico.....	50
9.2. Resultados Generales.....	72
9.2.1. Características sociodemográficas.....	72
9.2.2. Hábitos higiénicos y dieta cariogénica.....	72
9.2.3. Determinación de caries.....	74
9.2.4. Determinación de los polimorfismos de GST.....	74
9.2.5. Resultados del uso de plaguicidas.....	76
9.2.6. Correlación de variables.....	78
9.2.7. Modelo de regresión.....	79
X. DISCUSIÓN.....	81
XI. CONCLUSION.....	86
XII. BIBLIOGRAFÍA.....	87
XIII. ANEXOS.....	95

I. RESUMEN

Se realizó un estudio transversal comparativo para identificar los Polimorfismos de la glutatión S-transferasa que presentan los floricultores expuestos ocupacionalmente a plaguicidas y conocer si existe alguna asociación con la presencia de caries dental.

La ocurrencia y progresión de la caries, es influenciada tanto por factores ambientales como por genéticos, sin embargo, es habitual que la atención se centre en los ambientales y los debidos a la carga génica, que eventualmente pueden explicar las diferencias individuales, han sido poco explorados.

Los individuos se ven expuestos diariamente a múltiples compuestos que representan un factor de riesgo para la salud, como son los plaguicidas, los cuales se emplean para la prevención, control y destrucción de plagas, erradicación de vectores propagadores de enfermedades, etc. Sin embargo, también se les ha asociado con daños a la salud, como genotoxicidad e inmunotoxicidad.

Se invitó a participar voluntariamente a floricultores de Villa Guerrero (expuestos), y a la comunidad de Toluca, México (no expuestos). Quienes aceptaron, firmaron un consentimiento informado. Se realizó diagnóstico de caries e identificación de los polimorfismos GSTM1, GSTT1, GSTP1b y GSTP1c con una PCR de punto final y enzimas de restricción.

Se encontró que en el grupo expuesto a plaguicidas la presencia del polimorfismo GSTM1 (+/+) se encuentra asociado a menor frecuencia de caries dental en 49% ($p=0.01$); así como en el grupo de los no expuestos, con 38% ($p=0.02$). En el grupo no expuesto a plaguicidas, la presencia del polimorfismo GSTT1 (+/+) se encontró asociado a menor frecuencia de caries en 38% ($p=0.05$). También se encontró asociación entre la presencia del polimorfismo silvestre GSTP1c con

menor frecuencia de caries en 39% ($p=0.05$) en el grupo expuesto; y en el grupo de los no expuestos la asociación fue del 41% ($p=0.04$). El polimorfismo GSTP1b no tuvo asociación alguna en ambos grupos con la caries.

Se realizó una correlación bivariada donde se encontró que el presentar caries en los individuos del *grupo de los expuestos*, tuvo una correlación netamente positiva con el tiempo exposición a los plaguicidas (0.217).

El presente estudio demuestra el papel genético que juegan los polimorfismos de la GST en la caries dental, pudiendo ser utilizados como biomarcadores de susceptibilidad.

II. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud define la caries dental como un proceso patológico de origen externo que se inicia después de la erupción y ocasiona un reblandecimiento del tejido duro del diente, evolucionando hacia la formación de una cavidad.

La aparición de caries dental no depende de manera exclusiva de los factores etiológicos que inciden en la cavidad bucal, sino también de la intervención adicional de otros factores que influyen definitivamente en el surgimiento y evolución de una lesión cariosa. Entre estos factores se encuentran: la salud general, nivel socioeconómico, experiencia pasada de caries, grupo epidemiológico, carga genética y contaminantes ambientales.

Por otro lado, el ser humano tiene mecanismos de protección de manera individual, de tal forma, que cada persona detoxifica del organismo los xenobióticos de forma particular, tales como las isoenzimas codificadas por los genes de susceptibilidad Glutación S-transferasa M1,T1 y P1 que son altamente polimórficos.

La presencia de polimorfismos en los genes que codifican para GST pueden alterar su función y el estudio de estos puede ayudar al entendimiento del riesgo de exposición a diferentes xenobióticos en la población. Además la presencia de polimorfismos en estas enzimas explica en parte las diferencias en cuanto a la susceptibilidad individual.

III. ANTECEDENTES

1. LA CARIES

La caries dental se encuentra entre las enfermedades más significativas que afectan al ser humano, debido a la frecuencia con la que esta aparece. Su complejidad se debe al hecho de tratarse de un proceso multifactorial, siendo una condición progresiva, costosa, provocando efectos sobre la salud e incluso efectos psicológicos.¹

La Organización Mundial de la Salud define la caries dental como un proceso patológico de origen externo que se inicia después de la erupción y ocasiona un reblandecimiento del tejido duro del diente, evolucionando hacia la formación de una cavidad.²

La concepción de la teoría quimioparasitaria de Miller en 1890, es la base etiológica primordial de la caries, en la cual afirmaba que las bacterias orales producen ácidos al fermentar los carbohidratos de la dieta y estos ácidos disuelven el esmalte. En 1960 Paul Keyes, estableció la etiología de la caries dental en un esquema compuesto por tres agentes: característica del huésped, los microorganismos y el tipo de dieta; los cuales deben interactuar entre si. Posteriormente en 1978 Newburn, añadió a la triada de Keyes el factor tiempo como un cuarto factor etiológico necesario para producir caries, en 1990 se agregó un quinto factor causal, la edad.³⁻⁶

Sin embargo, es evidente que la aparición de caries dental no depende de manera exclusiva de los factores etiológicos que inciden en la cavidad bucal, sino también de la intervención adicional de otros factores que influyen definitivamente en el surgimiento y evolución de una lesión cariosa. Entre estos factores se encuentran: la salud general, nivel socioeconómico, experiencia pasada de caries, grupo

epidemiológico, carga genética y contaminantes ambientales. Es por esto que al estudiar la etiología de la caries dental se deben considerar factores externos a la cavidad bucal, debido a que su presencia varía tanto favorable como desfavorablemente para contraer caries.^{7, 8}

En México, los resultados de la Primera Encuesta Nacional de Caries y Fluorosis dental 1996-2000 dió a conocer que el promedio del índice CPOD a la edad de 12 años fue de 2.23; en ambas anomalías se observa un alto porcentaje de caries no tratadas. Asimismo, la Encuesta Nacional de Caries Dental en el 2001 señala que la prevalencia de caries para el grupo de edad de 15 años fue de 58% y el índice CPOD de 1.91; solo en el Distrito Federal la prevalencia fue de 88.6% con un índice CPOD de 5.31.^{9, 10}

En 1993 Maupome, estudió a 2596 pacientes de zonas marginales de diferentes estados de la República Mexicana y notificó un índice CPOD de 8.3 en mayores de 15 años. Esta información es similar a la de Rivera y colaboradores del año 2006, en la que se identificó un índice CPOD de 6.8 y una prevalencia de caries de 97% en 113 estudiantes de bachillerato.^{11, 12}

1.1 Factores etiológicos

A. Los microorganismos:

La cavidad bucal contiene una de las más variadas y concentradas poblaciones microbianas del organismo. Se estima que en ella habitan más de mil especies, cada una de ellas representada por una gran variedad de cepas. Entre las bacterias presentes en la boca se encuentran tres especies principalmente relacionadas con la caries: *Streptococcus*, con la subespecies *S. mutans*, *S. sobrinus* y *S. sanguinis*; *Lactobacillus*, con las subespecies *L. casei*, *L. fermentum*, *L. plantarum* y *L. oris* y los *Actinomyces*, con las subespecies *A. israelis* y *A. naslundii*.^{13,14}

Los cúmulos de bacterias y sus productos se adhieren fuertemente a la superficie dental, dando lugar a la placa dental, mejor denominada como biofilm dental. El

biofilm constituye una comunidad bacteriana metabólicamente integrada adosada a una superficie, en una interfaz líquido-sólido. Dentro de esta estructura organizada, los microorganismos se comunican entre sí (quorum sensing), lo que involucra la regulación y expresión de genes específicos a través de moléculas de señalización; aunado a la protección que brinda el exopolímero y al estado metabólico reducido en que se encuentran las bacterias más profundas de la comunidad, hace que los anticuerpos, las células del sistema inmune y aún los antimicrobianos, se vean drásticamente limitados en su acción.^{15, 16, 17}

La capacidad de crecer y producir ácido a bajos niveles de pH es sumamente importante para que un microorganismo pueda desarrollar caries dental. El pH al cual los tejidos dentales se disuelven, conocido como pH crítico, está entre 5.3 y 5.7 a nivel adamantino y de 6.5 a 6.7 en dentina. Algunos microorganismos como *S. mutans* y *Lactobacillus*, alcanzan un excelente crecimiento a niveles de pH más bajos que otras bacterias del biofilm dental. Así, favorecidas por los bajos niveles de pH, las bacterias cariogénicas transportan rápidamente los azúcares fermentables cuando compiten con otras bacterias. Luego sintetizan polisacáridos intra y extracelulares y todo ello produce la desmineralización de la estructura adamantina.^{16, 18, 19}

B. La dieta:

Ciertas características de los alimentos azucarados (consistencia, textura, adhesión) y las condiciones en las cuales son ingeridos, son más importantes como determinantes de su potencial cariogénico que la cantidad de azúcar que ellos contengan. Los factores que establecen la cariogenicidad potencial de los alimentos azucarados son:²⁰

La consistencia física de la dieta: los alimentos adhesivos son mucho más cariogénicos que los no retentivos. Por ejemplo, una bebida azucarada (tomada rápidamente, no a traguitos) es menos cariogénica que lo que es una confitura o un dulce, independientemente de la cantidad de azúcar que ellos contengan.

Momento de la ingestión: los alimentos azucarados son más peligrosos si son consumidos entre comidas que durante ellas (postres, golosinas, etc.) Esto tiene que ver con los mecanismos de defensa naturales de la boca, que funcionan al máximo durante las comidas y tienden a eliminar los restos de alimentos que quedan en ella, neutralizando los ácidos (capacidad *buffer*) que puedan haberse formado. Por esta razón, las peores condiciones para ingerir un alimento cariogénico son inmediatamente antes de ir a acostarse, porque la boca se halla casi en reposo completo durante el sueño.

La frecuencia: tras la ingestión de azúcar se produce a los pocos minutos una reducción del pH de la placa dental que facilita la desmineralización del diente y favorece la caries, por lo que cuanto más frecuentes sean, más cariogénicos se vuelven.^{20, 21}

La sacarosa es considerada, dentro de los hidratos de carbono, el de mayor capacidad cariogénica. Se plantea que causa aproximadamente 5 veces más caries que el almidón y que favorece el desenvolvimiento de caries de superficies lisas. Además, la sacarosa favorece tanto la colonización de los microorganismos orales como la adhesividad de la placa, lo cual le permite fijarse mejor sobre el diente. Conjuntamente con la cantidad y la frecuencia de consumo de los alimentos, se deben tomar en cuenta otros factores, como la adherencia propia del alimento, que prolonga el tiempo de contacto con el diente.²²

C. La saliva:

La saliva presenta varios factores de defensas innatos y adquiridos capaces de inhibir la invasión bacteriana, crecimiento y metabolismo mediante diversos mecanismos. Sin embargo, también se han investigado varios determinantes biológicos que tienen influencia en la cariogenicidad del biofilm, como el flujo salival, al haber un constante flujo salival se eliminan eficientemente microorganismos de la cavidad oral, y contrario a esto un flujo disminuido permite fácilmente el crecimiento microbiano. El rol protector de la saliva se logra a través de las siguientes acciones: mediante la dilución y lavado de los azúcares de la

dieta diaria, neutralización y amortiguación de los ácidos de la placa dental y la provisión de iones para el proceso de remineralización.²³⁻²⁶

Ciertas proteínas salivales tienen efecto antibacteriano, como la lisosima, lactoperoxidasa, inmunoglobulinas, mucinas, lactotransferrina. La lactoferrina es un glicoproteína que inhibe el crecimiento microbiano, probablemente por secuestro de hierro. En adición, la lactoferrina libre de hierro (apolactoferrina) posee un efecto bactericida directo contra varias cepas bacterianas orales incluyendo *S. mutans*.^{24, 27-30}

D. El órgano dentario

Ciertos dientes presentan una mayor incidencia de caries, incluso las superficies dentarias de un mismo diente varían la susceptibilidad a caries. Es así como la anatomía, disposición y la oclusión de los dientes, guardan una estrecha relación con la aparición de lesiones cariosas. También las anomalías de los dientes de forma y composición contribuyen a la aparición de caries.²⁶

E. El sistema inmunitario

El sistema inmunitario actúa contra la microflora cariogénica, produciendo respuesta humoral mediante anticuerpos del tipo Inmunoglobulina A salival. Esta inmunoglobulina conforma la primera línea de defensa del huésped contra los agentes patógenos en las superficies mucosas. Los anticuerpos de la IgA salival son coadyuvantes de la inmunidad oral por la prevención de la adherencia microbiana, al neutralizar enzimas, toxinas y virus. Sin embargo, aun en la presencia de IgA sobrevive la microbiota normal de la cavidad bucal. Hasta el momento los estudios que han evaluado el rol de dicha inmunoglobulina han arrojado resultados contradictorios. Estudios *in vitro* han demostrado que la IgA puede inhibir o promover la adherencia de las bacterias a los dientes. En experimento con modelo animal han demostrado que la IgA inducida por *Streptococcus mutans*, reduce la colonización por esta bacteria, previniendo la caries. Por otro lado estudios en humanos con deficiencia de IgA, no han sido concluyentes puesto que han encontrado que dichos individuos son más o menos susceptibles a la caries dental.³¹⁻³⁷

La protección frente a las caries que se desarrolla en el dominio gingival, dependerá de la acción de la IgM e IgG, que además de inhibir la adhesión de los microorganismos a la superficie dental e inhibir la acción de la glucosiltransferasa, pueden aglutinar y opsonizar los microorganismos que serán fagocitados por los fagocitos presentes en el líquido gingival.³⁸

F. La genética

La asociación de la genética con la resistencia o bien la susceptibilidad a la caries, parte de la observación de individuos que muestran una menor tendencia a desarrollar caries, con respecto a otros en igualdad de condiciones.

En relación al papel que juega la genética en la susceptibilidad a caries se han desarrollado investigaciones en búsqueda de responsabilidades genéticas, como es el caso de Conry et al. (1993), investigaron en gemelos las responsabilidades genéticas en la susceptibilidad a la caries, mencionan que existe una contribución genética a la caries de aproximadamente 40%.³⁹

Con respecto a lo antes mencionado, Slayton et al. (2005), realizaron un estudio sobre la susceptibilidad a la caries asociada al gen tuftelin y los niveles de *S. mutans*, dicho gen está relacionado con el desarrollo adamantino y la mineralización, por lo tanto eventualmente transmite información desfavorable y ésta se asocia con altos niveles de este microorganismo finalmente se suscita un aumento en la susceptibilidad a la caries. Así mismo Kang et al. (2011), realizaron un estudio para examinar la relación entre caries dental y polimorfismo de nucleótido simple en el gen AMELX un gen que codifica la amelogenina la cual es el factor más importante para el desarrollo normal del esmalte, demostrando finalmente una asociación significativa.^{40, 41}

Considerando que ciertas características relevantes a la caries son heredables, tales como: las peculiaridades anatómicas, susceptibilidad, la progresión y la repuesta ante la inflamación; día a día surge mas información acerca del genoma

humano y aunado a esta información tenemos la posibilidad de beneficiar al resto de la población con las peculiaridades de los individuos resistentes a la enfermedad.⁴²

G. Otros factores:

El factor *tiempo* resulta determinante, cuando los factores etiológicos interactúan por un largo periodo, se produce una desmineralización, mientras que si la interacción se da en un periodo más corto, dichos fenómenos no tendrían oportunidad de ocurrir.⁴

Las implicaciones del *estado de salud* en la susceptibilidad a caries tiene una repercusión importante ya que siempre se debe considerar al paciente en su totalidad y no solo tratar la cavidad bucal, considerando que ciertas enfermedades y medicamentos pueden disminuir el flujo salival, o bien reducir las defensas del organismo, en consecuencia el individuo será más susceptible a desarrollar caries dental.¹

La composición de la microbiota oral varía con la *edad* del huésped. Los cambios relacionados con la edad en la microflora oral incluyen aquellos debidos a la erupción dental, los hábitos dietéticos, hormonales, el flujo salival, estado del sistema inmune y otros factores.¹

La cavidad oral al nacer es considerada estéril, sin embargo, entre las 6 a 10 horas microorganismos de la madre y una menor cantidad de los microorganismo presentes en el ambiente se establecen en la cavidad oral. Durante el primer año de vida la microbiota oral contiene Streptococcus, Neisseria, Veillonella, Staphylococcus, y en menor grado Actinomyces, Lactobacillus, Rothia, Fusobacterium y Prevotella. Algunas especies como S. sanguis y S. mutans colonizan la cavidad oral solo después de erupcionados los dientes deciduos.^{43, 44,}

45

Estudios indican que el siguiente cambios drástico se da en la tercera edad ya que aumenta la prevalencia de staphilococos, lactobacilos, y después de los 80 años existe un aumento en la presencia de *Candida albicans*. Considerando que los cambios que se dan en la tercera edad no están relacionados con prótesis, medicamentos, o enfermedades crónicas, sino por una disminución del flujo salival, una disminución es la función del sistema inmune o deficiencias nutricionales.⁴⁶⁻⁴⁹

El *estilo de vida* también parece estar relacionado con esta patología. Wigen et al. (2011), reportaron la asociación entre el estilo de vida materna durante el embarazo y la experiencia de caries en los niños en edad preescolar, encontraron indicadores significativos en la madre como el consumo de una dieta alta en grasa y azúcar, sobrepeso, o con bajo nivel de estudios, como riesgosos para la experiencia de caries a la edad de 5 años.⁵⁰

Los *cambios hormonales* que se dan durante la pubertad y en el embarazo provocan un aumento en los niveles de hormonas esteroideas en plasma y subsecuentemente en el líquido crevicular y saliva. También existen antecedentes de la asociación de estos cambios hormonales con un aumento en la inflamación gingival, acompañado de exudado gingival. Kornman et al. (1982) reportaron un aumento en la presencia de *Prevotella intermedia* en la microbiota subgingival en mujeres embarazadas, asociado a un aumento en los niveles de estrógeno y progesterona en el plasma.⁵¹⁻⁵⁴

Se ha reportado la asociación entre el *medio ambiente* y la incidencia de caries, tal es el caso de la investigación realizada por Aligne et al. (2003), en la cual examinaron la relación entre caries y los niveles de cotinina en suero como resultado de ser fumador pasivo; encontrando una asociación positiva entre el humo de tabaco en el ambiente y el riesgo de caries en dientes deciduos.⁵⁵

Se han estudiado otros contaminantes del ambiente y su posible relación en la incidencia de caries como el reporte de Jan et al. (2008), en el cual estudiaron los

efectos de la concentración de bifenilos policlorados (PCB) en la leche materna, en la caries dental en niños de 9 a 10 años en las islas Faroe, Dinamarca. Realizaron un análisis de regresión multivariado cuyos resultados demostraron que la exposición a los PCB estaba relacionada con la susceptibilidad a caries.⁵⁷

1.2 Clasificación de caries

Las cavitaciones que ocasiona la desmineralización producida por la caries se clasifican de acuerdo a ciertas variables, como son: localización, complejidad y progreso, esto con el fin de dar un mejor diagnóstico y una correcta terapéutica. Se ha clasificado la caries clínicamente considerando diversos criterios:^{58, 59, 60}

- Localización en la pieza dentaria:
 - Lesión de fosas y fisuras
 - Lesión de superficies lisas
- Por superficie anatómica:
 - Oclusal: superficie masticatoria de las piezas posteriores.
 - Incisal: superficie cortante de las piezas anteriores.
 - Proximal: superficie mesial o distal de todas las piezas dentarias.
 - Cervical: tercio cervical o gingival de la pieza dentaria
 - Caras libres: vestibular, palatino/lingual de todas las piezas dentarias.
 - Combinación de superficies: ocluso-mesial, ocluso-distal, etc.
- El número de superficies que abarca:
 - Simples. Lesiones que abarcan una superficie dentaria.
 - Compuestas. Aquellas que involucran dos caras de un diente.
 - Complejas. Estas lesiones abarcan tres o más superficies del diente.
- Estadio:
 - Activa
 - Detenida
- La profundidad de la lesión:
 - Lesión no cavitada. Cuando la desmineralización se encuentra limitada a la superficie del esmalte, sin ser una cavidad.
 - Lesión superficial. La profundidad esta circunscrita al esmalte.
 - Lesión moderada. Llega mínimamente a la dentina

