



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
DEPARTAMENTO DEL ICOD
ÁREA DE FÍSICA
LABORATORIO DE METABOLISMO MUSCULAR**

“Efectos del Metil Metacrilato sobre la viabilidad de células musculares, fuerza y resistencia muscular en ratones”

Pamela Alvarado Nail

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA**

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Paola Llanos Vidal

TUTORES ASOCIADOS

Dra. Andrea Paula-Lima

**Adscrito a Proyecto FONDECYT Regular 1190406
Santiago - Chile
2021**

Hoja Intencionalmente en Blanco



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DEL ICOD
ÁREA DE FÍSICA
LABORATORIO DE METABOLISMO MUSCULAR**

“Efectos del Metil Metacrilato sobre la viabilidad de células musculares, fuerza y resistencia muscular en ratones”

Pamela Alvarado Nail

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA**

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Paola Llanos Vidal

TUTORES ASOCIADOS

Dra. Andrea Paula-Lima

**Adscrito a Proyecto FONDECYT Regular 1190406
Santiago - Chile
2021**

DEDICATORIA

A mis Padres, mi Hermano y mi Familia.

“Luchar hasta el último aliento.”

William Shakespeare

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Sarela y Sergio, a mi hermano Sergio, a Delly y María Isabel por todo su apoyo y amor incondicional todos estos años de vida universitaria.

A mi familia completa que me han apoyado de distintas formas a lo largo de toda mi carrera.

A mis amigos Carla y Nico por siempre estar cuando más los necesitaba y por seguir estando.

A mis amigos Diego, Rolo, Fran Godoy, Cristóbal, Pipe Barragán, Pipe Chávez, Dani Bautista por cuidar de mí en los periodos de enfermedad. A mis amigos de la casa por su cariño y su apañe todos estos años. A todas, todos y todes mis amigues que han estado toda la vida o por períodos y que me han apoyado durante mi carrera universitaria, en especial en este proceso de tesis a Monte, Ale, Pipe y Vale.

A mis tutoras Paola y Andrea por guiarme en este camino, por la paciencia y la dedicación. A la Comisión Evaluadora por sus comentarios para hacer de este trabajo una mejor versión. A las coordinadoras del ramo Claudia y Carla por su constante preocupación. Agradecimientos al Proyecto FONDECYT Regular 1190406.

A todos los espacios de construcción y su gente que de alguna u otra manera me han formado: CCEO, Tutorías TIP, Proyecto de Señas, Salsalud, Bem, TVO.

A mis pacientes por su disposición, por tener confianza en mí y por ser un siete conmigo.

Al Gonzalo por apoyarme y darme el último empujón.

Finalmente, a mi querida Universidad de Chile, eternamente agradecida y orgullosa de ser una hija de Bello.