- Lesión profunda. Alcanza un extenso compromiso de la dentina.
- Lesión profunda con compromiso pulpar. Alcanza mínima exposición pulpar.
- De acuerdo a la velocidad de progresión de la lesión:
 - Lesión aguda. La lesión progresa rápidamente desde su primera manifestación clínica hasta comprometer la dentina y pudiendo llegar a producir comunicación pulpar.
 - Lesión crónica. Este tipo de lesión progresa lentamente, es más común en adultos, y el dolor no es un rasgo característico.^{58, 59, 60}

1.3 Diagnóstico de caries dental

Para el diagnóstico de la caries dental, como en toda enfermedad, es de gran importancia que se realice cuanto más temprano sea posible. Sin embargo, es difícil detectar lesiones cariosas en su estadio más precoz, debido a que su presentación es asintomática y clínicamente se presenta como una lesión incipiente, además se puede formar en zonas donde la inspección es limitada, como por ejemplo en la zona interproximal.⁶¹

El diagnóstico clínico es el más acertado para detectar lesiones cariosas y se puede realizar con diversos métodos como son: la inspección visual, transiluminación, método de conductividad eléctrica, y método de fluorescencia laser.⁶¹

2. PLAGUICIDAS

Los plaguicidas son cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de organismos causantes de enfermedades humanas o de los animales, las especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción.⁶²

El uso irracional de los plaguicidas causa efectos colaterales, su baja especificidad en adición a su potencial, aumenta su acción tóxica contra otros organismos,

incluyendo humanos. El amplio espectro de los efectos que los plaguicidas tienen sobre la salud involucran: daño agudo y persistente en el sistema nervioso, respiratorio y endocrino; teniendo también capacidad de actuar como mutagénicos y carcinógenos. La exposición humana a los plaguicidas ocurre en caso de los trabajadores de en campo abierto, invernaderos, trabajadores industriales y exterminadores de plagas, por ejemplo cuando se preparan las mezclas de estos sin las medidas de protección necesarias. Sin embargo la población que no se encuentra en contacto directo se encuentra en riesgo al estar expuestos indirectamente, como por ejemplo alimentos contaminados.^{64, 65, 66}

2.1 Toxicidad de los plaguicidas

La toxicidad ocasionada por los plaguicidas depende de la forma en que ingresa el compuesto al cuerpo humano. Las tres vías principales son:⁶³

- a. Vía Oral. Dicho tóxico puede ser deglutido y pasar al tracto gastrointestinal, siguiendo hacia el sistema hepático y al circulatorio desde donde puede ser eliminado; pero también puede ser devuelto por el sistema circulatorio hacia el hígado, pasando por la vía biliar y volver al tubo digestivo para ser eliminado, reabsorbido o bien, pasar a sitios de depósito.⁶³
- b. Vía parenteral. Comprende distintas puertas de entrada, tales como la venosa, intraperitoneal, conjuntival, dérmica, muscular y subcutánea. En todas ellas el destino de la sustancia será el sistema circulatorio, para luego ser eliminada o depositarse en el organismo.⁶³
- c. Vía inhalatoria. El tóxico ingresa por la vía aérea o pulmonar y de acuerdo con el tamaño y presión va ser filtrado hasta los alvéolos, de donde puede pasar al torrente sanguíneo.⁶³

2.2 Clasificación de los plaguicidas

- A. Por su naturaleza química:
 - a. Inorgánicos
 - b. Orgánicos
 - c. Naturales (botánicos y microbianos)

- d. Sintéticos
- B. Por su mecanismo de acción:
 - a. Contacto
 - b. Ingestión
 - c. Fumigante
 - d. Sistémicos
- C. Por el tipo de organismo que afectan:
 - a. Insecticidas
 - b. Acaricidas
 - c. Fungicidas
 - d. Herbicidas⁶³

2.2.1 Plaguicidas organoclorados:

En la categoría de plaguicidas orgánicos sintéticos están incluidos los organoclorados (OC). Estos plaguicidas se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente terrestre y acuático, como resultado de que en las últimas dos décadas han sido utilizados constantemente para combatir plagas en la industria, la agricultura, e incluso durante las campañas de salud donde han sido aplicados para contrarrestar enfermedades como la malaria.⁶²

Debido a que los OC son compuestos orgánicos hidrofóbicos tienden a acumularse en el tejido adiposo de los organismos. Como todos los organismos contienen lípidos, captan fácilmente plaguicidas lipofílicos del suelo y del medio ambiente. Tardiff et al. (1994), han encontrado niveles solubles en grasa de OC de 10 a 1000. Ante una nutrición deficiente o de inanición, los depósitos adiposos se movilizan y los OC se liberan hacia el torrente sanguíneo, con posibilidad de producir efectos tóxicos si la concentración alcanza cierto nivel. Todos los OC producen alteraciones metabólicas al desencadenar la formación de enzimas y tienen efectos neurológicos ocasionando lesiones del sistema central.^{62, 67}

2.2.2 Plaguicidas tiocarbamatos:

Los tiocarbamatos son utilizados para proteger semillas, plantas ornamentales, vegetales y frutas. La intoxicación provoca irritación de las membranas mucosas del aparato respiratorio y también es irritante para los ojos. Este tipo de plaguicidas inhiben la enzima acetaldehído deshidrogenasa, la cual es necesaria para la conversión de acetaldehído a ácido acético, y este proceso es la base para la reacción Antabuse, la cual ocurre cuando una persona que tome una dosis de disulfiram consume alcohol, esta reacción produce síntomas como náusea, vómito, jaqueca, confusión mental, disnea, dolor abdominal y torácico, sudoración profusa, y rash. Los mismos síntomas han sido reportados en trabajadores que consumieron alcohol antes de exponerse a estos plaguicidas.⁶⁸

2.2.3 Plaguicidas organofosforados

Los plaguicidas organofosforados son ampliamente usados actualmente. Son utilizados en la agricultura, floricultura, en la práctica veterinaria, incluso en los hogares. La vía de intoxicación que producen estos plaguicidas se da principalmente por la fosforilación de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) en las terminaciones nerviosas. La acción de dicha enzima es crítica para el control normal de la transmisión del impulso nervioso de fibras nerviosas de células del músculo liso, esquelético, glandular y en el sistema nervioso. En el sistema nervioso central, las altas concentraciones de esta enzima provocan incoordinación, y depresión de la función motora, así como también del sistema respiratorio. El aumento de la secreción pulmonar en conjunto con falla respiratoria son las causas usuales de muerte por envenenamiento de estos plaguicidas.⁶⁸

2.3 Uso de plaguicidas en la floricultura

La actividad florícola, en su conjunto, representa además de una alternativa económica importante para la comunidad, una actividad compleja que requiere un análisis cuidadoso en relación con otros aspectos como el ambiental y social.⁶⁸

En el Estado de México el cultivo de flores se desarrolla principalmente, en los municipios de: Tenancingo, Coatepec Harinas, Ixtapan de la Sal, Tonalico,

Zumpahuacán, Texcoco y Villa Guerrero conocidos como “el corredor florícola”. Solamente Villa Guerrero genera el 56% de la producción total estatal. Se estima que en 2005 se reportaron más de 2100 millones de pesos, que representan el 84.5% del valor de la producción nacional. De las hectáreas cultivadas, 88% se realiza a cielo abierto y 12% bajo invernadero.^{68, 69}

Según datos del INEGI, en México el 60% de los 22 plaguicidas son considerados como perjudiciales para la salud y el medio. De ellos el 42% se fabrican en el país. De 90 plaguicidas que han sido cancelados o restringido en los Estados Unidos 30 aun se siguen usando en México.⁷⁰

De acuerdo a información de Instituto de Salud del Estado de México (ISEM), en el periodo de 1993-2002 se registraron 739 casos de intoxicación en la entidad, de ellos el 48.9% se ubicaron en los principales municipios productores de flor. En el 2006 se registraron 118 intoxicaciones por plaguicida en el estado, de ellos 53 ocurrieron en la jurisdicción de Tenancingo, de acuerdo al sistema de registro semanal de nuevos casos de intoxicación de la dirección de epidemiología del ISEM.⁶⁹

El Servicio de información toxicológica reporto en el periodo enero-octubre de 2005 un total de 268 casos de intoxicación atendidos a través de este sistema a nivel nacional, el mayor numero de intoxicaciones fue de tipo accidental (54.1%) y laboral (20.5%). Los principales grupos químicos de plaguicidas involucrados en los casos de intoxicación los representaron los organofosforados con un 3%, carbamatos con un 19%. El Estado de México ocupó el segundo lugar en el número de casos reportados con un total de 24, después de Chiapas con 30 casos reportados.⁶⁹

2.4 Genotoxicidad por plaguicidas

El hecho de que los plaguicidas sean empleados en mezclas o simultáneamente con otros compuestos, hace que puedan tener diferentes efectos genotóxicos

aditivos, sinérgicos y potenciadores. Los plaguicidas además de tener acción mutagénica, también pueden estimular una acción carcinogénica y teratogénica. La variedad de los efectos genotóxicos originados por los plaguicidas depende de varios factores, tales como el ingrediente activo del compuesto, las impurezas, los metabolitos originados, la ruta de absorción, la duración y frecuencia de la exposición y la acumulación del plaguicida en diferentes tejidos.⁶³

Los plaguicidas pueden interactuar con los centros nucleofílicos de las macromoléculas, como el DNA y ocasionar cambios en su estructura, este tipo de lesiones como los aductos o las intercalaciones pueden causar la muerte de la célula afectada o ser reparados por sistemas enzimáticos. La célula cuenta con varios mecanismos de reparación para los diferentes tipos de daños en el DNA. Sin embargo, no son reparadas estas lesiones o han sido reparadas incorrectamente, por lo que se expresan mutaciones después de la división celular.⁶³

Las mutaciones pueden ser de origen genético, como por ejemplo: son microlesiones, cambios de sustitución o adición y delección de bases en la constitución de nucleótidos; o cromosómicas las cuales pueden ser numéricas, estas son macrolesiones observables a través del análisis citogenético de los cromosomas y se refieren a la ganancia o pérdida de uno o varios cromosomas, o bien cambios estructurales de los cromosomas, inducidos por lesiones en el DNA no reparadas o mal reparadas y expresados como delecciones, fracturas, rearreglos de tipo cromosómico o cromatídico.⁶³

Varona et al. (2003), determinaron la frecuencia de alteraciones citogenéticas y deficiencias en la reparación del ADN en células sanguíneas de 31 trabajadoras voluntarias de cultivos de flores en Bogotá, Colombia con riesgo de exposición ocupacional a plaguicidas y 30 sin ese riesgo. El promedio de edad de las mujeres fue de 36.4 años y el tiempo promedio por exposición a cultivos de flores era de 12 años. En los ensayos citogenéticos se encontró que el grupo expuesto presentó frecuencias mayores de células con aberraciones cromosómicas y micronúcleos,

que el grupo no expuesto, con diferencias significativas. Así mismo, Paz y Miño et al. (2002), evaluaron a 41 agricultores expuestos a una amplia variedad de plaguicidas e igual número de no expuestos como grupo control en Ecuador. En el grupo expuesto que incluyó 28 hombres y 3 mujeres se encontró que la frecuencia de aberraciones cromosómicas fue 30 veces mayor en el grupo expuesto.^{71, 72}

2.5 Susceptibilidad por exposición a plaguicidas

Los genotipos son responsables de las diferencias interindividuales para activar o detoxificar los agentes genotóxicos y son considerados como biomarcadores de susceptibilidad. Entre los genes que participan en el metabolismo de mutágenos está relacionado el citocromo P450 y la glutatión S-transferasa, que convierten los carcinógenos o mutágenos inactivos a sus formas genotóxicas. Muchos de estos genes son polimórficos en poblaciones humanas y explican diversas diferencias interindividuales observadas en respuesta genotóxica con biomarcadores o enfermedades.⁷³

Puede haber una mayor expresión de variantes alélicas específicas, las cuales dan lugar a individuos que son malos metabolizadores. Estos individuos pueden estar expuestos a riesgo cuando la toxicidad de un fármaco dependa de la dosis, si la forma no metabolizada de este es farmacológicamente activa y el medicamento se acumula en el cuerpo al repetir la dosis, también puede ocurrir lo opuesto, cuando se transcriben dos o más copias de un gen, lo que conduce a producir cantidades superiores de la proteína activa y a una velocidad de metabolismo acelerada de los sustratos propios de esta forma; por lo tanto estos individuos son metabolizadores rápidos o extensivos.⁷⁴

Los plaguicidas organofosforados son metabolizados primariamente por el citocromo hepático P450 para convertirse en un oxon-organofosforado intermediario activo. Este intermediario activo es posteriormente hidrolizado por paraoxonasa a dietil fosfato y 4-nitrofenol, o conjugado a glutatión, con la subsecuente catálisis de varias glutatión S-transferasas (GSTs).^{75, 76, 77}

3. POLIMORFISMOS GENETICOS

Un polimorfismo consiste en las variaciones que se presenta entre individuos de una misma especie, ya sea al nivel genético o a nivel de proteínas. Estas variaciones genéticas pueden ser originadas por errores en los mecanismos de replicación y reparación del DNA, así como por factores ambientales. El estudio de estas variaciones tiene diversas aplicaciones en el campo de la medicina así como en el desarrollo de investigaciones biológicas y de evolución.^{78, 79, 80}

3.1 Polimorfismos de Nucleótido Sencillo (SNP)

Uno de los polimorfismos más estudiados y más frecuentes es la variación de una sola base (SNP single nucleotide polymorphism) en forma de inserción/delección. Esto debido a la existencia de aproximadamente 10 millones de SNP en el genoma humano. La mayoría de los SNP's tienen dos alelos los cuales están representados por una sustitución de base por otra. En las poblaciones, este tipo de alelos se clasifican en alelo "silvestre" y alelo mutante. Debido a que los humanos son diploides, un individuo puede tener uno de tres genotipos: homocigoto para el alelo más frecuente, heterocigoto, u homocigoto para el alelo menos frecuente. GSTP1 pertenece a este tipo de polimorfismos.^{79, 80}

3.2 Polimorfismos de Secuencias Repetidas (VNTR)

Los VNTR (variable number of tandem repeats) son conocidos como VNTR-minisatélites, VNTR-microsatélites o STR (short tandem repeats). Ambos casos presentan un número variable de repeticiones en tándem.⁷⁹

Los minisatélites son loci que corresponden a secuencias de ADN de unas pocas decenas de nucleótidos repetidas en tándem. El número de dichas repeticiones varía de cromosoma a cromosoma, de forma que en un cromosoma el número de repeticiones en tándem puede ser de 10, en otro de 15, en otro de 22, etc. En este tipo de polimorfismos cada loci puede presentar muchos alelos distintos (tantos como repeticiones), sin embargo, presentan el inconveniente de que no están distribuidos por todo el genoma.⁷⁹

Los VNTR-minisatélites han encontrado su máxima aplicación en la determinación de la paternidad, mientras que los VNTR-microsatélites son utilizados en el diagnóstico genético, debido a la repetición en tándem de secuencias de 2 a 5 nucleótidos. Los microsatélites presentan dos características que los hacen ideales para su uso. La primera es que están distribuidos por todo el genoma y la segunda, presentan un número elevado de alelos con frecuencias similares entre sí, de forma que la probabilidad de que un individuo sea heterocigoto es muy elevada (alta heterocigosis).⁷⁹

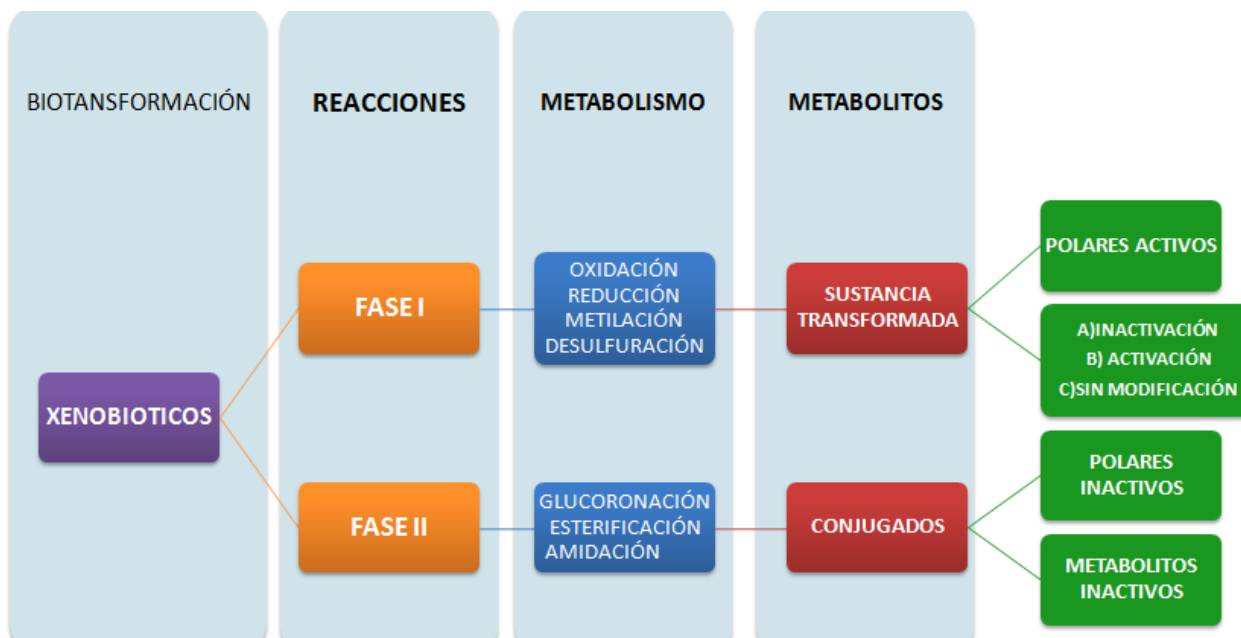
3.3 Polimorfismos de la glutatión S-transferasa

La familia de las enzimas glutatión S-transferasa (GST) se encuentran en todas las células eucariotas, representa el mayor grupo de la fase II de la biotransformación de xenobióticos (Figura 1). Las GSTs actúan como enzimas detoxificantes por su habilidad para catalizar la conjugación de los compuestos electrofílicos con el glutatión, también tiene un papel importante en la depuración de radicales libres, y por lo tanto, protege a la célula de los efectos nocivos del estrés oxidativo.^{73, 79}

En humanos las isoenzimas de esta familia se han identificado en diferentes tejidos y órganos como, riñón, pulmón, intestino, piel, cerebro, sangre, corazón, músculo e hígado, en este último pueden llegar a constituir hasta un 4% de las proteínas totales.⁸¹

El interés farmacológico y toxicológico de este gen se debe a que su expresión se ve incrementada significativamente en las células tumorales de mamíferos, es por esto que se ha relacionado con la resistencia al tratamiento de diferentes tipos de cáncer. También se les ha relacionado con enfermedades del corazón y neurodegenerativas, como el Parkinson y Alzheimer. Siendo consideradas actualmente como una respuesta evolutiva de las células al estrés oxidativo.^{81, 82, 83}

Figura 1. Proceso de Biotransformación



La presencia de polimorfismos en los genes que codifican para GSTs pueden alterar su función y el estudio de estos puede ayudar al entendimiento del riesgo de exposición a diferentes xenobióticos en la población, sub-población e individual. Además la presencia de polimorfismos en estas enzimas explica en parte las diferencias en cuanto a la susceptibilidad individual.⁸¹

Se clasifican en ocho clases, Alfa (α), Mu (μ), Pi (π), Kappa (κ), Theta (θ), Omega (ω), Sigma (ϵ) y Zeta (ζ); en mamíferos se clasifican en seis subclases, Alpha, Mu, Pi, Theta, Omega y Zeta. Con base en la similitud de la estructura primaria de aminoácidos existen como homodímeros o como heterodímeros, tienen una masa molecular de aproximadamente 25 kDa por subunidad.^{83, 84, 85}

Algunas de las isoenzimas que codifican estos genes son:

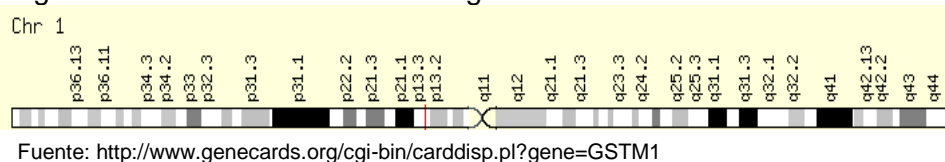
a) GSTM1 (μ):

La secuencia de este gen está conformado por cinco regiones, M1, M2, M3, M4 y M5, siendo el M1 hasta ahora el más estudiado, el cual está ubicado en el cromosoma 1, región p13.3 (Figura 2), está formado por 8 exones, tiene una longitud de 4.2 kb. y es polimórfico, ya que cuenta con 4 variantes

alélicas: A, B, C y 0 (alelo nulo). Entre los posibles polimorfismos que presenta, GSTM1 nulo es el más frecuente. Las deleciones homocigóticas de GSTM1 nulo dan lugar a la ausencia de la actividad enzimática.^{83, 86}

Estudios epidemiológicos han propuesto que los individuos que portan genotipo nulo para este gen o sea deleción en ambos alelos, tienen un mayor riesgo de desarrollar cáncer de pulmón, vejiga, colon y mama.^{83, 86}

Figura 2. Gen GSTM1 localización genómica

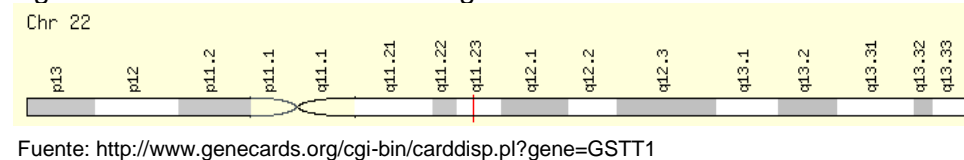


b) GSTT1 (Θ):

La secuencia de este gen se encuentra ubicado en el cromosoma 22, región p11.2 (Figura 3), está conformado por cinco exones y se encuentra flanqueado por dos regiones homologas HA3 y HA5. Es polimórfico y posee dos variantes, GSTT1 silvestre y GSTT1 0 o nulo. Este último polimorfismo es consecuencia de una recombinación homóloga de las regiones HA3 y HA5 que dan como resultado una deleción de 5.4 kb y en consecuencia la enzima no se traduce.^{83, 86, 87}

Se ha demostrado que esta clase participa en la desintoxicación de plaguicidas y son considerados como factor influyente en el desarrollo de cáncer de piel. Por lo tanto, los individuos homocigotos para GSTT1 nulo, tienen un mayor riesgo de desarrollar cáncer.⁸³

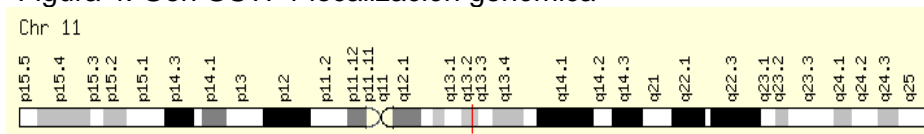
Figura 3. Gen GSTT1 localización genómica



c) GSTP1 (π):

La secuencia de este gen se localiza en el cromosoma 11, región q13 (Figura 4), está conformado por nueve exones, tiene una longitud aproximada de 3 kb. Es polimórfico, cuenta con tres variantes alélicas: GSTP1a, alelo silvestre; GSTP1b, ubicado en el exon 5 y es resultado de una mutación en el codón 104 de ATC (Ile) a GTC (Val); GSTP1c, la cual posee la misma mutación en el codón 104 que GSTP1b, pero cuenta con una segunda mutación ubicada en el exón 6, en el codón 113 de GCG (Ala) a GTG (Val).^{81, 86, 88, 89}

Figura 4. Gen GSTP1 localización genómica



Fuente: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GSTP1>

Ha sido reportado que las personas que cuentan con los polimorfismos GSTP1b y GSTP1c tienen un mayor riesgo a desarrollar diferentes tipos de patologías, debido a que las proteínas codificadas por los alelos mutantes influyen en la actividad enzimática, en su capacidad de metabolizar agentes carcinógenos y medicamentos contra el cáncer, ya que cada uno otorga distinta estabilidad térmica y afinidad por el sustrato. Esto se debe a que las enzimas traducidas de los polimorfismos GSTP1b y GSTP1c mostraron desviaciones significativas en las distancias interatómicas de los puntos electrófilos de unión a aminoácidos, como consecuencia del intercambio de aminoácidos.^{89, 90}

Wenten et al y Oliviera et al, reportaron que existe un aumento en el riesgo de padecer cáncer de vejiga, cabeza, laringe, mama, piel, colón, estómago, pulmón y testículos, en individuos homocigotos para GSTP1b y GSTP1c, en comparación con los individuos homocigotos para GSTP1a con base a la identificación de la sobreexpresión de las variantes mutantes. Estos resultados reflejan que las variantes b y c tienen una eficiencia catalítica menor que la variante GSTP1a.^{94, 100}

3.4 Identificación de Polimorfismos Genéticos

Las técnicas empleadas para determinar polimorfismos son muy diversas, la secuenciación de ADN es la prueba de oro para la detección de polimorfismos, pero resulta muy costosa, por lo que se han desarrollado diferentes métodos para realizar este tipo de identificación. Uno de estos métodos es la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR, acrónimo inglés de Polymerase Chain Reaction), es una de las técnicas de biología molecular que han revolucionado la investigación y a la sociedad.⁹¹

Desarrollada por Kary Mullis en 1986, la PCR tiene múltiples aplicaciones y variantes, que la hacen prácticamente ilimitada; entre ellas sobresalen:

- Simplifica muchos experimentos de ingeniería genética.
- Permite muchos estudios de expresión genética.
- Secuenciación directa de secuencias amplificadas.
- Detección de mutaciones.
- Seguimiento de la efectividad de tratamiento de enfermedades.
- Diagnósticos de enfermedades genéticas e infecciosas.
- En ciencia forense: identificación de restos biológicos, determinación de paternidad, pruebas periciales en criminalística.
- En arqueología y paleontología.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es un procedimiento *in vitro* para la amplificación selectiva de una secuencia de ADN específica, no mayor de 6 Kb, dentro de un conjunto heterogéneo de secuencias de ADN. Esta técnica tiene dos aplicaciones fundamentales: clonación y mutagénesis de ADN *in vitro*.^{91, 92}

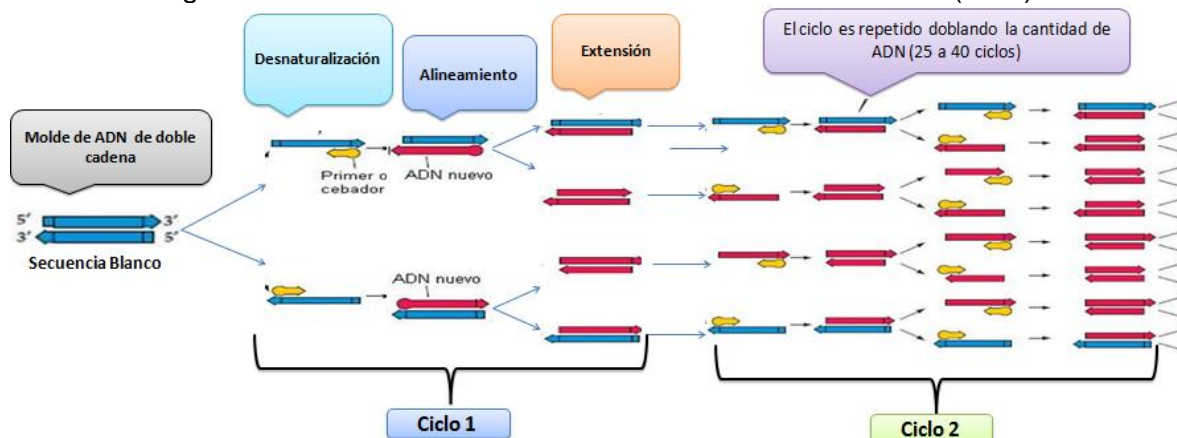
La PCR utiliza oligonucleótidos sintéticos llamados primers o iniciadores, estos deben ser diseñados con base en la secuencia del fragmento de ADN blanco. Regularmente son de una longitud entre 18-25 nucleótidos, tienen una composición de 40% a 60% de G-C y complementarios. En presencia de una ADN

polimerasa termoestable y desoxinucleotidos trifosfatados (dNTPs), inician la síntesis de nuevas cadenas.^{91, 92}

La reacción consiste en tres ciclos secuenciales; primero la desnaturalización del ADN que se lleva a cabo de 93-95°C; segundo el alineamiento de los primers, la cual se realiza entre los 50 a 70°C; por último la síntesis de una nueva cadena complementaria de ADN que por lo general utiliza temperaturas de 70 a 75°C. La PCR es una reacción en cadena porque las hebras de ADN recién sintetizado actuarán como ADN blanco para la síntesis de nuevas cadenas de ADN.^{91, 92}

La cantidad de ADN amplificado mediante esta técnica se visualiza fácilmente mediante electroforesis en gel de agarosa. En la Figura 5 se muestra la secuencia de las tres reacciones sucesivas llevadas a cabo a distintas temperaturas durante la PCR.⁹²

Figura 5. Pasos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)



3.5 Polimorfismos de GST y exposición a plaguicidas

Pocos estudios en México han explorado los polimorfismos genéticos de GSTs y su asociación con daño al DNA en trabajadores expuestos a plaguicidas. Como es el caso del reportado por Singh et al. (2011), en el cual evaluaron los efectos genotóxicos de trabajadores expuestos a plaguicidas organofosforados y su asociación con polimorfismos genéticos GSTM1, GSTT1 y GSTP1, examinaron 230 sujetos, 115 trabajadores expuestos y 115 no expuestos. El daño al DNA fue evaluado usando ensayos cometa y la genotipificación se realizó usando PCR-

RFLP (Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción, del inglés Restriction Fragment Length Polymorphism). Los resultados revelaron que el aumento al daño al DNA puede estar relacionado con la delección nula GSTM1 y el genotipo homocigoto silvestre (wild) GSTP1 debido a la interacción genes-ambiente en trabajadores expuestos a plaguicidas organofosforados.⁹³

Castillo et al. (2006), estudiaron la actividad de la GSTT1 en floricultores expuestos a plaguicidas, el grupo expuesto estuvo conformado por 25 individuos e igual número como grupo no expuesto. Mediante la detección de la actividad enzimática demostraron que ante un agente genotóxico, en este caso plaguicidas, el organismo responde generando un aumento en la actividad enzimática, como lo fue en el grupo expuesto. Pudiendo considerar que la exposición a plaguicidas induce la activación en el sistema enzimático de la GSTT1.⁹⁴

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aun con las medidas de salud pública bucal en México (fluoración de la sal y programas nacionales de salud bucal) los problemas de morbilidad bucal aquejan a toda la población. De acuerdo con datos de la Organización Mundial de la Salud (2003), entre el 60%-90% de los escolares de todo el mundo tienen caries dental.

La complejidad de esta enfermedad se debe al hecho de tratarse de un proceso multifactorial, siendo una condición progresiva, costosa, provocando efectos sobre la salud de las personas. Debido a que el ser humano se encuentra expuesto a un medio ambiente contaminado por infinidad de compuestos tóxicos, su salud se ve alterada en diversos aspectos, entre ellos el riesgo a caries.

Ante la falta de datos sobre la relación entre caries y genes de susceptibilidad en individuos expuestos a un medio ambiente contaminado por plaguicidas, el presente trabajo pretende dar respuesta a la siguiente pregunta:

¿Los polimorfismos del gen Glutation S-transferasa (GSTM1, GSTT1 y GSTP1) confieren resistencia o susceptibilidad a la caries dental en trabajadores expuestos a plaguicidas, en el Municipio de Villa Guerrero, Estado de México?

V. JUSTIFICACIÓN

Ante un constante aumento en el entendimiento del genoma humano resulta evidente que la mayoría de las enfermedades tienen una base genética incluyendo la caries por lo tanto la obtención de estos datos servirá de referencia científica para conocer más sobre el factor genético de la caries.

Con este esfuerzo de investigación, se pretende determinar si ciertos tipos de polimorfismos del gen Glutation S-transferasa (GSTM1, GSTT1 y GSTP1) pueden ocasionar susceptibilidad a presentar caries en aquellas personas expuestas a plaguicidas.

VI. HIPOTESIS

- Hi: Los polimorfismos genéticos GSTM1, GSTT1 y GSTP1 confieren resistencia a la caries en personas expuestas a plaguicidas.
- Ho: Los polimorfismos genéticos del GSTM1, GSTT1 y GS no confieren susceptibilidad a la caries en personas expuestas a plaguicidas.

VII. OBJETIVOS

Objetivo general:

Identificar si los polimorfismos genéticos GSTM1, GSTT1 y GSTP1 confieren susceptibilidad a la caries dental en personas expuestas directamente a plaguicidas.

Objetivos específicos:

- Diagnosticar clínicamente la caries en el grupo de personas expuestas laboralmente a plaguicidas y en el grupo de no expuestos laboralmente
- Realizar la genotipificación de los polimorfismos GSTM1, GSTT1 y GSTP1 del gen Glutación S-transferasa
- Buscar la posible asociación entre la caries y los polimorfismos de GSTT1, GSTM1 Y GSTP1.

VIII. DISEÑO METODOLOGICO

8.1 Diseño de la investigación:

Transversal-comparativo

8.2 Poblacion y/o Universo:

- a) Personas que vivan en el municipio de Villa Guerrero, Edo. de México que se dediquen a la floricultura.

- b) Personas que asistan al Hospital Lic. Adolfo López que no se dediquen a la floricultura.

8.3 Limites de espacio y tiempo:

La presente investigación se realizó en el municipio de Villa Guerrero, Edo. de México en los invernaderos locales y en el Banco de Sangre Estatal del Hospital Lic. Adolfo López Mateos, en la ciudad de Toluca, Edo. de México; en el periodo de marzo 2012-enero 2013.

8.4 Muestreo

- a. Tipo de muestreo: Probabilístico (aleatorio simple)
- b. Tamaño de muestra: determinístico (en función de la factibilidad económica para la realización del estudio, con una n no menor a 40 individuos por grupo: expuestos ocupacionalmente vs no expuestos ocupacionalmente)
- c. Selección de los elementos de observación: la selección de dichos elementos estará en función de los criterios establecidos para la realización del presente estudio

8.5 Criterios de Selección

- a. Criterios de inclusión:
 - Hombres y mujeres que trabajen en invernaderos y estén expuestos plaguicidas, en Villa Guerrero, Edo. de México

- Hombres y mujeres que no estén expuestos ocupacionalmente a plaguicidas, que asistan al Hospital Lic. Adolfo López Mateos a donar sangre en el banco estatal de sangre.
 - Mayores de 18 años de edad
 - Consentimiento informado firmado
- b. Criterios de no inclusión:
- Menores de 18 años de edad
 - Mujeres embarazadas
 - Personas con enfermedades crónicas que aumenten el riesgo de caries por si solas o por el tratamiento (diabetes, enfermedades cardiovasculares, cáncer, enfermedad renal, epilepsia)
 - No acepten participar en el estudio
- c. Criterios de exclusión:
- Contaminación de la muestra de sangre durante la toma de la misma
 - Muestras no rotuladas
- d. Criterios de eliminación:
- Muestras de sangre insuficientes
 - Muestras hemolizadas
 - Resultados confusos

8.6 Operacionalización de Variables:

Variable Dependiente	Definición Conceptual	Definición Operacional	Tipo de Variable	Unidad de Medición	Escala de Medición
Caries	Proceso patológico de origen externo que se inicia después de la erupción y ocasiona un reblandecimiento del tejido duro del diente, evolucionando hacia la formación de una cavidad.	Detección clínica y visual de la presencia de caries en todos los órganos dentarios de los participantes	Cualitativa nominal	Tipo de variante alélica	Lesión superficial Lesión cavitada

Variables Independiente	Definición Conceptual	Definición Operacional	Tipo de Variable	Unidad de Medición	Escala de Medición
GSTM1	El gen GSTM1 ubicado en el cromosoma 1, región p13.3, está formado por 8 exones, tiene una longitud de 4.2 kb. y es polimórfico, ya que cuenta con 4 variantes alélicas	Detección de presencia o ausencia del gen GSTM1 en cada participante	Cualitativa nominal		Presente o nulo

Variables Independiente	Definición Conceptual	Definición Operacional	Tipo de Variable	Unidad de Medición	Escala de Medición
GSTP1	La secuencia de este gen se localiza en el cromosoma 11, Es polimórfico, cuenta con tres variantes alélicas: GSTP1a, alelo silvestre; GSTP1b, este polimorfismo se encuentra ubicado en el exon 5. GSTP1c, posee la misma mutación que GSTP1b en el exón 5 y una segunda mutación en el exón 6	Detección de las variantes alélicas del gen GSTP1	Cualitativa nominal	Tipo de variante alélica	Variante silvestre GSTP1a Polimorfismo GSTP1b Polimorfismo GSTP1c
GSTT1	Este gen se encuentra ubicado en el cromosoma 22, región p11.2 (Figura 3), está conformado por cinco exones y se encuentra flanqueado por dos regiones homologas HA3 y HA5. Es polimórfico y posee dos variantes, GSTT1 silvestre y GSTT1 0 o nulo. Este último polimorfismo es consecuencia de una recombinación homóloga de las regiones HA3 y HA5 que dan como resultado una deleción de 5.4 kb y en consecuencia la enzima no se traduce	Detección de las variantes alélicas del gen GSTT1	Cualitativa nominal	Tipo de variante alélica	Presente o nulo

Variables Independiente	Definición Conceptual	Definición Operacional	Tipo de Variable	Unidad de Medición	Escala de Medición
Plaguicidas	Cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga las especies no deseadas de plantas o animales que dañan o que interfieren en la producción.	Sustancias químicas utilizadas para proteger de organismos nocivos la producción y calidad de las flores, con capacidad mutágena y cancerígena, por contener ingredientes con propiedades para cambiar el ácido desoxirribonucleico (ADN)	Cualitativa, nominal	Tipo de plaguicida	Organofosforados, carbamatos, triazinas, imidazoles, clorobencenos
Edad	Duración de la vida de un organismo, medida en unidades de tiempo, desde su nacimiento.	La edad de los participantes comprende desde el nacimiento a la fecha de estudio.	Cuantitativa Continua	Años-meses	18 a ≤ 24 >24 a ≤ 30 >30 a ≤ 36 >36 a ≤ 42 >42 años o más

Variables Independiente	Definición Conceptual	Definición Operacional	Tipo de Variable	Unidad de Medición	Escala de Medición
Exposición ocupacional	Incidencia de sustancias, radiaciones, etc, u otras condiciones durante el trabajo	Tiempo de exposición de los trabajadores en invernaderos a plaguicidas de al menos 2 años	Cuantitativa nominal	Años-meses	2 a ≤ 5 >5 a ≤ 8 >8 años o más
No exposición ambiental	Concentraciones inocuas de una sustancia tóxica o ausencia de la misma, que es liberada al medio ambiente, que no causa alteraciones en la salud humana	No existe una exposición a los plaguicidas ya sea de forma laboral o ambientalmente	Cualitativa nominal		Si o No
Dieta cariogénica	Aquella de consistencia blanda, con alto contenido de hidratos de carbono, especialmente azúcaes fermentables como la sacrosa, que se deposita con facilidad en las superficies dentarias retentivas	La frecuencia de ingesta de alimentos cariogénicos se extraerá de la pregunta «¿con qué frecuencia consume los siguientes alimentos?». Se analizara lo referente a la ingesta de dulces sólidos, refrescos con azúcar y refrigerios o comidas saladas por ser estos 3 grupos de alimentos los que se asocian mas frecuentemente a riesgo cariogénico	Cualitativa ordinal	Número de veces	alta ingesta= diariamente mediano=una o más veces por semana poco= nunca o menos de una vez a la semana

Variables Independiente	Definición Conceptual	Definición Operacional	Tipo de Variable	Unidad de Medición	Escala de Medición
Hábitos higiénicos bucodentales	Acciones necesarias para mantener la salud bucodental	Frecuencia de uso de los elementos necesarios para la higiene bucodental	Cuantitativa discreta	Número de veces al día	< 1 vez 1 vez 2 veces 3 o mas
Nivel de Escolaridad	Periodo de tiempo que dura la estancia de un niño o joven en una escuela para estudiar y recibir la enseñanza adecuada	El nivel máximo de estudios	Cuantitativa continua	Años-meses	Años y meses que recibió enseñanza en una escuela

8.7. Materiales

- 1 Caja de Guantes desechables para examinar
- 80 tubos vacutainer con 2 mL de heparina
- Kit de extracción de ADN Zymo Research Zr Genomic DNA II
- Termociclador de punto final (Techne TC-512)
- Centrifuga (Eppendorf)
- Microondas
- Equipo de electroforesis (cubeta, soporte, peine, fuente de alimentación)
- Transiluminador de luz UV
- Micropipetas automáticas
- Tubos eppendorf de 1.5 mL
- Agarosa al 2%
- Bromuro de etidio al 2%
- Buffer de carga (Orange)
- Agua destilada
- Primers:

Primers	Secuencia	Tamaño del amplicon
GSTP1b	F 5'- ACCCCAGGGCTCTATGGGAA-3' R 5'-TGAGGGCACAGAAGCCCCT-3	176pb
GSTP1c	F 5'-TGGCAGCTGAAGTGGACAGGATT-3' R 5'-ATGGCTCACACCTGTGTCCATCT-3'	332 pb
GSTT1	F 5'-TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC-3' R 5'TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA-3'	480pb
GSTM1	F 5'GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C 3' R 5' GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G 3'	215 pb
CYP1A1	F 5'-TAACACTGATCTGGCTGCAG-3 R 5'-GGGAAGGCTCCATCAGCATC-3'	420pb

8.8 Método

8.8.1 Aplicación de cuestionario

Para el grupo de personas expuestas a plaguicidas se acudió directamente a los invernaderos del municipio de Villa Guerrero, Edo. de México, en cuanto al grupo de personas no expuestas ocupacionalmente se invitaron a aquellos que acudían al Hospital Lic. Adolfo López Mateos a donar sangre en el banco estatal de sangre.