Índice

| | |
|---|----|
| 1) RESUMEN | 7 |
| 2) INTRODUCCIÓN | 8 |
| 3) MARCO TEÓRICO:..... | 10 |
| 3.1 METIL METACRILATO: USOS Y APLICACIONES EN ODONTOLOGÍA..... | 10 |
| 3.2 METIL METACRILATO: COMPOSICIÓN Y CARACTERÍSTICAS..... | 11 |
| 3.3 CITOTOXICIDAD DEL METIL METACRILATO | 13 |
| 3.4 CÉLULAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS..... | 16 |
| 3.5 EFECTOS SISTÉMICOS Y MANEJO DEL COMPUESTO..... | 17 |
| 4) HIPÓTESIS Y OBJETIVOS: | 24 |
| 4.1 HIPÓTESIS. | 24 |
| 4.2 OBJETIVO GENERAL. | 24 |
| 4.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 24 |
| 5) MATERIALES Y MÉTODOS: | 25 |
| 5.1 REACTIVOS. | 25 |
| 5.2 CONSIDERACIONES BIOÉTICAS Y DE BIOSEGURIDAD. | 25 |
| 5.3 TIPO DE ESTUDIO, POBLACIÓN Y SELECCIÓN DE LA MUESTRA..... | 25 |
| 5.4 CULTIVO DE FIBRA MUSCULAR A PARTIR DEL MÚSCULO FDB. | 26 |
| 5.5 RATONES..... | 26 |
| 5.6 MEDICIÓN DE VIABILIDAD CELULAR..... | 27 |
| 5.7 MEDICIÓN DE LA RESISTENCIA Y FUERZA MUSCULAR. | 28 |
| 5.8 ANÁLISIS DE RESULTADOS. | 31 |
| 6) RESULTADOS: | 32 |
| 6.1 EFECTOS DE METIL METACRILATO SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR EN CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS DE RATÓN..... | 32 |
| 6.2 EFECTO AGUDO DE METIL METACRILATO LÍQUIDO EN EL RENDIMIENTO FÍSICO EN RATONES..... | 34 |
| 6.3 EFECTO CRÓNICO DEL METIL METACRILATO LÍQUIDO EN LA FUERZA MUSCULAR EN ROEDORES. | 36 |
| 7) DISCUSIÓN:..... | 37 |
| 8) CONCLUSIONES: | 42 |
| 9) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS: | 43 |
| 10) ANEXOS Y APÉNDICES: | 51 |

1) Resumen

Introducción: Las resinas acrílicas son utilizadas a menudo en los procedimientos de restauración indirecta y prótesis. Frecuentemente, son elaboradas a partir de Metil Metacrilato (MMA), un compuesto químico de fórmula $C_5H_8O_2$ que presenta toxicidad sobre distintos tipos celulares. Sin embargo, en el caso de células musculares esqueléticas la literatura es escasa, pese a que estas células contráctiles desempeñen funciones esenciales al movimiento. El propósito de este estudio es determinar si el MMA posee efecto citotóxico sobre células musculares esqueléticas, y por consiguiente afecte la resistencia y fuerza muscular de roedores expuestos aguda y crónicamente al compuesto.

Material y métodos: Cultivos primarios de fibras musculares esqueléticas del músculo *Flexor digitorum brevis* (FDB) de ratón fueron expuestos a diferentes concentraciones de MMA en su forma líquida y sólida. La viabilidad celular se evaluó a través del método del bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) 2 horas post tratamiento. Se utilizaron ratones Balb/C de 8 semanas, los cuales se sometieron a la inhalación aguda del compuesto durante 3 horas por 4 días consecutivos. Y crónica, bajo el mismo régimen, pero durante 4 semanas (28 días). Tras cada protocolo, se evaluó la resistencia y fuerza muscular de los ratones a través del Test de natación forzada con peso y el Test agarre de pantalla invertida, respectivamente.

Resultados: La adición al cultivo de fibras musculares del MMA líquido a altas concentraciones (10% v/v) produce una disminución masiva de la viabilidad celular, que alcanzó un valor $4,0 \pm 4,1$ %. Por otro lado, en su presentación sólida a una concentración de 9,4 mg/ml, se observó valores de $56 \pm 8,8$ % de viabilidad celular. En los roedores expuestos aguda y crónicamente a la inhalación del vapor de MMA líquido, se observó una disminución tanto en la fuerza como la resistencia muscular, en comparación a los ratones controles (expuestos a agua).

Conclusiones: Los resultados sugieren que la exposición al MMA (en su forma líquida y sólida), tiene un efecto tóxico y nocivo sobre el músculo esquelético tanto en cultivos celulares como animales, esto se debe considerar durante su manipulación, con el fin de preservar la salud de la comunidad Odontológica.

2) Introducción

Los materiales acrílicos son ampliamente usados en distintas áreas desde la industria textil hasta en las ciencias médicas. En medicina y odontología, se utilizan para prótesis orales, ortopedia (cirugías de artroplastia), oftalmología (lentes intraoculares) y cirugía maxilofacial y plástica (Soykut et al., 2020). Asimismo, existe un ritmo creciente en el desarrollo de nuevos materiales dentales disponibles para su aplicación en la clínica odontológica (Shahi et al., 2019). En particular, el uso de los materiales restauradores basados en resinas odontológicas se ha incrementado en el último tiempo, dadas las mejores propiedades mecánicas que presentan y la notable resistencia al desgaste (Ferracane, 2011). Esta amplia diversidad de materiales odontológicos ha llevado a una mayor consciencia de los riesgos biológicos y sus limitaciones (Shahi et al., 2019), realzándose la importancia de tener en consideración el concepto de biocompatibilidad al momento de estudiar un biomaterial, término que se refiere a la capacidad de un material de generar una respuesta apropiada en el huésped al momento de ser aplicado (Gautam et al., 2012).

La biocompatibilidad de un biomaterial utilizado para la sustitución o el relleno de un tejido biológico como los dientes, es un tema clínicamente relevante y ha suscitado gran interés por parte de los profesionales, la comunidad científica, y el público (Schmalz & Galler, 2017). Por lo demás, el personal dental también corre el riesgo de sufrir efectos adversos con algunos biomateriales. En efecto, en algunos casos, los riesgos son mayores para el personal que para los pacientes (Shahi et al., 2019). Por lo mismo, con el fin de proporcionar la información completa sobre la biocompatibilidad de un material dental, existe un conjunto de pruebas con diferentes puntos a investigar. Algunos de los criterios de prueba y validación son similares a los empleados con los materiales utilizados en otros sitios del cuerpo (Kenneth, 2007), que incluyen la citotoxicidad (*in vitro*), genotoxicidad/mutagenicidad (principalmente *in vitro*), reacciones locales

(animales experimentales o pruebas de simulación *in vitro*) y sensibilización (principalmente animales experimentales) (Schmalz & Galler, 2017).

Dado que los materiales dentales están directamente en contacto con la cavidad oral, es fundamental conocer a fondo la biocompatibilidad, la toxicidad y las propiedades fisicoquímicas de los materiales utilizados en odontología. Entre ellos, se encuentran las resinas acrílicas, utilizadas con frecuencia en los procedimientos de restauración indirecta y prótesis dentales (Cimpan MR et al., 2000; Rakhshan, 2015; Shahi et al., 2019). Usualmente, estos materiales tienen en su composición Metil Metacrilato (MMA), un monómero de resina acrílica que tiene una amplia variedad de aplicaciones dentales, médicas e industriales (Leggat & Kedjarune, 2003). La exposición a este material durante el estudio de la carrera de Odontología y en otros oficios como Laboratoristas Dentales es alta (Aalto-Korte et al., 2007; Al-Saadi MA et al., 2019).

Considerando lo anterior, se han planteado preocupaciones sobre la posible toxicidad del uso dental de MMA tanto para el paciente como para el entorno en el lugar de trabajo (Leggat et al., 2009). Los pacientes también están expuestos al MMA emitido de algunos aparatos dentales y, los efectos, al menos *in vitro*, parecen tóxicos para las células y pueden causar irritación local de la mucosa o incluso una reacción alérgica (Aalto-Korte et al., 2007; Leggat & Kedjarune, 2003). Asimismo, existen reportes en la literatura acerca de la toxicidad del MMA en distintos tipos celulares tales como fibroblastos, monocitos, células endoteliales, entre otros (Dahl et al., 1994; Lai et al., 2004). Frente a ello, se sugiere el empleo de técnicas para reducir la exposición de los pacientes y profesionales al MMA durante los procedimientos dentales, con la finalidad de reducir los riesgos de posibles complicaciones (Leggat & Kedjarune, 2003). Recientemente, se ha reportado como recomendación optimizar la ventilación de

la sala odontológica por parte del personal dental para evitar el contacto directo con MMA (Bandarra et al., 2019).