Para ambos grupos se les invitó a participar en el estudio voluntariamente. Una vez que aceptaron y firmaron la carta de consentimiento informado (anexo 1), se les aplicó un cuestionario relacionado a sus hábitos higiénicos y dietéticos (anexo 2).

8.8.2 Toma de muestras

A cada participante se le tomó una muestra de 5 mL de sangre periférica en tubos vacutainer con heparina. Las muestras se transportaron en una hielera, en máximo 4 hrs al Laboratorio de Genética de la Facultad de Química, UAEM, y se mantuvieron en refrigeración a una temperatura de 4-6°C hasta su procesamiento.

8.8.3 Identificación de caries

Se realizó la identificación de caries clínica y visualmente con ayuda de un explorador y espejo bucal. Se clasificaron las lesiones como:

- a) Lesión superficial. Cuando la desmineralización se encuentra limitada a la superficie del esmalte, sin ser una cavidad.
- b) Lesión cavitada. La lesión forma una cavidad y alcanza un extenso compromiso de la dentina.

8.8.4 Genotipificación

Para la extracción de DNA se utilizaron 100 μ L de sangre, usando el kit para purificación de DNA genómico. Las muestras de sangre fueron congeladas a menos 79°C.

El procedimiento se realizó mediante el método por columna que consta de los siguientes pasos:

- 1) Adicionar 400 μ L de Genomic Lysis Buffer a 100 μ L de sangre total.
- 2) Mezclar en el vortex de 4 a 6 segundos y dejar reposar a temperatura ambiente 5 minutos.
- 3) Transferir la mezcla a una columna colocada sobre un tubo colector,
- 4) Centrifugar la mezcla a 10 000 rpm durante 1 minuto.
- 5) Decantar el centrifugado y llevar la columna a un nuevo tubo colector.
- 6) Adicionar 200 μ L de DNA Pre-Wash Buffer al interior de la columna.
- 7) Centrifugar a 10 000 rpm durante 1 minuto.
- 8) Adicionar 500 μ L de g-DNA Wash Buffer al interior de la columna.
- 9) Centrifugar a 10 000 rpm por 1 minuto.
- 10) Transferir la columna a un tubo eppendorf.
- 11) Adicionar 50 μ L de DNA Elution Buffer a 60 °C al interior de la columna.
- 12) Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
- 13) Centrifugar a 14 500 rpm por 30 segundos para eluir el DNA de la columna.

Se verificó la efectividad de la extracción de DNA, mediante un corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1 %, mezclando 8 μ L de la muestra con 1 μ L de buffer de carga Orange, dejándolo correr por 30 minutos a 100 V/35 A.

8.8.5 Detección de polimorfismos

Reacción en Cadena de la Polimerasa

Se realizó una PCR múltiple de GSTM1 con CYP1A1 (Tabla 1), este último gen funciona como control por que es constitutivo, y otra PCR múltiple para detectar GSTT1 con CYP1A1 (Tabla 2) como control. El termociclador de punto final se

programó para 35 ciclos: desnaturalización por 2 min a 94°C, la alineación por 2 min a 62° C y alargamiento por 1 min a 72° C, una extensión de 10 minutos a 72°C para terminar el proceso.

TABLA 1.Reactivos para PCR de punto final para GSTM1 y CYP1A1

Reactivo	Volumen (µL)
H ₂ O desionizada	11.9
5x Buffer Green PCR	5
MgCl ₂	1.5
dNTPs	1.5
CYP1A1f	1.0
CYP1A1r	1.0
GSTM1 f	1.0
GSTM1 r	1.0
Taq Polimerasa	0.1
DNA templado	2
TOTAL	25 µL

TABLA 2.Reactivos para PCR de punto final para GSTT1 y CYP1A1

Reactivo	Volumen (µL)
H ₂ O desionizada	11.9
5x Buffer Green PCR	5
MgCl ₂	1.5
dNTPs	1.5
CYP1A1f	1.0
CYP1A1r	1.0
GSTT1 f	1.0
GSTT1 r	1.0
Taq Polimerasa	0.1
DNA templado	2
TOTAL	25 µL

Electroforesis del amplicón de GSTM1 Y GSTT1

Se llevó a cabo una electroforesis horizontal de los productos de reacción de la PCR en agarosa al 2 %. Se mezclaron 4 μ L del amplicon con 1 μ L de buffer de carga y se colocaron dentro de un pozo, en otro pozo se depositó 5 μ L de marcador de peso molecular de 100 pb para la identificación de los genes, dejándolo correr por 1 hora a 100 V/35 A.

Tinción

Se tiñeron las bandas obtenidas con una solución de bromuro de etidio al 1% por 15 minutos y se revelaron en el transiluminador. Se tomó como control de la PCR la presencia del gen CYP1A1 con una banda de 312 pb, la presencia de una banda de 480 pb corresponde al gen GSTT1 y una banda de 215 pb corresponde al gen GSTM1.

Detección de polimorfismos de GSTP1

Los polimorfismos de GSTP1b y GSTP1c se ubican en diferentes regiones del gen, exón 5 y exón 6 respectivamente, por lo que se realizó la amplificación de las dos regiones por separado, para PCR de punto final y empleando dos pares de primers, el propio para cada gen. Se realizó la amplificación empleando las mismas condiciones y amplificando cada gen por separado pero en la misma corrida.

Para la amplificación del exón cinco se espera un amplicón de 176 pb, mientras que para el exón seis uno de 332 pb. Se realizó la mezcla de los componentes para una PCR de punto final con un volumen final de 25 μ L (Tabla 3). El termociclador (Ependorff) se programó para 35 ciclos: desnaturalización por 2 min a 94°C, la alineación por 2 min a 62° C y alargamiento por 1 min a 72° C, una extensión de 10 minutos a 72 C para terminar el proceso.

TABLA 3. Reactivos para la PCR de punto final para GSTP1

Reactivo	Volumen(μ l)
H ₂ O desionizada	13.9
MgCl ₂	1.5
dNTPs	0.5 μ L
Primer F	1 μ L
Primer R	1 μ L
Taq Polimerasa	0.1 μ L
5x Buffer PCR	5 μ L
DNA templado	2 μ L
TOTAL	25 μ L

Los productos de las PCR se verificaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2%, por 60 minutos a 100V/35A. Una banda de 176 pb corresponde al gen GSTP1b y una banda de 332 pb corresponde al gen GSTP1c.

Digestiones Enzimáticas

La mezcla total de los reactivos de las digestiones enzimáticas se realizaron en un tubo estéril colocado en hielo, utilizando 10.0 μ L de los productos de las PCR.

Descripción de enzimas de restricción:

a. Enzima *BsmAI* para identificar polimorfismos del gen GSTP1b:

Sitio de reconocimiento	Temperatura de reacción
5'...G T C T C (N)1^...3'	55°C
3'...C A G A G (N)5^...5'	

b. Enzima *Acil* para identificar polimorfismos del gen GSTP1C

Sitio de reconocimiento	Temperatura de reacción
5'...C ^ CGC...3'	37°C
3'...GCG ^ G...5'	

Las condiciones para realizar las digestiones enzimáticas fueron de acuerdo a lo que indica el fabricante (Thermo Scientific, fermentas). Se combinaron los componentes de la reacción a temperatura ambiente y en el orden que se muestra en la Tabla 4:

TABLA 4. Reactivos y condiciones para las digestiones con BsmAI y Acil

Reactivo	Volumen (μL)
H ₂ O Desionizada	17.0
10X FastDigest Green Buffer	2.0
Producto de PCR	10
Enzima FastDigest	1.0
Total	30

Los productos de las digestiones se verificaron, mediante una electroforesis en gel de agarosa al 3 %, dejándolo correr por 90 minutos a 100 V/35 A.

Se detectaron los polimorfismos de acuerdo a los fragmentos encontrados.

a. Digestión con *BsmAI*:

- GSTP1a: un fragmento de 176 pb.
- GSTP1b: los fragmentos de 176 pb, 91 pb. y 85 pb. corresponden a GSTP1b heterocigoto y los fragmentos de 91 pb. y 85 pb. corresponden a GSTP1b homocigoto.

b. Digestión con *Acil*:

- GSTP1c: el fragmento de 332 pb. corresponde a GSTP1c homocigoto y los fragmentos de 332 pb, 174 pb. y 158 pb. corresponden a GSTP1c heterocigoto, una banda de 158 pb y 174 pb corresponde a GSTP1c silvestre.

8.9 INSTRUMENTOS DE RECOLECCION DE INFORMACIÓN

Se aplicó un cuestionario, a todos los individuos, también se registro la presencia de caries individualmente. (Anexos 3 y 4)

8.10 LEVANTAMIENTO Y ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN

Se realizó observación de forma directa, llevando a cabo un registro diario de todos los datos.

Para la determinación de los polimorfismos presentes se registraron los resultados observados en los geles de agarosa, en el instrumento de recolección de la información.

Posteriormente se construyó una base de datos (Microsoft Excel 2011) y se realizó un análisis (IBM SPSS Statistics 19) descriptivo para conocer el comportamiento de nuestros datos. Además se realizó una regresión multinomial para conocer si existe una asociación entre la caries y los polimorfismos.

IX. RESULTADOS

9.1. Artículo científico

9.1.1 Envío del artículo revista indexada

Community Dentistry and Oral Epidemiology - Manuscript ID CDOE-13-101

De: **onbehalf+beverly.ellis+adelaide.edu.au@manuscriptcentral.com** en nombre de **beverly.ellis@adelaide.edu.au**

Enviado: jueves, 07 de marzo de 2013 05:59:28 p.m.

Para: **mariana_jecu@hotmail.com**

07-Mar-2013

Dear Miss Lecourtois:

Your manuscript entitled "EFFECT OF GSTM1, GSTT1 AND GSTP1 POLYMORPHISMS ON DENTAL CARIES FREQUENCY" has been received by the editorial office of Community Dentistry and Oral Epidemiology. Review procedures will now be handled by the editor.

Your manuscript ID is CDOE-13-101.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <http://mc.manuscriptcentral.com/cdoe> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/cdoe> .

Thank you for submitting your manuscript to Community Dentistry and Oral Epidemiology.

Sincerely,
Community Dentistry and Oral Epidemiology Editorial Office

EFFECT OF GSTM1, GSTT1 AND GSTP1 POLYMORPHISMS ON DENTAL CARIES FREQUENCY

Authors

¹Mariana Gabriela Lecourtois Amézquita, ¹Alberto Salgado Valdés, ²Julieta Castillo Cadena, ¹Ángel Visoso Salgado

¹Faculty of Dentistry, ²Faculty of Quemistry, Autonomus University of State of Mexico, Toluca. México.

SUMMARY

Objective: To identify the polymorphisms of glutathione S-transferase in growers occupationally exposed to pesticides and to know whether there is any association between these polymorphisms and the presence of dental caries. Methods: we conducted a comparative cross-sectional study, consisting of two groups of 80 subjects each, according to occupational exposure to pesticides as exposed (floriculturists) and unexposed to pesticides. The caries was diagnosed with the DIAGNOdent pen and GSTM1, GSTT1, GSTP1c, GSTP1b polymorphisms were genotyped using endpoint PCR procedure. Results: In the exposed group, the presence of GSTM1 (+/+) was associated with less frequency of dental caries ($p = 0.01$), as well as in the non-exposed group ($p = 0.02$). In the unexposed group, the presence of GSTT1 (+/+) was associated with less frequency of caries ($p = 0.05$). Likewise, in the exposed group an association was found between the presence of wild allele GSTP1c (a/a) with less cavities ($p = 0.05$) also in the non-exposed group ($p = 0.04$). Conclusions: This study demonstrates the role played by genetic polymorphisms of GST in susceptibility to caries and can be used as biomarkers of susceptibility to decay.

INTRODUCTION

Tooth decay is among the most prevalent disease affecting humans. The World Health Organization (WHO) states that decay affects between 60 and 90% of the population worldwide. It is a complex disease, and it is a multifactorial process, being a progressive condition, costly and causing psychological effects (1).

The occurrence and progression of caries is influenced by both environmental factors and genetic factors, but it is common to focus attention on external factors that contribute to the presence of cavities, with comparatively little attention paid to the individual differences in disease susceptibility, which can be explained by genetic load (2, 3).

Whereas the etiology of caries is multifactorial, it is known the contribution of several factors such as bacterial flora, tooth structure, dietary habits, oral hygiene, salivary flow and composition, however, the genetic factor has been understudied. The importance of genetic load is supported by twin studies, which estimate that 40 to 60% of the caries susceptibility is genetically determined. To date are few studies linking specific genes with dental caries. (4, 5, 6, 7, 8).

With genetic load present, individuals are exposed daily to multiple disease risk factors, one of them are pesticides, which may have beneficial effects on society (prevention, control and destruction of pest, eradication vectors spreaders of diseases), but also have adverse effects such as damage to health (acute and persistent damage to the nervous system, respiratory and endocrine, teratogenic and carcinogenic, reproductive problems). The social groups in direct contact with these chemicals, such as floriculturists, have increased risk of adverse effects that have been associated with pesticides (10).

However, human beings have individual defense mechanisms in the genome, so that each person's body can detoxify xenobiotics differentially. These defense mechanisms are genetic polymorphisms, of which depend on the response of the aggressors, in this case pesticides (11).

Polymorphisms consists in variations present among individuals of the same species, either at the genetic level or protein level, so we can explain much of the variation in individual susceptibility. Polymorphisms of the gene coding for the enzyme glutathione S-transferase represent the largest group of phase II xenobiotic biotransformation and detoxification enzymes act as its ability to catalyze the conjugation of glutathione with electrophilic compounds. Also, plays an important role in the purification of free radicals, and thus protects the cell from the damaging effects of oxidative stress (11, 12).

The presence of polymorphisms in genes coding for GSTs can alter their function, and the study of these can help the understanding of the risk of exposure to different xenobiotics at population and individual level (12).

The family of isoenzymes of glutathione S-transferase is classified into eight classes: Alpha (α), Mu (μ), Pi (π), Kappa (K), Theta (Θ), Omega (Ω), Sigma (ϵ) and Zeta (Z). The Mu class isoenzyme acts in the detoxification of electrophilic compounds, such as pesticides currently considered as an evolutionary response of the cells to oxidative stress. The sequence of GSTM1 gene consists of five regions, M1, M2, M3, M4 and M5. M1 being far the most studied, which is located on chromosome 1, region p13.3 and it is formed by 8 exons, has a length of 4.2 kb. and is polymorphic since it has four allelic variants: A, B, C and 0 (null allele). Homozygotes GSTM1 null result in the absence of enzymatic activity (13,14,15, 16, 17).

The GSTT1 sequence is located on chromosome 22, is polymorphic and has two variants, GSTT1 wild GSTT1 0 or null. This class participates in the detoxification of pesticides and is considered as a factor in the development of skin cancer (16, 17).

The GSTP1 polymorphism is located on chromosome 11 and has three allelic variants: GSTP1a, wild allele; GSTP1b located in exon 5 and is the result of a

mutation at codon 104, ATC (Ile) to GTC (Val) and a third variant GSTP1c which has the same mutation at codon 104 that GSTP1b, but has a second mutation located in exon 6, 113 codon GCG (Ala) to GTG (Val) (17, 18, 19, 20).

But, beyond that already known that these isoenzymes detoxify the body of xenobiotics such as pesticides is also known that exposure to environmental pollutants is likely to have cavities, so the aim of this study focuses on identifying polymorphisms of glutathione S-transferase in growers occupationally exposed to pesticides and to know whether there is any association between these polymorphisms and the presence of dental caries.

MATERIALS AND METHODS

Selection of individuals

We performed a comparative cross-sectional study, consisting of two groups of 80 subjects each: 1)Group occupationally exposed to pesticides and 2)Group occupationally unexposed to pesticides.

The criteria for inclusion in the study were:

- Men and women who work in greenhouses and were exposed to pesticides in Villa Guerrero, Mexico
- Men and women who were not occupationally exposed to pesticides, attending the Adolfo Lopez Mateos Hospital to donate blood at the state blood bank and living in the city of Toluca and Metepec, Mexico.
- Over 18 years old
- Signed informed consent letter

The exclusion criteria were:

- Under 18 years old
- Pregnant

- People with chronic diseases that increase the risk of tooth decay by themselves or by treatment (diabetes, cardiovascular disease, cancer, kidney disease, epilepsy)
- Not agree to participate in the study

Application of a questionnaire

In the exposed group, the approach was performed directly in greenhouses and in the unexposed group was invited to involve people who were not occupationally exposed to pesticides. Those who accepted were given a questionnaire about oral hygiene habits, intake of cariogenic diet or not, and exposure to pesticides or not.

Diagnosis of dental caries

The oral cavity was revised to everyone who participated in the study, and later with the support of System DIAGNOdent pen demineralization was measured and then make the diagnosis of caries.

Extraction of DNA

First, the 160 individuals who participated in the study (two groups) were sampled from peripheral blood (5mL), which was placed in heparinized vacutainer tubes for subsequently performing genotyping.

The samples were transported in a container with ice to the Laboratory of Genetics, Faculty of Chemistry, Autonomous University of the State of Mexico, and keep refrigerated at a temperature of 4-6 °C until processing.

Extraction was performed by taking 100µL of DNA from blood using the kit for purification of genomic DNA (Wizard, Promega). The procedure was performed according to the manufacturer's instructions by the column method.

The effectiveness of the extraction of DNA was verified, by gel electrophoresis (1% agarose), 8µL of the sample were mixed with 1mL of loading buffer Orange (Promega), letting it run for 30 minutes at 100V/35A.

GENOTYPING

Genotyping of GSTM1 and GSTT1

Was performed Chain Reaction (PCR) for multiple total volume of 25 μ L, to detect and GSTM1 polymorphism CYP1A1 gene and used as a positive control in another multiplex PCR GSTT1 with CYP1A1 was detected for both Reactions were conducted using the same conditions. The reaction contained 11.9 μ L deionized H₂O, 5.0 μ L of Buffer Green, 1.5 μ L of magnesium chloride MgCl₂, 1.5 μ L deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs), 1.0 μ L CYP1A1 control gene (5'TCCTTCAACCCAGACCGTTTCCTCA3'), 1.0 μ L CYP1A1 r (5'CCGCTTTCCCAAGCCAAAACCATC3'), 1.0 μ L GSTM1 f(5'GAA CCT CTC GAA AAG CTA AAG C 3'), 1.0 μ L GSTM1 r(5'GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G 3'), 1.0 μ L GSTT1 f(5'CCT TTC CAC CTT GGT ACT ATC TC3'), 1.0 μ L GSTT1 r (5'TCA CAG GGC CAT GAT CCG CA-3'), 0.1 μ L Taq polymerase (Promega), and 2.0 μ L of DNA tempered. Subsequently, a endpoint thermal cycler was programmed (Techne TC-512) for 35 cycles: desnaturation for 2 min at 94 ° C, alignment for 2 min at 62 ° C for 1 min and elongation at 72 ° C, and an extension 10 minutes at 72 ° C to terminate the process.

Then the samples were electrophoresed in 2% agarose gel, with a molecular weight marker of 100 base pairs (bp) for the identification of polymorphisms. The gel was stained with ethidium bromide solution at 1% for 15 minutes. Control was taken as the presence of the CYP1A1 gene with a 312 bp band, the presence of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms corresponding to a band of 215 bp and 315 bp respectively (Fig. 1).

Genotyping of GSTP1

The GSTP1b and GSTP1c polymorphisms are located in exon 5 and exon 6 respectively, which is performed by amplification of the two regions separately, to the end point PCR, and using two pairs of primers, for each gene itself. Amplification was performed using the same conditions and separately amplifying each gene but in the same run.

For amplification of exon five is waited an amplicon of 176 bp, while for exon six an amplicon of 332 bp. The reaction mixture for PCR amplification contained a final volume of 25µL. The reaction mixture contained 13.9µL deionized H₂O, 1µL Buffer, 1.5µL of MgCl₂, 0.5µL dNTPs, 1.0µL GSTP1b f(5'-ACCCCAGGGCTCTATGGGAA-3'), 1.0µL GSTP1b r(5'-TGAGGGCACAAGAAGCCCCT-3'), 1.0µL GSTP1c f(5'-TGGCAGCTGAAGTGGACAGGATT-3'), 1.0µL GSTP1c r(5'-ATGGCTCACACCTGTGTCCATCT-3'), 0.1 µL Taq polymerase (Promega) and 2.0 µL of DNA. The endpoint thermocycler (Techne TC-512) was programmed for 35 cycles: denaturation for 2 min at 94 ° C, alignment for 2 min at 62 ° C for 1 min and elongation at 72 ° C, and an extension of 10 minutes at 72 ° C to terminate the process.

The PCR products were checked by electrophoresis on 2% agarose gel for 60 minutes at 100V/35A, with a molecular weight marker 100 bp for the identification of genes. The gel was stained with ethidium bromide solution at 1% for 15 minutes. Gels were then visualized on a transiluminator under UV light and photographed. A 176 bp band corresponded to GSTP1b gene and a 332 bp gene corresponded to GSTP1c.

For the detection of GSTP1c and GSTP1b polymorphisms, respective digestions were performed, where the total of the reactive mixture of the enzymatic digestions was placed in a sterile tube placed on ice, using 10.0 µL of the PCR products.

Description of the restriction enzymes:

- BsmAI enzyme polymorphisms to identify GSTP1b:

Recognition site:

5 '... G T C T C (N) 1 ^ ... 3'

3 '... C A G A G (N) 5 ^ ... 5'

Reaction temperature: 55 ° C.

- Acil enzyme polymorphisms to identify GSTP1C:

Recognition site:

5 '... C ^ CGC ... 3'

3 '... G ^ GCG 5'

Reaction temperature: 37 ° C.

The conditions for the enzymatic digestions were according to the manufacturer indicating (Thermo Scientific, Fermentas). The reaction components were combined at room temperature in the following order: 17µL deionized H₂O, 2.0uL 10X Buffer Green FastDigest, 10.0µL PCR product, FastDigest Enzyme 1.0µL, with a total volume of 30µL.

The products of the digestions were checked by electrophoresis on 3% agarose gel, for 90 minutes at 100 V/35 A, using a molecular weight marker of 25 bp for the products and a marker enzyme BsmAI of 100 bp for Acil digestions. Subsequently the gel was stained with ethidium bromide solution at 1% for 15 minutes.

Polymorphisms were detected according to the fragments found.

a. Digestion with BsmAI:

GSTP1a: fragment of 176 bp.

GSTP1b: fragments of 176 bp, 91 bp. and 85 bp. GSTP1b heterozygous and correspond to fragments of 91 bp. and 85 bp. correspond to GSTP1b homozygote.

b. Acil digestion:

GSTP1c: fragment of 332 bp. GSTP1c corresponds to homozygous and fragments of 332 bp, 174 bp. and 158 bp. correspond to GSTP1c heterozygote, a band of 158 bp and 174 bp corresponding to wild GSTP1c.

RESULTS

Sociodemographic characteristics of individuals

The average age of the exposed group was 33.42 ± 12.3 and the unexposed was 32.80 ± 9.7 years old. The predominant sex in the exposed group were males

57.5%, and in the case similar case of the unexposed group males predominated in 70% (Table 1).

Regarding the occupation, in the exposed group, all of them were floriculturists, and occupation in the unexposed group was as follows: employee 27.5%, housewives 22.5%, construction worker 12.5% and other 37.5% (Table 1).

In relation to schooling within the groups was differentiated in the exposed group: had none 2.5%, primary 55%, secondary 25%, high school 12.5%, degree 5 %, and in the unexposed group: no education 2.5%, primary 27%, secondary 32.5%, high school 22.5% and degree 15% (Table 1).

Oral Hygienic Habits

Oral hygiene in the exposed group 27.5% was regular and 72.5% deficient and in the unexposed group 15% was regular and 85% of cases was deficient. It is worth mentioning that any group had good oral hygiene (Table 1).

Dietary Habits

Regarding the consumption of a cariogenic diet, in the exposed group consumption rate was low at 17.5%, an average consumption rate of 60%, and a high intake frequency in 22.5% of cases. Deferring to the unexposed group, where the frequency of consumption of a low cariogenic diet was 2.5%, average 30%, and high in 67.5% of cases (Table 1).

Determination of caries

The frequency of caries was determined by the number of cavities in each person according to the data obtained with the DIAGNOdent pen. In the exposed group the average of cavities was 7.4 teeth and in the unexposed group was 10.8 teeth with cavities.

Presence of Polymorphisms

The GSTM1 (+/+) polymorphism was presented in 70% of individuals in the exposed group, and in 30% of them were null (-/-), differing of unexposed group,

which was present (+/+) in 42.5% and null (-/-) in 57.5% of individuals in this group (Table 2).

The GSTT1 gene was present (+/+) in 27.5% of the exposed group and null (-/-) in 72.5%, differing of unexposed group which was present (+/+) in 30% and null (-/-) in 70% of the individuals in this group (Table 2).

Regarding GSTP1b gene in the exposed group 2.5% had the wild allele (Ile-Ile), 65% were heterozygous (Ile-Val), and 32.5% were homozygous (Val-Val), and in the non-exposed group 30% were wild type, 35% heterozygous and 35% homozygous (Table 2).

Likewise, the GSTP1c gene in the unexposed group the wild allele (Ile-Ile) was present in 60%, 40% were heterozygous (Ile-Val) and none homozygous (Val-Val). In the unexposed group, wild allele was present in 72.5%, 27.5% were heterozygous and none homozygous (Table 2).

Statistical analysis

A bivariate correlation was used to evaluate the sociodemographic characteristics, the presence of the disease and care for it (caries) is shown table 3 where people with cavities had a positive relationship with age (0.077), a negative correlation with schooling (- 0.088), a clearly positive correlation with exposure time (0.217) and a negative correlation with disease care (how many times been to the dentist) (-0.102). Correlation to the unexposed group shown in the table 4, people with caries had a positive correlation with age (0.099), a negative correlation with schooling individuals (-0.022), and a negative correlation with disease care (- 0.391).

A multiple regression model for the polymorphisms, hygiene habits and cariogenic diet habits is shown in table 5. The presence of GSTM1 (+/+) polymorphism was associated with less often caries 49% ($p = 0.01$) in the exposed group, as well as in the unexposed group, with 38% ($p = 0.02$). The presence of GSTT1 (+/+) polymorphism was associated with the less frequency of caries 38% ($p = 0.05$) in

the unexposed group. The GSTP1b polymorphism had no association whatsoever in both groups (exposed and unexposed to pesticides) with cavities. We found in the exposed group an association between the presence of GSTP1c wild allele (a/a) and less frequency of caries ($p = 0.05$) and in the unexposed group the association was 41% ($p = 0.04$). The exposed group had an association between oral hygiene habits and cavities of 9% ($p=0.17$), meanwhile the cariogenic diet was associated to caries in 18% ($p=0.11$). The presence of cavities in the unexposed group had an association with the oral hygiene habits of 20% ($p= 0.83$) and with the cariogenic diet was 16% ($p= 0.83$).

DISCUSSION

Considering the results obtained in the present study shows that sugar consumption and caries risk are not associated, consistent with the literature review by Burt et al. (2001) which found no association between sugar consumption and caries risk, the review of thirty-six articles that met their inclusion criteria, items of which two of them report a strong relationship between sugar consumption and caries development, sixteen found a moderate relationship, and eighteen a weak relationship. Hence it is concluded that the relationship between cavities and sugar consumption is weak and is not the most important in the prevention of cavities (21).

With respect to caries and oral hygiene, Irigoyen et al. (2001) report on a Mexican school population that 39.5% reported to brush teeth twice a day and 11% did not use toothpaste. These data are similar to those found in this study, although the population is different in terms of age and exposure; however both studies are in the Mexican population (22).

Regarding the role of genes in susceptibility to caries Deshpande et al. (2012) conducted a study with monozygotic twins 5 years old who were reared apart and similar characteristics of dental caries. A comprehensive care preventive and therapeutic oral was providing. Through the study of dental disease in twins reared

apart, the element of environmental influence is removed without losing the advantage of similar genotype in monozygotic twins. Conry et al. (1993) investigated in twin genetic susceptibility to caries, concluding that the genetic contribution to the decay is about 40% (23, 24).

Have also been associated the GST polymorphisms with pesticide metabolism, such as the study by Singh et al. (2011), who examined 115 workers exposed to organophosphate pesticides, assessed the damage to DNA polymorphisms associated with GSTT1, GSTM1, GSTP1. The results showed that there was an increased DNA damage in those workers with the GSTM1 null genotype compared to those same polymorphism positive. Also observed a significant increase in damage when the genotype showed GSTP1 (Ile-Ile) in comparison with the variants heterozygous (Ile-Val) and wild (Val-Val) (25).

Meanwhile, Liu et al. (2006) reports that pesticide exposure causes there is an increased DNA damage compared with unexposed individuals, finding a significant association ($P = 0.02$) GSTP1b wild (Ile-Ile) with a increased DNA damage. Information that could partially compared with the results of this study, as the study subjects had no caries, from such that the results are not entirely comparable (26).

In this study, 52.5% showed polymorphism of GSTM1 null (-/-), which is consistent with data reported in Korean population (53.8%), Caucasian (53.5%) and Japan (51.3%), compared to null polymorphism GSTT1 (-/-) occurred in 71.2% of individuals, this data differs from the data in Caucasian populations (14.7%), Korean (54.3%) and Japanese (54%). Regarding the GSTP1 polymorphism, in the present study was identified GSTP1b (exon 5): 12.5% had the wild allele, 57.7% were heterozygous (Ile / Val) and 33.7% homozygous, these data are similar to those obtained in Colombian population: 13.3% had the wild allele (Ile / Ile), 54.2% heterozygous (Ile / Val), 32.5% homozygous (Val / Val). It is important to consider that the Mexican population is the product of a great mixture, so the distribution of these polymorphic genes, is different and unique compared to other parts of the world (27, 28, 29)

In conclusion, although the polymorphisms studied in this research have been addressed for other purposes by other authors, at the time of this study there was no news of any effort to know the association of GSTM1, GSTT1, and GSTP1c GSTP1b in cavities patients exposed and not exposed to pesticides. So that the data obtained here open a different path in the dentistry to those discussed so far, and invite the pursuit of knowledge of the link between specific genetic load from the moment of conception of each individual with susceptibility eventually have to certain conditions.

REFERENCES

1. Organización Mundial de la Salud. Informe sobre el problema mundial de las enfermedades bucodentales. Actualidad. Gaceta Dental. 2004. Available in: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr15/es/> [citado 7 mayo 2012].
2. Köhler W, Miller DW. The Micro-Organisms of the Human Mouth (Unaltered Reprint of the Original Work Published in 1890 in Philadelphia). J. Basic Microbiol. 1974; 14 (1): 84.
3. Newburn E. Cariology. 3^{ed}. San Francisco, USA. Quintessence Publishing; 1989.
4. Keyes PH. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. Findings and implications. Arch Oral Biol. 1960; 304-20.
5. Conry JP, Messer LB, Boraas JC, Aeppli DP, Bouchard TJ Jr. Dental caries and treatment characteristics in human twins reared apart. Arch Oral Biol. 1993; 83: 937-43.
6. Boraas JC, Messer LB, Till MJ (1988). A genetic contribution to dental caries, occlusion, and morphology as demonstrated by twins reared apart. J Dent Res 67:1150-1155.
7. Bretz WA, Corby PM, Schork NJ, Robinson MT, Coelho M, Costa S, et al. Longitudinal analysis of heritability for dental caries traits. J Dent Res. 2005; 84:1047-1051.
8. Bretz WA, Corby PM, Melo MR, Coelho MQ, Costa SM, Robinson M, et al. Heritability estimates for dental caries and sucrose sweetness preference. Arch Oral Biol. 2006; 51:1156-1160.
9. Wang X, Shaffer JR, Weyant RJ, Cuenco KT, DeSensi RS, Crout R, et al. Genes and their effects on dental caries (tooth decay) may differ between primary and permanent dentitions. Caries Res. 2010;44:277-284.
10. Organización Mundial de la Salud (OMS) Consecuencias Sanitaria del Empleo de Plaguicidas en la Agricultura. Ginebra, Suiza, 1992; 128.
11. Coles B, Ketterer B. The role of human glutathione and glutathione transferases in chemical carcinogenesis: Crit Rev Biochem Mol Biol. 1990; 25: 47.
12. Eaton LD, Bammler T. Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. Tox Sc. 1999; 49: 156-64.
13. Hayes JD, Fanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. Ann Rev Pharmacol Toxicol. 2005; 45: 51-88.
14. Wilce MC and Parker MW. Structure and function of glutathione S-transferases. Biochim Biophys. 1994; 1:18.

15. Ikeda H, Serria MS, Kakisaki I, Hatayama I, Satoh K, Tsuchida S, Muramatsu M, Nishin S, Sakai M. Activation of mouse Pi-class glutathione S-transferase gene by Nrf2 (NF-E2-related factor 2) and androgen. *Biochem J.* 2002; 364: 563- 570.
16. Hayes JD, Fanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 2005; 45: 51-88.
17. Oliveira AL, Rodríguez FO, Santos RE, Aoki T, Rocha MN, Longui CA and Melo MB. GSTT1, GSTM1, and GSTP1 polymorphisms and chemotherapy response in locally advanced breast cancer. *Genetics and Molecular Research.* 2010; 9(2): 1045-1053.
18. Eaton LD, Bammler T. Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Tox Sc.* 1999; 49: 156-64.
19. Castillo CJ, Contreras SC, Poblano RB, Posada RP y García JR. Actividad en la enzima Glutathione S-transferasa T1 en floricultores expuestos a plaguicidas. *Bioquímica.* 2007; 32: 138.
20. Ali-Osman F, Akande O, Antoun G, Mao JX and Buolamwini J. Molecular cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of full-length cDNAs of three human Glutathione S-Transferase Pi gene variants. *The Journal of Biological Chemistry.* 1997; 272(15): 10004–10012.
21. Burt, B. A. and S. Pai (2001). "Sugar Consumption and Caries Risk: A Systematic Review." *Journal of Dental Education* 65(10): 1017-1023.
22. Irigoyen ME, Zepeda MA, Sánchez L, Molina N. Prevalencia e incidencia de caries dental y hábitos de higiene bucal en un grupo de escolares del sur de la Ciudad de México: estudio de seguimiento longitudinal. *Rev ADM,* 2001; 53(3): 98-104.
23. Deshpande A, Deshpande N. Similar caries pattern in monozygotic twins: Role of nature and/or nurture. *Euro Gen Dent.* 2012; 1: 104-108.
24. Conry JP, Messer LB, Boraas JC, Aeppli DP, BouchardTJ Jr. Dental caries and treatment characteristics in human twins reared apart. *Arch Oral Biol.* 1993; 83: 937-43.
25. Singh S, Kumar V, Sing P, Thakur S, Dev Banerjee B, Singh RR, et al. Genetic polymorphisms of GSTM1, GSTT1, GSTP1 and susceptibility to DNA damage in workers occupationally exposed to organophosphate pesticides. *J Mr Gen Tox.* 2011; 725:36-42.
26. Liu JY, Huang LP, Chang FY, Chen HY, Chiou HY, Xu LZ, et al. GSTP1 Genetic Polymorphism Is Associated with a Higher Risk of DNA Damage in Pesticide-Exposed Fruit Growers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006; 15(4):659-666.
27. Cho HJ, Lee SY, Ki CS, Kim JW. GSTM1, GSTT1 and GSTP1 Polymorphisms in the Korean Population. *J Korean Med Sci.* 2005; 20(6): 1089-1092.

28. Chen CL, Liu Q, Relling MV. Simultaneous characterization of glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms by polymerase chain reaction in American whites and blacks. *Pharmacogenetics* 1996; 6: 187–191.
29. Naoe T, Takeyama K, Yokozawa T, Kiyoi H, Seto M, Uike N, Ino T, et al. Analysis of genetic polymorphism in NQ01, GSTM1, GSTT1, and CYP3A4 in 469 Japanese patients with therapy-related leukemic/myelodysplastic syndrome and de novo acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 4091–4095.

FIGURES AND TABLES

Fig.1. Photograph of multiplex PCR analysis of Glutathione S-transferase (GST) polymorphisms. Cytochrome P450 (CYP1A1; 312 bp), glutathione S-transferase M1 (GSTM1; 215 bp) genes PCR products resolved by agarose gel electrophoresis. Line marker is 100 bp DNA ladder. Lines 2, 4, 5 and 10 are GSTM1 present (+/+) genotype, line 1, 3, 6, 7, 8 and 9 were GSTM1 null (-/-) genotype.

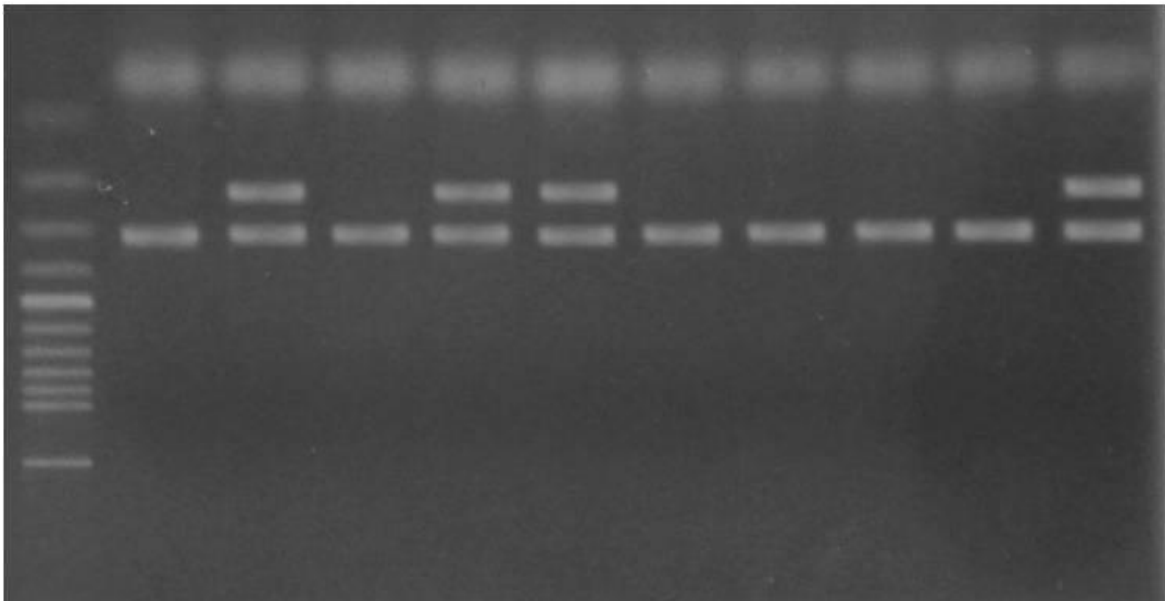


Table 1. Categories Studied. Sociodemographic, Dietary and Hygienic Habits.

		Category	Exposed Group		Unexposed Group	
			n	(%)	n	(%)
Sociodemographic Characteristics	Sex	Male	17	(57.5)	28	(70)
		Female	23	(42.5)	12	(30)
	Occupation	Grower	40	(100)		
		Employee			11	(27.5)
		Housewife			9	(22.5)
		Bricklayer			5	(12.5)
		Other			15	(37.5)
	Schooling	None	1	(2.5)	1	(2.5)
		Elementary	22	(55)	11	(27.5)
		Middle	10	(25)	13	(32.5)
High		5	(12.5)	9	(22.5)	
Degree		2	(5)	6	(15)	
Oral Hygienic Habits	Buena	0	(0)	0	(0)	
	Regular	11	(27.5)	6	(15)	
	Deficient	29	(72.5)	34	(85)	
Cariogenic Diet	Low	7	(17.5)	1	(2.5)	
	Middle	24	(60)	12	(30)	
	High	9	(22.5)	27	(67.5)	

Table 2. Distribution of Polymorphisms in the Studied Groups

Polymorphism	Alleles	Exposed Group	Unexposed Group
		n (%)	n (%)
GSTM1	+ / +	26 (65)	12 (30)
	- / -	14 (35)	28 (70)
GSTT1	+ / +	11 (27.5)	12 (30)
	- / -	29 (72.5)	28 (70)
GSTP1b	(a/a)	1 (2.5)	9 (22.5)
	(a/b)	26 (65)	17 (42.5)
	(b/b)	13 (32.5)	14 (35)
GSTP1c	(a/a)	25 (62.5)	27 (67.5)
	(a/c)	15 (37.5)	13 (32.5)
	(c/c)	0	0

+ / + = present; - / - = null, a/a = wild; a/b and a/c = heterozygous; b/b and c/c = homozygous

Table 3. Results of the correlation model of sociodemographic characteristics, pesticide exposure, presence of cavities and care of it (caries) in the exposed group.