En este estudio se propone un diseño experimental para evaluar la citotoxicidad del MMA tanto *in vitro* como *in vivo*, en células musculares de ratón, a fin de obtener evidencia empírica que entregue nuevos hallazgos sobre los riesgos para la salud que pueda significar el uso clínico sobre este tejido, cuya función es esencial para el desempeño de la profesión, que requiere de destrezas motoras avanzadas.

3) Marco teórico:

3.1 Metil Metacrilato: usos y aplicaciones en Odontología

Normalmente, los materiales sintéticos empleados en la elaboración de prótesis dentales, están compuestos no por un único elemento, sino por multiplicidad de componentes diversos entre sí. Dentro de los materiales acrílicos el más usado es el MMA, el cual se aplica comúnmente a la odontología protésica, como las prótesis removibles, las restauraciones provisionales de coronas y puentes, dientes artificiales, la fabricación de cubetas de impresión protésicas, aparatos ortopédicos maxilares, entre otros usos (Al-Saadi MA et al., 2019; Chen MS et al., 1998; Gratton & Aquilino, 2004; Morais et al., 2007).

A pesar de la reducción de la incidencia del edentulismo a nivel global, se ha mantenido el uso prótesis dentales removibles, las cuales satisfacen las necesidades sociales y fisiológicas mínimas de los pacientes. El material convencional más utilizado para la fabricación de estas prótesis son las resinas de MMA (Anadioti et al., 2020; Felton, 2016). Éstas poseen propiedades generales satisfactorias, pues incluyen alta resistencia a la flexión, ajuste marginal aceptable, potencial para mejorar y mantener el pulido, apariencia natural, durabilidad, y baja absorción en fluidos orales, ausencia de sabor y olor (Gratton & Aquilino, 2004; Morais et al., 2007; Young et al., 2001). Sin embargo, la

contracción de la polimerización, la reacción de polimerización exotérmica y la irritación asociada al monómero son algunas de las desventajas del material (Young et al., 2001). A pesar de estas desventajas, el alto uso de las resinas de MMA se debe a su fácil manipulación y reparación, su bajo costo, buena estabilidad del color y estética aceptable (Gad et al., 2017; Tapia Silva et al., 2010; Young et al., 2001).

3.2 Metil Metacrilato: composición y características

El MMA es el monómero que se utiliza para la fabricación del Polimetil Metacrilato (PMMA) y fue inventado en 1877 (Rakhshan, 2015). La primera aplicación de esta resina en odontología fue en la fabricación de las bases de prótesis completas en 1937 (Heying, 2009; Rakhshan, 2015). Gracias a sus cualidades de biocompatibilidad, fiabilidad, relativa facilidad de manipulación y baja toxicidad, pronto fue incorporada por muchas especialidades médicas (Soykut et al., 2020). Desde su introducción hasta la actualidad los PMMA se convirtieron rápidamente en el material más utilizado de uso protésico (Azhar et al., 2013; Rakhshan, 2015).

La composición química del MMA corresponde a la fórmula $C_5H_8O_2$. A continuación, en la Tabla I se presentan las propiedades químicas del MMA (Centers for Disease Control and Prevention, 2007; Leggat & Kedjarune, 2003).

| Tabla I: Propiedades químicas del MMA (Leggat, 2003) | |
|--|---|
| Propiedad | Descripción |
| Nombre Químico | 2-Metil-2-ácido propenoico, metilo de éster. |
| IUPAC Nomenclatura | 2-metil, propenoato de metilo |
| Sinónimos | Monómero de metacrilato, éster metílico del ácido metacrílico, 2-metil-2-propenoato de metilo |
| Abreviación | MMA |
| Punto de Ebullición | 100-101°C |
| Punto de Fusión | -48°C |
| Punto de Inflamabilidad | 11°C |

La estructura y reacción de polimerización del MMA para obtener polimetilmetacrilato se muestran en la Figura 1 (Janda, 2009).