Variables	Age	Schooling	Caries	Exposure Time	Dental Care
Age	1.000	-0.281 (0.083)	0.077 (0.640)	0.666 (0.000)	-0.219 (0.181)
Schooling	-0.281 (0.083)	1.000	-0.088 (0.593)	-0.336 (0.036)	-0.030 (0.858)
Caries	0.077 (0.640)	-0.088 (0.593)	1.000	0.217 (0.184)	-0.102 (0.537)
Exposure Time	0.743 (0.000)	-0.336 (0.036)	0.217 (0.184)	1.000	0.368 (0.021)
Dental Care	-0.299 (0.065)	-0.030 (0.858)	-0.102 (0.537)	0.368 (0.021)	1.000

Table 4. Results of the correlation model of sociodemographic characteristics, presence of cavities and care of it (caries) in the unexposed group.

Variables	Age	Schooling	Caries	Dental Care
Age	1.000	-.250 (.125)	.099 (.547)	.054 (.745)
Schooling	-.250 (.125)	1.000	-.022 (.896)	.185 (.261)
Caries	.099 (.547)	-.022 (.896)	1.000	-.391 (.014)
Dental Care	.054 (.745)	.185 (.261)	-.391 (.014)	1.000

Tabla 5. Linear Regression Model, of the polymorphism present in the exposed and unexposed to pesticides, oral hygiene habits and cariogenic diet vs. decay.

	Exposed Group			Unexposed Group		
	B	E.E.	P	B	E.E.	P
GSTM1 (+/+)	0.49	0.41	0.01	0.38	1.03	0.02
Oral Hygienic Habits	0.09	0.67	0.17	0.20	0.53	0.83
Cariogenic Diet	0.18	0.76	0.11	0.16	0.54	0.83
		r2= 0.49			r2=0.32	
GSTT1 (+/+)	0.28	0.62	0.31	0.38	0.54	0.05
Oral Hygienic Habits	0.09	0.67	0.17	0.20	0.53	0.83
Cariogenic Diet	0.18	0.76	0.11	0.16	0.54	0.83
		r2= 0.49			r2= 0.33	
GSTP1 (a/a)	0.12	0.76	0.17	0.56	1.03	0.21
Oral Hygienic Habits	0.09	0.67	0.17	0.20	0.53	0.83
Cariogenic Diet	0.18	0.76	0.11	0.16	0.54	0.83
		r2= 0.36			r2= 0.39	
GSTP1c (a/a)	0.39	0.53	0.05	0.41	1.41	0.04
Oral Hygienic Habits	0.09	0.67	0.17	0.20	0.53	0.83
Cariogenic Diet	0.18	0.76	0.11	0.16	0.54	0.83
		r2= 0.37			r2= 0.34	

P < 0.05

9.2 Resultados Generales

Los resultados obtenidos se presentan primero los relativos a las características sociodemográficas, después los hábitos higiénicos y dietéticos y por último los concernientes a los genes de susceptibilidad.

9.2.1 Características sociodemográficas

El promedio de la edad del grupo de los expuestos fue de 33.42 ± 12.3 años y de los no expuestos de 32.80 ± 9.7 años de edad (Tabla 5).

El sexo predominante en el grupo de los individuos expuestos fue el masculino con el 57.5%, y para el caso de los no expuestos de igual forma predominó el sexo masculino con el 70% de los casos (Tabla 5).

Respecto a la ocupación, en el grupo de los expuestos, todos ellos fueron floricultores, y la ocupación en el grupo de los no expuestos fue como sigue: empleado 27.5%, ama de casa 22.5%, albañil 12.5% y otros 37.5% (Tabla 5).

Con relación a la escolaridad al interior de los grupos fue diferenciada, en el grupo de los expuestos: sin escolaridad alguna 2.5%, primaria 55%, secundaria 25%, bachillerato 12.5%, licenciatura 5%. En el grupo de los no expuestos: sin escolaridad 2.5%, primaria 27%, secundaria 32.5%, bachillerato 22.5% y licenciatura 15% (Tabla 5).

9.2.2 Hábitos higiénicos y dietéticos cariogénicos

Acerca de los hábitos higiénicos bucales se categorizó como buena, regular o deficiente a partir de los datos obtenidos en el cuestionario tales como la frecuencia con la que se cepillan los dientes, uso de hilo dental y enjuague bucal, así como también las veces que asistió al dentista en el último año. La higiene bucal en el grupo de los expuestos fue regular en el 27.5% de los casos y

deficiente en el 72.5%; y para el caso de los no expuestos fue regular en el 15% y deficiente en el 85% de los casos (Tabla 5).

Respecto a la dieta cariogénica, en el grupo de los expuestos la frecuencia de consumo fue baja en el 17.5%, media en el 60% y alta en el 22.5% de los casos. Diferenciando del grupo de los no expuestos, donde la frecuencia de consumo de una dieta cariogénica fue baja en el 2.5%, media en el 30%, y alta en el 67.5% de los casos (Tabla 5). Notando que los individuos no expuestos provenientes de la zona urbana tienen una mayor frecuencia de dieta cariogénica.

TABLA 5. Características sociodemográficas, hábitos higiénicos y dietéticos de los grupos en estudio

		Categorías	Grupo Expuesto n(%)	Grupo No Expuesto n(%)
Características Sociodemográficas	Sexo	Masculino	17 (57.5)	28 (70)
		Femenino	23 (42.5)	12 (30)
	Ocupación	Floricultor	40 (100)	
		Empleado		11 (27.5)
		Ama de casa		9 (22.5)
		Albañil		5 (12.5)
		Otro		15 (37.5)
	Grado de Estudios	Ninguno	1 (2.5)	1 (2.5)
		Primaria	22 (55)	11 (27.5)
		Secundaria	10 (25)	13 (32.5)
Bachillerato		5 (12.5)	9 (22.5)	
Licenciatura		2 (5)	6 (15)	
Hábitos Higiénicos Bucales	Buena	0	0	
	Regular	11 (27.5)	6 (15)	
	Deficiente	29 (72.5)	34 (85)	
Consumo de Dieta Cariogénica	Baja	7 (17.5)	1 (2.5)	
	Media	24 (60)	12 (30)	
	Alta	9 (22.5)	27 (67.5)	

9.2.3 Determinación de caries

En la tabla 6 se muestran las medias y desviaciones estándar de la variable caries que se determinó por el número de dientes cariados de cada individuo. Siendo la media de dientes cariados en el grupo expuesto de 7.4 dientes cariados, difiriendo de la media para el grupo no expuesto la cual fue de 10.8 dientes con caries.

TABLA 6. Resultados de la frecuencia de caries en los grupos en estudio

Grupos	$\bar{x} \pm DS$
Expuesto	7.4 \pm 4.7
No expuestos	10.8 \pm 4.7

\bar{x} = media (promedio); DS= Desviación Estandar

9.2.4 Determinación de los polimorfismos GSTM1, GSTT1, GSTP1

El polimorfismo GSTM1 (+/+) se presentó en el 70% de los individuos del grupo expuesto, y en el 30% de ellos fue nulo (-/-); difiriendo del grupo no expuesto, donde estuvo presente (+/+) el en 42.5% y nulo (-/-) en el 57.5% de los individuos de este grupo (Tabla 7).

El polimorfismo del gen GSTT1 (+/+) estuvo presente en el 27.5% del grupo de los expuestos y nulo (-/-) en el 72.5%, difiriendo del grupo de los no expuestos donde estuvo presente (+/+) en el 30% y nulo (-/-) en el 70% de los individuos de este grupo de estudio (Tabla 7).

Respecto al polimorfismo del gen GSTP1b en el exón 5, en el grupo de los expuestos el 2.5% fueron del tipo silvestre (a/a), 65% fueron heterocigotos (a/b), y 32.5% fueron homocigotos (b/b); en el grupo de los no expuestos el 30% fueron del tipo silvestre, el 35% fueron heterocigotos y el 35% fueron homocigotos (Tabla 7).

Así también, el polimorfismo del gen GSTP1c del exón 6 en el grupo de los no expuestos se presentó de forma silvestre (a/a) en el 60%, heterocigoto (a/b) en el 40% y no hubo homocigos (c/c). En el grupo de los no expuestos, fueron 72.5 % del tipo silvestre (a/a), 27.5% fueron heterocigotos (a/c) y no se presentaron homocigotos (c/c) (Tabla 7).

TABLA 7. Distribución de los polimorfismos en los grupos en estudios

Polimorfismos	Alelos	Grupos	
		Expuestos n (%)	No Expuestos n (%)
GSTM1	+ / +	26 (65)	12 (30)
	- / -	14 (35)	28 (70)
GSTT1	+ / +	11 (27.5)	12 (30)
	- / -	29 (72.5)	28 (70)
GSTP1b	(a/a)	1 (2.5)	9 (22.5)
	(a/b)	26 (65)	17 (42.5)
	(b/b)	13 (32.5)	14 (35)
GSTP1c	(a/a)	25 (62.5)	27 (67.5)
	(a/c)	15 (37.5)	13 (32.5)
	(c/c)	0	0

+/+ = presente; -/- = nulo; a/a = silvestre; a/b, a/c=heterocigotos; b/b, c/c= homocigotos

9.2.5 Resultados del uso de plaguicidas

A los floricultores se les preguntó cuánto tiempo se han dedicado a la floricultura y el promedio fue de 12.5 años en un rango de 6 meses a 45 años. Siendo las actividades que mas realizan en los invernaderos el corte y armar bonches de flores (52.5%) ver el detalle en la tabla 8.

TABLA 8. Actividades de los floricultores en invernaderos

Actividad	n (%)
Corte	21 (52.5)
Bonche	21 (52.5)
Sembrar	20 (50)
Desbotonar	20 (50)
Deshierbar	17 (42.5)
Fumigar	11 (27.5)
Preparar plaguicidas	8 (20)

Con relación al equipo de protección que utilizan los floricultores en su trabajo, reportaron que el 47.5% usan guantes, el 32.5% botas y mandil, el 17.5% mascarilla, el 10% lentes y solo el 7.5% se protegen con overol (Tabla 9).

TABLA 9. Equipo de protección utilizado por los floricultores

Equipo Proteccion	Frecuencia de Uso (%)
Guantes	47.5
Botas	32.5
Mandil	32.5
Mascarilla	17.5
Lentes	10
Overol	7.5

Con relación al tipo de plaguicidas se encontró que el más utilizado, en un 35% fue el Lannate (carbamato) considerado altamente tóxico, el segundo más usado fue el Ridomil Gold (carbamato) en un 25% clasificado como moderadamente tóxico y en tercer lugar el Furadan (carbamato) en un 22.5%, el cual es altamente tóxico. En la tabla 10 se muestran los plaguicidas que emplean los floricultores, con el nombre comercial, grupo químico al que pertenecen, la actividad biológica por la cual se emplean, su frecuencia de uso y el grado de toxicidad de cada uno de acuerdo con la OMS (2009), en donde aparece también la clasificación de cuidado o precaución para aquellos compuestos con ingredientes activos que no presenta riesgo agudo en uso normal.

TABLA 10. Plaguicidas empleados por los floricultores

Nombre Comercial	Grupo Químico	Actividad Biológica	Frecuencia de Uso (%)	Toxicidad
Lannate	Carbamato	Insecticida	35	Altamente
Ridomil Gold	Carbamato	Fungicida	25	Moderadamente
Furadan	Carbamato	Insecticida	22.5	Altamente
Agrimec	Glicósido	Insecticida, acaricida	20	Moderadamente
Tamaron	Organofosforados	Insecticida	17.5	Altamente
Benlate	Benomilo	Fungicida	15	Precaución
Cascade	Carbamato	Insecticida	12.5	Ligeramente
Nuvacron	Organofosforado	Insecticida-acaricida	10	Altamente
Talstar	Piretroide	Insecticida	10	Moderadamente
Tecto	Bencimidazol	Fungicida	10	Ligeramente
Curacron	Organofosforado	Insecticida-acaricida	7.5	Moderadamente
Folpet	Ftalamidas	Fungicida	7.5	Precaución
Pentaclor	Organoclorado	Fungicida	7.5	Precaución
Clorotalonil	Bencenoderivado	Fungicida	5	Precaución
Omite	Organosulfurado	Acaricida	5	Ligeramente
Consist max	Triazol	Fungicida	5	Precaución
Infinito	Carbamato	Fungicida	2.5	Precaución
Saprol	Piperazinas	Fungicida	2.5	Precaución

Fuente: datos obtenidos de los cuestionarios

9.2.6 Correlación de variables

Se realizó una correlación bivariada para analizar las características sociodemográficas con la exposición a plaguicidas y la presencia de caries. Se encontró que el presentar caries en los individuos del grupo expuestos, tuvo una correlación positiva con la edad (0.07), una correlación negativa con la escolaridad de los individuos (-0.088), una correlación positiva con el tiempo exposición (0.21) y una correlación negativa con la atención a la enfermedad (-0.10) (Tabla 11).

TABLA 11. Resultados del modelo de correlación de las características sociodemográficas, de la exposición a plaguicidas, presencia de caries y atención dental

Variables	Edad	Escolaridad	Caries	Tiempo Exposición	Atención Dental
Edad	1.00	-0.28 (0.08)	0.07 (0.64)	0.66 (0.00)	-0.21 (0.18)
Escolaridad	-0.28 (0.08)	1.000	-0.08 (0.59)	-0.33 (0.03)	-0.03 (0.85)
Caries	0.07* (0.64)	-0.08* (0.59)	1.00	0.21* (0.18)	-0.10 (0.53)
Tiempo de Exposición	0.74* (0.00)	-0.33 (0.03)	0.21 (0.18)	1.00	0.36 (0.02)
Atención Dental	-0.299 (0.06)	-0.03 (0.85)	-0.10 (0.53)	0.36 (0.02)	1.00

*Correlaciones

En la tabla 12 se muestra el análisis de correlación para el grupo de los no expuestos, donde el presentar caries, tuvo una correlación positiva con la edad (0.09), una correlación negativa con la escolaridad de los individuos (-0.02), y una correlación negativa con la atención a la enfermedad (-0.39). Cabe mencionar que las correlaciones en cuanto a edad, escolaridad y atención dental se presentaron en igual forma en ambos grupos. Siendo el tiempo de exposición a los plaguicidas exclusivo del grupo expuesto.

TABLA 12. Resultados del modelo de correlación de las características sociodemográficas, presencia de caries y atención dental

Variables	Edad	Escolaridad	Caries	Atención Dental
Edad	1.00	-0.25 (0.12)	0.09* (0.54)	0.05 (0.74)
Escolaridad	-0.25 (0.12)	1.00	-0.02* (0.89)	0.18 (0.26)
Caries	0.09 (0.54)	-0.02 (0.89)	1.00	-0.39 (0.01)
Atención Dental	0.05 (0.74)	0.18 (0.26)	-0.39* (0.01)	1.00

*Correlaciones

9.2.7 Modelo de regresión

Se realizó un análisis de regresión multinomial (Tabla 13) para conocer si existe asociación entre la caries y las variables: polimorfismos, hábitos higiénicos y dietéticos. En el grupo expuesto a plaguicidas, la presencia del polimorfismo GSTM1 (+/+) se encontró asociada a menor frecuencia de caries dental en 49% ($p=0.01$); así como en el grupo de los no expuestos, con 38% ($p=0.02$).

En el grupo no expuesto a plaguicidas, la presencia del polimorfismo GSTT1 (+/+) se encontró asociada a menor frecuencia de caries en 38% ($p=0.05$).

El polimorfismo GSTP1b (a/a) no tuvo asociación alguna en ambos grupos (expuestos y no expuestos a plaguicidas) con la caries.

Así también, se encontró asociación entre la presencia del polimorfismo silvestre GSTP1c con menor frecuencia de caries en 39% ($p=0.05$) en el grupo expuesto; y en el grupo de los no expuestos la asociación fue del 41% ($p=0.04$).

TABLA 13. Asociación entre frecuencia de caries, polimorfismos, hábitos higiénicos y dieta cariogénica entre ambos grupos

Grupo	Expuesto			No Expuesto		
	B	E.E.	p	B	E.E.	p
GSTM1 (+/+)	0.49	0.41	0.01	0.38	1.03	0.02
H. Hig. Orales	0.09	0.67	0.17	0.20	0.53	0.83
Dieta Cariog.	0.18	0.76	0.11	0.16	0.54	0.83
	r2= 0.49			r2=0.32		
GSTT1 (+/+)	0.28	0.62	0.31	0.38	0.54	0.05
H. Hig. Orales	0.09	0.67	0.17	0.20	0.53	0.83
Dieta Cariog.	0.18	0.76	0.11	0.16	0.54	0.83
	r2= 0.49			r2= 0.33		
GSTP1 (a/a)	0.12	0.76	0.17	0.56	[1.03]	0.21
H. Hig. Orales	0.09	[0.67]	0.17	0.20	[0.53]	0.83
Dieta Cariog.	0.18	[0.76]	0.11	0.16	[0.54]	0.83
	r2= 0.36			r2= 0.39		
GSTP1c (a/a)	0.39	[0.53]	0.05	0.41	[1.41]	0.04
H. Hig. Orales	0.09	[0.67]	0.17	0.20	[0.53]	0.83
Dieta Cariog.	0.18	[0.76]	0.11	0.16	[0.54]	0.83
	r2= 0.37			r2= 0.34		

B= Coeficiente de Regresión E.E.= Error Estándar p=Probabilidad 95%

X. DISCUSIÓN

Diversos autores mencionan que la caries dental es un problema de salud pública en virtud de su elevada prevalencia. En México se ha documentado que la prevalencia de caries dental se encuentra entre 70 y 85% en dentición secundaria a la edad de 12 años. No obstante las medidas de salud pública bucal instituidas (fluoración de la sal, programas nacionales de salud bucal), los problemas de morbilidad bucal ocupan un papel importante en el panorama de salud pública, toda vez que demandan conductas personales para su control más eficaz y, en buena medida, se trata de problemas que pueden prevenirse con mínimas conductas de protección a la salud. Sin embargo, dicha enfermedad multifactorial se ha explorado desde distintas aristas, y el componente genético ha sido poco explorado, y menos aún lo relacionado a los polimorfismos, los cuales determinan las variantes génicas polimórficas que un individuo posea, le conferirán mayor o menor susceptibilidad frente a sustancias con potencial genotóxico como lo son muchos de los plaguicidas, que fueron motivo del presente estudio.⁹⁵

Considerando los resultados obtenidos en el presente estudio, se observó que el consumo de azúcar y el riesgo a caries no está asociado. Lo cual concuerda con la revisión de la literatura realizada por Burt et al. (2001) en donde concluyeron que no existe asociación entre el consumo de azúcar y el riesgo de caries, al revisar 36 artículos que cumplieron con sus criterios de inclusión, de los cuales 2 de ellos reportan una fuerte relación entre el consumo de azúcar y el desarrollo de caries, 16 encontraron una moderada relación y en 18 una débil relación.²⁷

Con respecto a la caries y la higiene bucodental, Irigoyen et al. (2001), reportan en una población escolar mexicana que el 39.5% refirieron cepillarse de una a dos veces los dientes al día y el 11% no utilizaban dentífrico. Estos datos son similares a lo encontrado en este estudio, aunque la población es distinta en cuanto a edad y exposición, sin embargo ambos estudios son en población mexicana.⁹⁶

Con relación al papel que juegan los genes en la susceptibilidad a caries Deshpande et al. (2012), realizaron un estudio con hermanos gemelos monocigóticos de 5 años de edad que fueron criados por separado y presentaban características similares de caries dental. Les proporcionaron atención integral oral preventiva y terapéutica. Mediante el estudio de las enfermedades dentales en los gemelos criados por separado, el elemento de la influencia del medio ambiente es eliminado sin perder la ventaja de genotipo similar en los gemelos monocigóticos. Así como también, otros autores se han dado a la tarea de evaluar la susceptibilidad a caries asociada a la carga génica en gemelos, Townsend et al. (1988), reportaron que la morfología de la corona dental humana está bajo un grado de control genético, las características de la superficie oclusal, la progresión de la lesión y la tasa de incidencia específica del sitio, están influenciados por el genotipo. El estudio de Conry et al.(1993), demostró que una proporción significativa de la varianza para el número de dientes y superficies restauradas, y la presencia de la caries fue atribuible a la variabilidad genética.^{97, 98, 99, 100}

Wendell et al. (2010), estudiaron la variación genética en genes de la vía del gusto (TAS2R38, TAS1R2, GNAT3) que pueden asociarse con riesgo de caries dental o como factor de protección. Realizaron PCR para cada gen y mediante la prueba de análisis de desequilibrio de transmisión (TDT) se analizaron tres grupos de dentición: primaria, mixta y permanente. Observaron asociaciones estadísticamente significativas en TAS2R38 y TAS1R2 de riesgo de caries y/o protección.¹⁰¹

La GST es una familia de isoenzimas que actúan en la fase II del metabolismo de xenobióticos, es por esto que se han realizado diversos estudios acerca de su asociación con diversas enfermedades multifactoriales. En el caso de Davies, et al. (2000), estudiaron la asociación entre el genotipo nulo de GST M1 y T1 con un aumento en el riesgo de leucemia mieloide y mielodisplasia en niños. Realizaron PCR para detectar los genotipos de GSTM1 y GSTT1 en 232 casos y 153 controles, reportaron que la frecuencia de GSTM1 nulo fue mayor en los casos (p=0.01), concluyendo que el genotipo nulo GSTM1 es un factor de riesgo para la

leucemia mieloide en la infancia. Así mismo Joseph et al. (2004), reportaron que los polimorfismos nulos de GSTM1 Y GSTT1 influyen en la susceptibilidad de la leucemia linfoblástica aguda en la infancia.^{102, 103}

Brockstedt et al. (2002), investigaron la relación entre aductos de ADN y los polimorfismos genéticos de GSTT1, GSTM1, GSTP1 encontrando que los niveles de aductos fueron 45% mayor en individuos con las variantes de GSTP1b o GSTP1c (Ile-Ile) comparado con aquellos con el alelo silvestre.¹⁰⁴

Zhi-Jiang et al. (2011), realizaron una revisión de la literatura en búsqueda de estudios de casos-controles que examinaran la asociación entre los genotipos nulos de GSTM1, GSTT1 y cáncer oral, identificaron 28 estudios y el análisis de ellos mostraron que el genotipo nulo de GSTM1 está asociado con un mayor riesgo de cáncer oral en asiáticos, pero no en la raza caucásica y esta asociación puede ser modificada por el hábito de fumar. El genotipo nulo de GSTT1 no está claramente asociado con el cáncer oral.¹⁰⁵

Por otro lado Devasena, et al. (2011), realizaron un estudio de casos control para ver la posible asociación de variantes genéticas involucradas en el metabolismo de xenobióticos con el riesgo de cáncer oral. Reportaron que los polimorfismos GSTM1 (-/-) y GSTT1 (-/-) están asociados con el cáncer oral.¹⁰⁶

Iarmarcovai et al. (2008), realizaron una revisión de la literatura de estudios en población humana que abordan la relación entre los polimorfismos genéticos y la formación de micronúcleos (MN) y da una idea de cómo las variantes genéticas podrían modular el efecto de la exposición ambiental a agentes genotóxicos, factores del huésped (sexo, edad), las características del estilo de vida (tabaco, alcohol) y las enfermedades (enfermedad de la arteria coronaria, cáncer). Encontraron 62 estudios que midieron la frecuencia de MN tanto en linfocitos de sangre periférica como en células exfoliadas, después de una extensa búsqueda en la base de datos Medline / PubMed. De esta revisión concluyeron que los polimorfismos de GSTT1 y GSTM1 son de especial importancia en la modulación

de la frecuencia de daño cromosómico en personas expuestas a agentes genotóxicos y en poblaciones no expuestas.¹⁰⁷

También se han asociado los polimorfismos de GST con el metabolismo de los plaguicidas, como es el caso del estudio realizado por Singh et al. (2011), quienes examinaron a 115 trabajadores expuestos a plaguicidas organofosforados, evaluaron el daño al ADN asociado con los polimorfismos GSTT1, GSTM1, GSTP1. Los resultados mostraron que existía un mayor daño al ADN en aquellos trabajadores con el genotipo nulo de GSTM1 comparándolo con aquellos positivos al mismo polimorfismo. También observaron a un aumento del daño significativo cuando presentaban el genotipo GSTP1 (Ile-Ile) en comparación con las variantes heterocigas (Ile-Val) y silvestres (Val-Val).⁹³

Así mismo, el estudio de Liu et al. (2006), abordan el estudio de los polimorfismos genéticos involucrados en el metabolismo de xenobióticos relacionados con daño al DNA en trabajadores agrícolas expuestos a plaguicidas. Identificaron mediante PCR los genotipos CYP3A5, PON1, PON2, GSTM1, GSTT1 y GSTP1 y el daño al DNA fue evaluado con el ensayo cometa. Los resultados mostraron que las persona con mayor exposición a plaguicidas presentaron mayor daño al DNA y el modelo de regresión múltiple reveló que la edad, exposición a plaguicidas y los genotipos CYP3A5 ($p=0.04$) y GSTP1 ($p=0.02$) están asociados significativamente con el aumento al daño al DNA.¹⁰⁸

En este estudio el 52.5% presentaron el polimorfismo nulo de GSTM1 (-/-), lo cual coincide con los datos reportados en población coreana (53.8%), caucásica (53.5%) y japonesa (51.3%), con respecto al polimorfismo nulo GSTT1 (-/-) se presentó en 71.2% de los individuos, este dato difiere de los datos en poblaciones caucásicas (14.7%), coreana (54.3%) y japonesa (54%). Con relación al polimorfismo GSTP1, en el presente estudio se identificó GSTP1b (exón 5): el 12.5% presentaron el alelo silvestre, 57.7% fueron heterocigotos (Ile/Val) y el 33.7% homocigotos, estos datos son similares a los obtenidos en población sana colombiana: 13.3% presentaron el alelo silvestre (Ile/Ile), 54.2% heterocigotos

(Ile/Val), 32.5% homocigotos (Val/Val). Es importante considerar, que la población mexicana es producto de un gran mestizaje, por lo cual la distribución de estos genes polimórficos, es diferente y única, comparada con otras partes del mundo.^{109, 110, 111}

En resumen, aun cuando los polimorfismos estudiados en la presente investigación han sido abordados con otros propósitos por otros autores, al momento de la presente investigación no se tenía noticia de esfuerzo alguno para conocer la asociación de los polimorfismos GSTM1, GSTT1, GSTP1b y GSTP1c en pacientes con caries expuestos y no expuestos a plaguicidas. De tal forma que los datos aquí obtenidos abren un camino distinto en el ámbito odontológico a los abordados hasta el momento, e invitan a la búsqueda del conocimiento de la vinculación entre la carga génica determinada desde el momento de la concepción de cada individuo con la susceptibilidad que eventualmente tendrá a ciertos padecimientos.

XI. CONCLUSIONES

1. Los resultados obtenidos revelan que la presencia de los polimorfismos GSTM1 (+/+), GSTT1 (+/+), GSTP1b y GSTP1c (Ile/Ile) confieren menor susceptibilidad a la caries.
2. En el caso de los hábitos de higiene bucal y dieta cariogénica no estuvieron asociados significativamente a una mayor frecuencia de caries.
3. Con relación a la exposición a plaguicidas no se encontró asociación con la presencia de caries dental.

Por lo que el presente estudio demuestra el papel que juegan los polimorfismos de la GSTM1, GSTT1, GSTP1b y GSTP1c en el desarrollo de la caries dental, pudiendo ser utilizados como biomarcadores para la prevención de la caries.

XII. BIBLIOGRAFÍA

1. Menaker L, Morhart RE, Navia JM. Bases biológicas de la caries dental. 1ºed. Barcelona: Salvat Editores; 1986.
2. Organización Mundial de la Salud. Metodología y programa de prevención de las enfermedades buco-dentales. Serie de Informes Técnicos Número 173.OMS; 1984.
3. Köhler, W. (1974), W. D. MILLER (1853-1907), The Micro-Organisms of the Human Mouth (Unaltered Reprint of the Original Work Published in 1890 in Philadelphia). J. Basic Microbiol. 1974; 14 (1): 84.
4. Newburn E. Cariology. 3ºed. San Francisco, USA. Quintessence Publishing; 1989.
5. Keyes PH. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. Findings and implications. Arch Oral Biol. 1960; 304-20.
6. Uribe-Echeverría J. Operatoria Dental Ciencia y Practica. 1ed. Madrid: Avances Medico-Dentales; 1990.
7. Bratthal D. Stjernswärd JR. Petersson GH. Assessment of caries risks in the clinic- a modern approach. En Wilson NHF, Roulet Jf, Fuzzi M. Advances in operative dentistry: challenges of the future. 1 ed. vol 1. UK: Quintessence Pub; 2001.
8. Freitas SFT. História social da cárie dentária. 1 ed. Bauru: EDUSC; 2001.
9. Secretaría de Salud. Programa Nacional de Salud 2001-2006. Estrategia: reducir los rezagos en salud que afectan a los pobres. Programa de Acción: Salud Bucal. México: SSA, 2006:97.
10. Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades. Encuesta Nacional Caries Dental 2001. México, DF: Programa de Salud Bucal, 2001.
11. Maupomé G. Prevalencia de caries en zonas rurales y periurbanas marginadas. Salud Pública Mex. 1993; 35(4): 357-367.
12. Rivera G, Martínez J, Hernández E. Caries dental e higiene bucal en adolescentes. Rev ADM 2006; 52(6): 231-234.
13. Barrios MG. Odontología: su fundamento biológico. 1ed. Bogotá: Ltda; 1991.
14. Anderson MH. Current concepts of dental caries and its prevention. Oper Dent. 2001; 26: 11-18.
15. Marsh PD, Bradshaw DJ. Dental plaque as biofilm. J Ind Microbiol. 1995; 15: 169-75.
16. Marsh PD, Nyvad B. The oral microflora and biofilms on the teeth. En: Fejerskov O, Kidd E. Dental caries: the disease and its clinical management. 1ºed. Copenhagen: Blackwell Munksgaard; 2003.

17. Li YH, Tang N, Aspiras MB, Lau PCY, Loe JH, Ellen RP, Cvitkovitch DG. A quorum-sensing signaling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation. *J Bacteriol.* 2002; 184: 2699-708.
18. Krasse B. A short review of pathogenesis. En: *Caries Risk*. 1°ed. Chicago: Quintessence; 1985.
19. Atkinson JC, Wu Aj. Salivary gland dysfunction: Causes symptoms, treatment. *J Am Dent Assoc.* 1994; 15: 409-16.
20. Jensen ME. Diet and dental caries. *Dent Clin North Am.* 1999; 43(4): 615-33.
21. Vignarajah S. A frequency survey of sugary foods and drinks consumption in school children and adolescent in a West Indian Island. *Antigua Int Den J.* 1997; 47(5): 293-7.
22. Axelsson P. *Diagnosis and risk prediction of dental caries*. 1 ed. Vol. 2. Carol Stream: Quintessence: 2000.
23. Atkinson JC, Baum BJ. Salivary enhancement: current status an future therapies. *J Dent Educ.* 2001; 65: 1096-1101.
24. Kidd EAM, Fejerskov O. What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. *J Dent Res.* 2004; 83: c35-c38.
25. Van Nieuw AA, Veerman ECI. Saliva- the defender of the oral cavity. *Oral Diseases.* 2002; 8: 12-22.
26. Higashida B. *Odontología preventiva*. 1°ed. México: Mc Graw-Hill Interamericana: 2000.
27. Burt BA, Pai S. Sugar consumption and caries risk: a systematic review. *J Dent Educ.* 2001; 65: 1017-1023.
28. Jentsch H, Beetke E, Göcke R. Salivary analyses and caries increment over 4 years: approach by cluster analysis. *Clin Oral Invest.* 2004; 8: 156-160.
29. Arnold RR, Russell JE, Champion WJ, Brewer M, Gauthier JJ. Bactericidal activity of human lactoferrin: influence of physical conditions and metabolic state of target microorganisms. *Infect. Immun.* 1981; 32: 655-660.
30. Arnold RR, Russell JE, Champion WJ, Brewer M, Gauthier JJ. Bactericidal activity of human lactoferrin: differentiation from the status of iron deprivation. *Infect Immun.* 1982; 8; 475-486.
31. Marcotte H, Lavoie MC. Oral Microbial Ecology and the Role of Salivary Immunoglobulin A. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998; 62: 71-109.
32. Kilian M, Rolland K, Mestecky J. Interference of secretory immunoglobulin A with sorption of oral bacteria to hydroxyapatite. *Infect. Immun* 1981; 31:935-941.

33. Reinholdt, J, Kilian M. Interference of IgA protease with the effect of secretory IgA on adherence of oral streptococci to saliva-coated hydroxyapatite. *J Dent Res.* 1987; 66: 492-497.
34. Liljemark WF, Bloomquist GC, Ofstehage CJ. Aggregation and adherence of *Streptococcus sanguis*: role of human salivary immunoglobulin A. *Infect Immun.* 1979; 26: 1004-1110.
35. Cole MF, Arnold RR, Rhodes JM, McGhee RJ. Immune dysfunction and dental caries. A preliminary report. *J Dent Res* 1977; 56: 198-204.
36. Robertson PB, Mackler FB, Wright ET, Levy MB. Periodontal status of patients with abnormalities of the immune system. II. Observations over a 2-year period. *J Periodonto Res.* 1980; 51:70-73.
37. Robertson PB, Wright TE, Mackler BF, Lenertz DM, Levy BM. Periodontal status of patients with abnormalities of the immune system. *J Periodont Res.* 1978; 13:37-45.
38. Yazaki SC. Anti-*Streptococcus mutans* IgA in children with and without dental caries. *Rev Oontol Univ Sao Paulo.* 1999; 13: 211-7.
39. Conry JP, Messer LB, Boraas JC, Aepli DP, BouchardTJ Jr. Dental caries and treatment characteristics in human twins reared apart. *Arch Oral Biol.* 1993; 83: 937-43.
40. Slayton RL, Cooper ME, Marazita ML. Tuftelin, *mutans streptococci*, and dental caries susceptibility. *J Dent Res.* 2005; 84: 711-4.
41. Kang SW, Yoon I, Lee HW, Cho J. Association between AMELX polymorphisms and dental caries in Koreans. *Oral Diseases.* 2011; 17: 399-406.
42. Townsend GC, Aldred MJ, Bartold PM. Genetic aspects of dental disorders. *Aust Dent J.* 1998; 43: 269-86.
43. Könönen E, Jousimies-Somer H, Asikainen S. Relationship between oral gram-negative anaerobic bacteria in saliva of the mother and the colonization of her edentulous infant. *Oral Microbio. Immuno.* 1992; 7: 273-76.
44. Socransky SS, Manganiello SD. The oral microbiota of man from birth to senility. *J. Periodontol.* 1993; 38: 227-232.
45. Tabak LA, Structure and function of human salivary mucins. *Crit Rev Oral Biol. Med* 1990; 4: 229-34.
46. Marsh PD, Percival SR, Challacombe JS. The influence of denture-wearing and age on the oral microflora. *J Dent Res.* 1992; 71; 374-1381.
47. Percival RS, Challacombe JS, Marsh DP. Age related microbiological changes in the salivary and plaque microflora of healthy adults. *J Med Microbiol.* 1991; 35: 5-11.

48. Percival RS, Challacombe JS, Marsh DP. Flow of resting whole and stimulates parotid saliva in relation to age and gender. *J Dent Res.* 1994; 73: 1416-1420.
49. Tenovuo J. Oral defense factors in the ederly. *Endod Dent Trauma.* 1992; 8: 93-8.
50. Wigen TI, Wang NJ. Maternal health and lifestyle, and caries experience in preschool children. A longitudinal study from pregnancy to age 5 yr. *Eur J Oral Sci.* 2011; 119(6): 463-8.
51. Evans JJ, Wilkinson RA, Aickin RD. Salivary estriol concentration during normal pregnancy, and comparison with plasma estriol. *Clin Chem.* 1984; 30: 120-21.
52. Lachelin GC, Mcgarrigle GHH. A comparison of saliva, plasma, unconjugated and plasma total estriol levels throughout. *Br J Obstet Gynaecol.* 1984; 91: 1203-9.
53. Zacharisen RD. The effect of elevated ovarian hormones on periodontal health: oral contraceptives and pregnancy. *Women Health.* 1993; 20: 21-30.
54. Kornman KS, Loesche JW. Effects of estradiol and progesterone on *Bacteroides melaninogenicus* and *Bacteroides gingivalis*. *Infect Immun.* 1982; 35: 256-63.
55. Aligne AC, Moss EM, Auinger P, Weitzman M. Association of Pediatric Dental Caries With Passive Smoking. *JAMA.* 2003; 289(22): 2940.
56. Smoilar NI, Ketsman IN, Kolesnichenko AV, Solonko GM. Dental caries in preschoolers living in a rural locality. *Stomatologija.* 1990; 69: 58-9.
57. Jan J, Reinert K. Dental caries in Faroese children exposed to polychlorinated biphenyls. *Env Toxic Pharma.* 2008; 25:188–19.
58. Barrancos MJ, Barrancos PJ. *Operatoria Dental.* 4°ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2006.
59. Summit JB. Nomenclature and instrumentation. En: Schwartz R, Summit JB, Robbins JW. *Fundamentals of operative dentistry. A contemporary approach.* 2°ed. Illinois: Quintessence books; 2001:113-148.
60. Lanata EJ. *Operatoria dental estética y adhesión.* 1°ed. Buenos Aires: Grupo guía; 2003: 33-38.
61. Whitehead SA, Wilson NHF. Restorative decision-making behavior with magnification. *Quintessence Int.* 1992;23:667-71.
62. Organización Mundial de la Salud (OMS) Consecuencias Sanitaria del Empleo de Plaguicidas en la Agricultura. Ginebra, Suiza, 1992; 128.
63. Córdoba PD. *Toxicología.* Colombia: Manual Moderno; 2001.
64. Martínez VC, Gómez AS, Villalobos PR, Waliszewski S, Calderón SME, Félix GR, Alvarez TA. Genotoxic biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticides in the north of Sinaloa state, Mexico. *Enviromental International.* 2009; 35: 1155-59.

65. Bolognesi C, Perrone E, Landini E. Micronucleus monitoring of a floriculturist population front western Liguria Italy. *Mutagenesis*. 2002; 17: 391-7.
66. Flack G, Hiroven A, Scarpato R, Saarikoski S, Migliore L, Norppa H. Micronuclei in blood lymphocytes and genetic polymorphism GSTM1, GSTT1 and NAT2 in pesticide exposed greenhouse workers. *Mutat Res*. 1999; 441: 225-37.
67. Tardiff GR, Lohman MHP, Wogan NG. *Methods to assess DNA damage and repair*. 1°ed. John Wiley & Sons: UK; 1994.
68. Reigart R, Roberts J. *Recognition and Management of Pesticide Poisonings*. Chapter IV EPA's Office of Pesticide Programs, 1999; 34-6.
69. Ceballos G, List R, Garduño G, Lopez CR, Muñozcno QJ, Colldo E, San Román EJ. *La diversidad biológica del Estado de México*. 1°ed. Secretaria del medio ambiente: México; 2009.
70. INEGI: Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. México: INEGI; 2010.
71. Varona M, Cárdenas O, Crane C, Rocha S, Cuervo G, Vargas J. Alteraciones citogenéticas en trabajadoras con riesgo ocupacional de exposición a plaguicidas en cultivos de flores en Bogotá. *Biomédica*. 2003; 23: 141-152.
72. Cuenca P, Ramírez V. Mutagénesis ambiental y el uso de biomarcadores para predecir el riesgo de cáncer. *Rev. biol. trop [revista en la Internet]*. 2004 Sep [citado 2012 Mayo 13]; 52(3): 585-590. Disponible en: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442004000300020&lng=es.
73. Coles B, Ketterer B. The role of human glutathione and glutathione transferases in chemical carcinogenesis: *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 1990; 25: 47.
74. Devlin MT. *Bioquímica*. 5°ed. USA: Reverté; 2004.
75. Tang J, Cao Y, Rose LR, Brimeld AA, Dai D, Goldstein AJ, Hodgson E. Metabolism of chlorpyrifos by human cytochrome P450 isoforms and human, mouse, and rat liver microsomes, *Drug Metab. Dispos*. 2001; 29: 1201-120.
76. Mutch E, Williams MF, Diazinon, chlorpyrifos and parathion are metabolized by multiple cytochromes P450 in human liver, *Toxicology*. 2006; 224: 2232.
77. Fujioka K, Casida EJ. Glutathione S-transferase conjugation of organophosphorus pesticides yields S-phospho-, S-aryl-, and S-alkylglutathione derivatives. *Chem Res Toxicol*. 2007; 20: 1211-1217.
78. Sirgo G, Pérez JL, Renes E, Rubio M, Paredes S, García A, Hernández E, Morales P, Del Rey M, Perales N. Role of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 4G/5G

- promoter polymorphism in cardiac surgery outcome: ventricular dysfunction, mortality, postoperative complications and functional recovery. *Investigación Cardiovascular*. 2004; 7: 116-130.
79. Checa CM. Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *Instituto Nac Enferm Resp Méx*. 2007; 20(3): 213-221.
80. Lozano GE, Reza GO, Urtiz EN, López GD and Vertiz HA. Genetics polymorphisms associated to type 2 diabetes mellitus. *Rev Mex Cienc Farma*. 2010; 41 (4): 7-17.
81. Eaton LD, Bammler T. Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Tox Sc*. 1999; 49: 156-64.
82. Bolt HM, Thier R. Relevance of the deletion polymorphisms of the glutathione S-transferases GSTT1 and GSTM1 in pharmacology and toxicology. *Current Drug Metabolism*. 2006; 7:613-628.
83. Hayes JD, Fanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*. 2005; 45: 51-88.
84. Wilce MC and Parker MW. Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochim Biophys*. 1994; 1:18.
85. Ikeda H, Serria MS, Kakisaki I, Hatayama I, Satoh K, Tsuchida S, Muramatsu M, Nishin S, Sakai M. Activation of mouse Pi-class glutathione S-transferase gene by Nrf2 (NF-E2-related factor 2) and androgen. *Biochem J*. 2002; 364: 563- 570.
86. Oliveira AL, Rodríguez FO, Santos RE, Aoki T, Rocha MN, Longui CA and Melo MB. GSTT1, GSTM1, and GSTP1 polymorphisms and chemotherapy response in locally advanced breast cancer. *Gene Molec Res*. 2010; 9(2): 1045-1053.
87. Laffon BL, Pérez CB, Méndez FJ. Influencia de determinados polimorfismos de enzimas metabólicas en la genotoxicidad del estireno. *Premio Alcalíber de la Real Academia Nacional de Farmacia*. 2004; 70: 95-123.
88. Castillo CJ, Contreras SC, Poblano RB, Posada RP y García JR. Actividad en la enzima Glutation S-transferasa T1 en floricultores expuestos a plaguicidas. *Bioquímica*. 2007; 32: 138.
89. Ali-Osman F, Akande O, Antoun G, Mao JX and Buolamwini J. Molecular cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of full-length cDNAs of three human Glutathione S-Transferase Pi gene variants. *J Biol Chem*. 1997; 272(15): 10004–10012.
90. Leite JL, Morari CE, Granja F, Campos MG, Guilhen CA and Laura S. Ward SL. Influence of the glutathione s-transferase gene polymorphisms on the susceptibility to basal cell skin carcinoma. *Rev Méd Chile*. 2007; 135: 301-306.