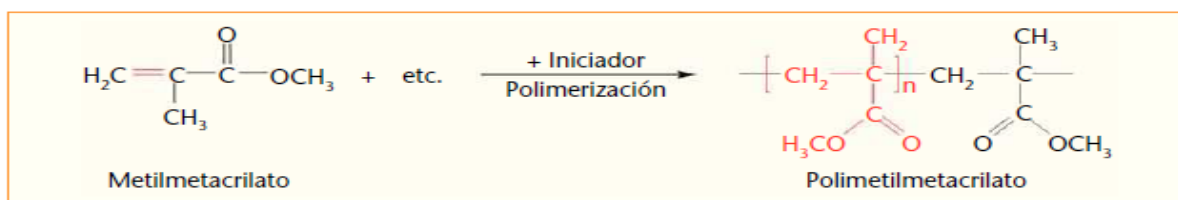


Figura 1. Polimerización del metilmetacrilato para obtener polimetilmetacrilato.

Existen tres mecanismos de activación de la polimerización del MMA: activación por calor, activación química y activación por luz (Alla et al., 2015; Janda, 2009). Para cada uno de estos mecanismos, se debe utilizar una presentación comercial específica. Para efectos de este trabajo, nos enfocamos en estudiar el mecanismo de activación química, al ser el método más utilizado por los estudiantes de Odontología de la Universidad de Chile. Al respecto, los materiales de resina que se polimerizan por activación química se denominan resinas de curado químico o auto-curado (Anusavice et al., 2003). En este tipo de resinas la reacción de polimerización es iniciada por un activador químico y se completa a temperatura ambiente (Alla et al., 2015). La polimerización de las

resinas de curado químico nunca es completa, resultando en una composición de un 3 a 5% de monómero residual, a diferencia del 0,2-0,5% de las resinas de curado por calor. El monómero residual puede ser liberado a la dentadura e irritar los tejidos orales, generando diversas reacciones adversas (Alla et al., 2015; Bahrani et al., 2012; de Andrade Lima Chaves et al., 2012).

La reacción de polimerización del PMMA es exotérmica e involucra dos reactivos: el polvo y el líquido. El polvo está compuesto de perlas de polimetilo de metacrilato (PMMA), puesto que se trata del constituyente principal, junto con colorantes y peróxido de dibenzoilo. Por una parte, las perlas de PMMA sirven como componentes estructurales en la resina polimerizada y los colorantes simulan la pigmentación de la base de prótesis o de resina temporal de corona. Por otra parte, el peróxido de dibenzoilo sirve como iniciador para la polimerización. La parte líquida contiene mayoritariamente MMA (monómero), además de glicol dimetacrilato e hidroquinona. El monómero de MMA es un líquido con las siguientes características: incoloro, volátil a temperatura ambiente, irritante, aromático e inflamable (Chen MS et al., 1998; Leggat et al., 2009). El MMA proporciona las bases para polimerización, mientras que la GDMA sirve como agente de unión. La hidroquinona es añadida como inhibidor para prevenir polimerización espontánea del líquido (Leggat & Kedjarune, 2003).

3.3 Citotoxicidad del Metil Metacrilato

Varios estudios han investigado la citotoxicidad de este compuesto, en diferentes líneas celulares (Leggat & Kedjarune, 2003). Dahl y colaboradores en 1994, reporta una citotoxicidad en monocitos, granulocitos y células endoteliales (Dahl et al., 1994). Es más, varios autores sugieren citotoxicidad de fibroblastos de distintos tejidos (Bandarra et al., 2019; Cimpan et al., 2000; Sreekumar & Pradeep, 2012). Lo interesante es que también se ha reportado citotoxicidad en células de la cavidad oral, como son las células epiteliales, células de la pulpa dental, y fibroblastos del ligamento periodontal (Cimpan et al., 2000; Gautam

et al., 2012; Lai et al., 2004).

En el año 2000, Cimpan y colaboradores reportó un aumento de la apoptosis y/o necrosis en la línea celular promonocítica del linfoma histiocítico humano U-937, sugiriendo que los compuestos emitidos a partir de las resinas usadas en prótesis a base de PMMA activan vías de señalización involucradas en la regulación de la muerte celular (Cimpan et al., 2000). En este mismo estudio, los autores reportaron que los niveles de apoptosis y necrosis reflejan el grado de citotoxicidad de la base de prótesis basada en PMMA. En otra investigación, demostraron que los fibroblastos expuestos a PMMA mueren principalmente por apoptosis y en menor proporción por necrosis (Cimpan et al., 2000). Contrariamente, en el año 2004, Lai y colaboradores expusieron que la mayoría de las células gingivales y del ligamento periodontal tratadas con MMA, murieron por necrosis, mientras que una pequeña parte de las células murió por apoptosis, donde señalan que podría deberse al uso de distintos cultivos celulares y componentes de las resinas utilizadas (Lai et al., 2004).

Se ha reportado que la generación de cantidades excesivas de especies reactivas de oxígeno (ROS) causa efectos biológicos adversos, no sólo al dañar directamente los componentes celulares, sino también al regular indirectamente las vías de señalización que inducen a la muerte celular (Yamada et al., 2009). Algunos trabajos han demostrado que los monómeros de MMA reducen los niveles del glutatión (GSH), el principal antioxidante endógeno, encargado de proteger las estructuras celulares del daño causado por ROS, contribuyendo así a la toxicidad, debido a que el aumento de los niveles de ROS puede activar las vías de señalización que conducen a la apoptosis (Araújo et al., 2013; Aydin et al., 2002). En cambio, en el estudio de Soykut y colaboradores del 2017, uno de los hallazgos más llamativos fue un aumento de los niveles de GSH de los técnicos dentales de unas tres veces en comparación con los controles. Según los resultados de este estudio, el organismo puede desarrollar una respuesta

adaptativa para contrarrestar esta condición de estrés oxidativo (Soykut et al., 2017).

En base a lo anterior, Bandarra y colaboradores en 2019, señaló que el MMA ha mostrado toxicidad en cultivos de neuronas humanas en un mecanismo aparentemente mediado por la formación de radicales libres (Bandarra et al., 2019). En el estudio de Chen y colaboradores (1998) se indicó que el superóxido y/u otros radicales libres fueron, al menos parcialmente, responsables del daño neuronal inducido por el MMA en las neuronas corticales primarias (Chen MS et al., 1998). Tempranamente, se ha reportado una disminución de la actividad locomotora y efectos sobre el aprendizaje y comportamiento en ratas expuestas por vía oral a este compuesto, donde el efecto del MMA sobre las aminos biogénicas tiene correlación con los cambios conductuales (Husain et al., 1985).

Cabe señalar que la estructura química que comparten tanto el PMMA y el MMA puede reaccionar con nucleófilos como el GSH, el ADN y las proteínas, siendo similares los mecanismos de toxicidad de los distintos derivados del metacrilato (Soykut et al., 2020). Las diferentes pruebas experimentales que miden la citotoxicidad varían considerablemente, sin embargo, indican cambios inducidos por el MMA en las estructuras celulares básicas, como la integridad de la membrana celular y en las funciones celulares, como actividades enzimáticas o síntesis de macromoléculas (Gautam et al., 2012; Sreekumar & Pradeep, 2012). Por lo demás, algunos estudios evidencian que la exposición aguda a los vapores de MMA puede desencadenar daño cromosómico (Araújo et al., 2013).

Por último, si bien existen reportes del efecto citotóxico del MMA, es importante evaluar la potencial inducción de muerte en diferentes líneas celulares excitables, considerando que diferentes tipos de células pueden exhibir un amplio espectro de respuestas al mismo estímulo tóxico en función de la susceptibilidad, la cinética del efecto tóxico o el modo de muerte celular (Cimpan et al., 2000).