91. Azofeifa A. Uso de marcadores moleculares en plantas; Aplicaciones en frutales del trópico. *Agro Mesoam*. 2006; 17 (2): 221-242.
92. Strachan T and Read A. 1999. *Human Molecular Genetics 2*. Wiley-Liss. New York. Chapter 2.
93. Singh S, Kumar V, Sing P, Thakur S, Dev Banerjee B, Singh RR, et al. Genetic polymorphisms of GSTM1, GSTT1, GSTP1 and susceptibility to DNA damage in workers occupationally exposed to organophosphate pesticides. *J Mr Gen Tox*. 2011; 725:36-42.
94. Castillo J, Tenorio-Vieyra L, Quintana-Carabia I, García-Fábila M, Juan ER-S, Madrigal-Bujaidar E. Determination of DNA Damage in Floricultorists exposed to Mixtures of Pesticides. *J Biomed Biotech*. 2006;1-12.
95. Resultados del Sistema de Vigilancia Epidemiológica de patologías Bucales SIVEPAB-2010. Disponible en:
http://cenavece.salud.gob.mx/programas/interior/saludbucal/descargas/pdf/sivepab2010_completo.pdf. Acceso el 06 de marzo del 2012.
96. Irigoyen ME, Zepeda MA, Sánchez L, Molina N. Prevalencia e incidencia de caries dental y hábitos de higiene bucal en un grupo de escolares del sur de la Ciudad de México: estudio de seguimiento longitudinal. *Rev ADM*, 2001; 53(3): 98-104.
97. Deshpande A, Deshpande N. Similar caries pattern in monozygotic twins: Role of nature and/or nurture. *Euro Gen Dent*. 2012; 1: 104-108.
98. Townsend GC, Richards LC, Brown T, Burgess VB. Twin zygosity determination on the basis of dental morphology. *J Forensic Odontostomatol* 1988;6:1-15
99. Bretz WA, Corby PM, Schork NJ, Robinson MT, Coelho M, Costa S, et al. Longitudinal analysis of heritability for dental caries traits. *J Dent Res*, 2005; 84: 1047-51.
100. Conry JP, Messer LB, Boraas JC, Aepli DP, Bouchard TJ Jr. Dental caries and treatment characteristics in human twins reared apart. *Arch Oral Biol*, 1993; 38: 937-43.
101. Wendell S, Wang X, Brown M, Cooper ME, DeSensi RS, Weyant RJ, Crout R, et al. Taste genes associated with dental caries. *J Dent Res*, 2010; 89(11): 1198–1202.
102. Davies SM, Robison LL, Buckley JD, et al: Glutathione S-transferase polymorphisms in children with myeloid leukemia: A Children's Cancer Group study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2000; 9: 563-566.
103. Joseph T, Kusumakumary P, Chacko P, Abraham A, Radhakrishna PM. Genetic polymorphism of *CYP1A1*, *CYP2D6*, *GSTM1* and *GSTT1* and susceptibility to acute lymphoblastic leukaemia in Indian children. *Pediatr. Blood Cancer*, 2004; 43: 560–567.

104. Brockstedt U, Krajcinovic M, Richer C, Mathonnet G, Sinnett D, Pfau W, et al. Analyses of bulky DNA adduct levels in human breast tissue and genetic polymorphisms of cytochromes P450 (CYPs), myeloperoxidase (MPO), quinone oxidoreductase (NQO1), and glutathione S-transferases (GSTs). *Mutat. Res.* 2002; 516, 41–47.
105. Zhi-Jiang Zhang, Genmig Zhao, Guo-Xin Jiang, Yiging Song, Xiaohui Xu, Jin Ma. Glutathione S-Tranferase M1 (GSTM1) and Glutathione S-Tranferase T1 (GSTT1) Null Polymorphisms, Smoking, and Their Interaction in Oral Cancer: A Huge Review and Meta-Analysis. *Am. J. Epidemiol.* 2011; 173 (8): 847-857.
106. Devasena A, Pranay MC, Sadhana K, Rajani AB, Manoj BM. Susceptibility to oral cancer by genetic polymorphisms at CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 loci among Indians, tobacco exposure as a risk modulator. *Carcinogenesis.* 2007; 28, 1455-62
107. Iarmarcovai G, Bonassi S, Botta A, Baan RA, Orsière T. Genetic polymorphisms and micronucleus formation: A review of the literature. *Mut Res/Rev Mut Res.* 2008; 658 (3); 215-233.
108. Liu YJ, Huang PL, Chang YF, Chen YH, Chiou YH, Xu ZL, Wong RH. GSTP1 Genetic Polymorphism Is Associated with a Higher Risk of DNA Damage in Pesticide-Exposed Fruit Growers. *Cancer Epidemiol Biom Prev.* 2006;15(4):659-666
109. Cho HJ, Lee SY, Ki CS, Kim JW. GSTM1, GSTT1 and GSTP1 Polymorphisms in the Korean Population. *J Korean Med Sci.* 2005; 20(6): 1089-1092.
110. Chen CL, Liu Q, Relling MV. Simultaneous characterization of glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms by polymerase chain reaction in American whites and blacks. *Pharmacogenetics* 1996; 6: 187–191.
111. Naoe T, Takeyama K, Yokozawa T, Kiyoi H, Seto M, Uike N, Ino T, et al. Analysis of genetic polymorphism in NQO1, GSTM1, GSTT1, and CYP3A4 in 469 Japanese patients with therapy-related leukemic/myelodysplastic syndrome and de novo acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 4091–4095.
112. World Health Organization. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century - the approach of the WHO Global Oral Health Programme. Geneva, WHO, 2003.

XIII. ANEXOS

1. Carta de Consentimiento Informado



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS
CONSENTIMIENTO INFORMADO
PARA PARTICIPANTES DE INVESTIGACIÓN**

Título de la investigación: **Detección de los polimorfismos del gen Glutación S-transferasa en individuos con caries expuestos ocupacionalmente a plaguicidas**

A usted se le está invitando a participar en este estudio de investigación médica. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme este formato de consentimiento.

Este proyecto de investigación consiste en:

Se estudiará el Labio y Paladar Hendido por que es una de las malformaciones congénitas más significativas que afectan al ser humano, debido a la frecuencia con la que esta aparece y su complejidad ya que se trata de un proceso multifactorial, siendo una condición progresiva, costosa y que provoca diversos efectos sobre la salud de las personas, se infecta el diente y se forman cavidades, provocando dolor y de no tratarse a tiempo se tendrá que extraer el diente. Estudios realizados anteriormente han reportado que la contaminación ambiental influye en el surgimiento y evolución de la caries. En contraste se han evaluado los efectos de los plaguicidas sobre la salud como son: daño agudo y persistente en el sistema nervioso, respiratorio y endocrino; teniendo también capacidad de actuar como mutagénicos y carcinógenos. Debido a que cada individuo posee una carga genética diferente, la repuesta a tóxicos también difiere de persona a persona.

Procedimientos del estudio:

Si usted accede a participar en este estudio, se le pedirá responder a un cuestionario acerca de sus hábitos higiénicos dietético, se realizará la detección de caries en todos los dientes y se tomará una muestra de sangre.

La muestra de sangre se utilizara para dos propósitos:

1. Detectar la presencia de plaguicidas en la sangre.
2. Identificar tres genes que participan en la desintoxicación de los plaguicidas.

Es importante que usted esté enterado que el material que se utilizará es nuevo y estéril.

Posibles riesgos:

- Al hacer la toma de muestra, debido a la inserción de la aguja para extraer sangre, algunas personas sienten ligero dolor.
- El paciente puede presentar un moretón después de la toma de sangre.

La participación en este estudio es estrictamente voluntaria. La información que se recoja será confidencial y no se usará para ningún otro propósito fuera de los de esta investigación. Sus respuestas al cuestionario serán codificadas usando un número de identificación y por lo tanto, serán anónimas.

Cualquier duda que tenga, siéntase en libertad de expresarla de manera que quede satisfecho.

De antemano le agradecemos su participación.

Acepto participar voluntariamente en esta investigación. He sido informado (a) del objetivo de este estudio.

Me han indicado también que tendré que responder un cuestionario, me realizarán un diagnóstico de caries, y me tomarán una muestra de sangre.

Reconozco que la información que yo provea en el curso de esta investigación es estrictamente confidencial y no será usada para ningún otro propósito fuera de los de este estudio sin mi consentimiento. He sido informado de que puedo hacer preguntas sobre el proyecto en cualquier momento y que puedo retirarme del mismo cuando así lo decida, sin que esto acarree perjuicio alguno para mi persona.

Entiendo que puedo pedir información sobre los resultados de este estudio cuando esté concluido.

Responsables de la investigación:

C.D. Mariana Gabriela Lecourtois Amézquita cel. 7222457582

Dr. en E. P. Alberto Salgado Valdés

Dra. en C.Q.B Julieta Castillo Cadena

Firma del participante

Firma del investigador

Firma testigo

2. Cuestionario



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

FOLIO: _____ Fecha: ___/___/___
Ocupación: _____ Edad: _____
Sexo: F _____ M _____ Lugar De Residencia: _____ Nacionalidad: _____
Nacionalidad de Padre: _____ Nacionalidad de Madre: _____

1. ¿Ha usado servicios de salud bucodental? Si _____ No _____
Cuantas veces en el último año: _____

2. ¿Cuántas veces al día se cepilla los dientes?

Ninguna vez _____

1 vez _____

2 veces _____

3 o mas _____

¿Utiliza hilo dental? si _____ no _____

Frecuencia:

Diario _____

Semanal _____

3. ¿Utiliza enjuague bucal?

Si _____

No _____

4. Dieta cariogénica (frecuencia de consumo)

• Dulces

Diariamente _____

3 o más veces a la semana _____

1-2 veces a la semana _____

Menos de 1 vez a la semana _____

Nunca o casi nunca _____

• Refrescos azucarados

Diariamente _____

3 o más veces a la semana _____

1-2 veces a la semana _____

Menos de 1 vez a la semana _____

Nunca o casi nunca _____

• Refrigerios (comida entre comidas)

Diariamente _____

3 o más veces a la semana _____

1-2 veces a la semana _____

Menos de 1 vez a la semana _____

Nunca o casi nunca _____

5. Grado de escolaridad:

Primaria _____ años

Secundaria _____ años

Bachillerato _____ años

Licenciatura _____ años

Tecnico _____ años

Posgrado _____ años

7. Emplea algún tipo de plaguicida en su trabajo o casa:

No _____

Si _____

¿Cuál o cuáles? _____

¿Cuánto tiempo al día? _____

¿Desde hace cuánto tiempo se encuentra expuesto? _____

SIGUIENTE RUBRO LLENAR SOLO EN CASO DE QUE SU OCUPACION SEA FLORICULTOR:

A. ¿Cuántos años tiene dedicándose a la floricultura? _____

B. ¿Qué actividades realiza?

____ Siembra ____ Corte ____ Bonche ____ Fumigar ____ Desbotonar ____ Otro

C. ¿Cuáles compuestos ha aplicado?

____ Lannate ____ Tamaron ____ Tecto ____ Agrimec ____ Nuvacron ____ Furadan ____ Ridomil gold

____ Manzate 200 ____ Benlate ____ Tal star ____ Fungicel ____ Pentaclor 600F ____ Curacron 500 FC

____ Omite ____ Cascade Otros _____

D. ¿Usted prepara los plaguicidas para aplicarlos? _____

E. ¿Cada cuando los aplica? _____

F. ¿Utiliza equipo de protección y cuáles? No _____ Si _____

____ Guantes ____ Mandil ____ Mascarilla ____ Overol ____ Botas

3. Formato para registro de caries

FOLIO: _____

FECHA: ___/___/___

18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38

TOTAL: _____

4. Resultados del Genotipo y Número de Órganos Cariados del Grupo

- Grupo Expuesto

# Caso	GSTP1				Caries
	GSTM1	GSTT1	Exón 5	Exón 6	
1	+	+	a/a	a/a	0
2	+	+	a/b	a/a	1
3	-	-	b/b	a/c	17
4	-	-	b/b	a/c	7
5	+	+	b/b	a/a	2
6	-	-	b/b	a/a	13
7	+	-	a/b	a/c	14
8	+	-	a/b	a/c	18
9	+	+	b/b	a/a	4
10	+	-	a/b	a/c	10
11	+	-	a/b	a/c	14
12	-	-	a/b	a/c	17
13	+	-	a/b	a/a	8
14	+	+	a/b	a/a	1
15	+	-	a/b	a/c	8
16	-	-	a/b	a/a	12
17	-	-	a/b	a/a	8
18	-	-	b/b	a/a	7
19	-	-	a/b	a/a	11
20	+	-	a/b	a/c	11
21	-	-	b/b	a/c	10
22	+	-	b/b	a/a	4
23	+	+	a/b	a/a	4
24	+	+	a/b	a/a	3
25	+	-	a/b	a/a	3
26	+	-	a/b	a/c	7
27	+	-	b/b	a/a	4
28	-	-	a/b	a/a	10
29	-	-	b/b	a/c	10
30	+	+	a/b	a/a	4
31	-	-	b/b	a/a	7
32	+	-	b/b	a/c	9
33	+	-	a/b	a/c	8
34	+	+	a/b	a/a	0
35	+	-	a/b	a/c	8
36	+	+	a/b	a/a	2
37	-	-	b/b	a/a	9
38	-	-	a/b	a/a	7
39	+	-	a/b	a/a	2
40	+	+	a/b	a/a	4

• Grupo No Expuesto

# Caso	GSTP1				Caries
	GSTM1	GSTT1	Exón 5	Exón 6	
1	-	-	a/b	a/a	6
2	+	-	a/a	a/a	3
3	-	-	a/b	a/c	10
4	-	+	a/a	a/a	3
5	+	+	b/b	a/a	3
6	+	-	a/b	a/c	15
7	-	-	b/b	a/c	17
8	-	-	b/b	a/a	15
9	-	+	b/b	a/a	16
10	-	-	a/b	a/a	7
11	+	+	a/b	a/c	12
12	-	-	a/b	a/a	8
13	-	-	b/b	a/a	8
14	+	+	a/a	a/a	3
15	-	-	a/b	a/a	11
16	+	+	a/a	a/a	1
17	-	-	b/b	a/a	8
18	-	-	a/b	a/a	17
19	-	-	b/b	a/a	10
20	+	+	b/b	a/c	13
21	-	-	a/b	a/a	11
22	+	+	a/a	a/a	2
23	-	-	a/b	a/a	12
24	+	+	a/b	a/a	4
25	-	-	a/b	a/a	14
26	-	-	a/b	a/a	9
27	-	-	b/b	a/a	12
28	-	-	a/a	a/c	7
29	-	-	b/b	a/a	11
30	+	+	b/b	a/a	3
31	-	-	b/b	a/c	19
32	-	-	a/b	a/c	17
33	-	-	a/a	a/c	11
34	-	-	b/b	a/c	13
35	+	+	b/b	a/a	5
36	-	-	a/b	a/a	19
37	+	-	a/a	a/c	6
38	-	+	a/a	a/c	14
39	-	-	a/b	a/c	11
40	-	-	a/b	a/a	8

5. Oficio de Aprobación del Comité de Ética del Hospital A. López Mateos



GOBIERNO DEL
ESTADO DE MÉXICO



“2012. Año del Bicentenario de El Ilustrador Nacional”

Toluca de Lerdo, México a
16 de Agosto de 2012
C. M. L. A. L. M/DIR/217BE50061/4577/2012

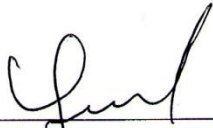
Acta Informativa

Siendo las 10:00 horas del día 02 de Julio de 2012, reunidos en el Aula 2 de la Subdirección de Enseñanza e Investigación, el Subcomité de Enseñanza, Investigación y Ética procedemos a revisar el trabajo de tesis: “DETECCIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN GLUTATIÓN S-TRANSFERASA EN INDIVIDUOS CON CARIES EXPUESTOS OCUPACIONALMENTE A PLAGUICIDAS” realizado C. D. MARIANA GABRIELA LECOURTOIS AMEZQUITA el cual ha sido **APROBADO** por decisión unánime.

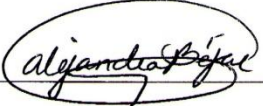
Se da por terminada la reunión siendo las 10:30 horas del día 16 de agosto de 2012. Firmando al calce los integrantes del Subcomité de Enseñanza, Investigación y Ética de este Centro Médico.



Dr. José Rogel Romero
Director del Centro Médico



Dra. Yolanda Flores Cánovas
Subdirectora de Enseñanza e Investigación
Secretaria del Subcomité de
Enseñanza e Investigación



Lic. Alejandra Béjar Calzada
Jefa de la Unidad de Calidad
Coordinadora del Subcomité de Enseñanza
e Investigación



Dr. en E. P. Alberto Salgado Valdés
Director de Tesis.

SECRETARÍA DE SALUD DEL ESTADO D
INSTITUTO DE SALUD DEL ESTADO D
COORDINACION DE HOSPITALES REGIONALES DE ALTA ESPECIALIDAD
CENTRO MEDICO "LIC. ALFONSO LÓPEZ

6. Constancia de Participación en Congreso

XX ENCUENTRO NACIONAL Y XI IBEROAMERICANO DE INVESTIGACIÓN EN ODONTOLOGÍA

Universidad Veracruzana
Facultad de Odontología

Otorga la presente
CONSTANCIA
a

C.d. E. En E. Mariana Gabriela Lecourtois Amézquita
Por su participación con la ponencia titulada

POLIMORFISMOS EN PERSONAS CON CARIES EXPUESTAS A
PLAGUICIDAS

En el XX ENCUENTRO NACIONAL Y XI IBEROAMERICANO DE
INVESTIGACIÓN EN ODONTOLOGÍA

"LIZ DE VERACRUZ, ARTE, CIENCIA, LUZ"
BOCA DEL RIO VERACRUZ DEL 7 AL 9 DE NOVIEMBRE DEL 2012

Dr. Miguel Ángel Díaz Casillejos
Director de la Facultad de Odontología

Dra. Clara Luz Parra Uscanga
Comité organizador

Mtro. Jorge Alanís Tavira
Presidente del SNO