3.4 Células musculares esqueléticas

Las células musculares pueden excitarse por medios químicos, eléctricos y mecánicos para producir un potencial de acción que se transmite a lo largo de sus membranas celulares. En este sentido, la propiedad fisiológica fundamental de las células musculares es que responden a estímulos mediante la activación de un mecanismo contráctil (Barret, 2016).

El músculo esquelético representa aproximadamente 40% del peso corporal y es fundamental para la locomoción, movimiento, apoyo y la salud metabólica (Brook et al., 2016; Chal & Pourquié, 2017). Los músculos esqueléticos pueden ser controlados voluntariamente por el organismo (Chal & Pourquié, 2017). Desde un punto de vista mecánico, la función principal del músculo esquelético es convertir energía química en energía mecánica para generar fuerza, poder mantener la postura y producir un movimiento que influye en la actividad, permitiendo la participación en actividades sociales y entornos ocupacionales, manteniendo o mejorando la salud, y contribuyendo a la independencia funcional (Frontera & Ochala, 2015). La fuerza generada por un músculo depende de muchos factores que incluyen el grado de activación por parte del sistema nervioso, su arquitectura, el tamaño del músculo, entre otros (Frontera & Ochala, 2015).

Con respecto a la citotoxicidad del MMA en células musculares esqueléticas, el único estudio reportado hasta la fecha corresponde al artículo de Martin y colaboradores en 1981, el que indagó los efectos sobre el músculo esquelético de anfibios a partir de la inhalación del vapor de MMA. En efecto, se indica en este estudio que una inhalación de vapor de MMA a una concentración de 2000 ppm puede alcanzar una concentración en la sangre que es suficiente

para alterar el rendimiento de los músculos esqueléticos de los anfibios (Martin et al., 1981).

Por otro lado, existen reportes del MMA en los otros tipos de músculo, por ejemplo, sobre el músculo liso vascular, donde se han observado sus efectos hipotensores a través de diferentes mecanismos, como la liberación de óxido nítrico y prostanoide(s)/prostaciclina, y la activación de los canales K_{ATP} (Abebe et al., 2016; Karlsson et al., 1995; Maddux et al., 2002). Mientras que en el músculo cardíaco, se sugiere que el MMA ejerce una inhibición directa de la captación de Ca^{+2} del retículo sarcoplásmico del cardiomiocito, de forma dosis dependiente, generando como consecuencia una menor fuerza contráctil (Kim et al., 2003).

A pesar de que el MMA no está en contacto directo con las células musculares, como otros tejidos de la cavidad oral, es importante estudiar y analizar el efecto sobre estas células excitables, así como en modelos animales, dado que el músculo esquelético es fundamental para la destreza motora requerida por los odontólogos. Además, el tejido forma parte del sistema masticatorio, cuya función es vital para la salud y bien estar del paciente.

3.5 Efectos sistémicos y manejo del compuesto

Los efectos adversos de cualquier material que entre en contacto con el cuerpo humano pueden ser tanto locales como sistémicos (Restrepo Ospina & Ardila Medina, 2010). En relación al segundo, los efectos sistémicos de los materiales dentales dependen de la distribución de sustancias liberadas por los mismos. Estas últimas pueden entrar al organismo mediante la ingestión y absorción en el intestino, la inhalación de vapores, la difusión a través del ápice del diente o la absorción a través de la mucosa oral. En cuanto a la respuesta biológica sistémica, ésta depende de tres factores: el grado de disolución en el cuerpo (duración y concentración de la exposición), la vía de exposición (venosa,

respiratoria, dérmica, oral) y la tasa de excreción de la sustancia (Anusavice et al., 2003; Restrepo Ospina & Ardila Medina, 2010).

En Medicina y Odontología, la principal vía de exposición profesional es la respiratoria, ocurrida a través de la inhalación del compuesto (Aydin et al., 2002; Parizi et al., 2005). De acuerdo a la literatura, el MMA se metaboliza rápidamente en ratas *in vivo* por hidrólisis a ácido metacrílico (MAA), mediada por la enzima carboxilesterasa y, en última instancia, a dióxido de carbono (Bratt & Hathway, 1977; Mainwaring et al., 2001), siendo el ácido metacrílico un agente irritante y químicamente corrosivo para los tejidos (Mainwaring et al., 2001; Parizi et al., 2005). En distintos estudios se postulan dos posibles vías del metabolismo del MAA: la primera, que puede ser similar a la ruta de la metabolización de la valina, donde puede ser metabolizado a L-malato y en pasos posteriores a CO₂, y la segunda, por la vía de los epóxidos, donde el MAA puede metabolizarse en piruvato y posteriormente a CO₂ (Bratt & Hathway, 1977; Durner et al., 2010; Seiss et al., 2009). Se ha señalado que este metabolismo localizado en el tejido nasal conduce a la acumulación de MAA en el mismo, lo que podría inducir la degeneración del tejido si alcanza una concentración suficientemente alta (Pemberton et al., 2013). Por su parte, las carboxilesterasas, miembros de la clase de proteínas esterases, están ampliamente distribuidas por todo el cuerpo y se localizan en el lumen del retículo endoplásmico, catalizando la escisión de ésteres carboxílicos en el correspondiente alcohol y ácido carboxílico (Redinbo & Potter, 2005; Wang et al., 2017). Las carboxilesterasas se expresan principalmente en los tejidos que mantienen una función de barrera y que probablemente estén expuestos a xenobióticos¹; esto incluye los epitelios del pulmón y del intestino, el hígado, el riñón, la piel, la sangre y el tracto gastrointestinal (Hatfield et al., 2016; Pemberton et al., 2013). En la Figura 2 se presenta un esquema de la ruta metabólica propuesta a partir de la literatura existente.

¹ Xenobiótico: término genérico que se asigna a sustancias químicas a las que está expuesto un organismo y que son extrínsecas al metabolismo normal de ese organismo (Croom, 2012).

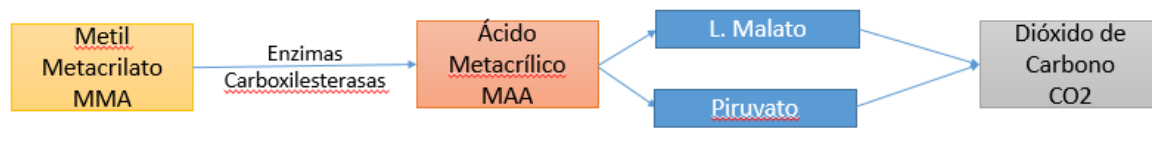


Figura 2. Ruta metabólica del Metil Metacrilato.

Debido a su rápido metabolismo, la medición del MMA y sus metabolitos es difícil de detectar en la sangre y en la orina (Soykut et al., 2020). El MMA que se ha detectado en el suero, ha sido de pacientes sometidos a reemplazos articulares totales (Homlar et al., 2013). Sólo un estudio en animales detectó con éxito el MMA en el suero tras una exposición por inhalación, al exponer grupos de cuatro ratas macho a aire que contenía 100 ppm de MMA. La concentración de MMA fue determinada por cromatografía de gases y resultó ser de $11,14 \pm 1,05$ mg % en la sangre (Homlar et al., 2013). El estudio de Crout y colaboradores (1979) midieron los niveles plasmáticos del MMA a partir de pacientes que fueron sometidos a una artroplastia de caderas utilizando cemento de PMMA. En esta investigación, se llegó a la conclusión que los niveles plasmáticos de MMA eran seguidos de cerca por el perfil de niveles plasmáticos de MAA, detectándose ambos en cantidades significativas en la sangre circulante de cuatro pacientes y MMA en la sangre de los otros cuatro pacientes. La mayoría de las medidas de concentraciones de los dos compuestos se encontraban en el rango de 0-1,5 pg/cc, aunque el nivel más alto medido de MMA fue de 15,1 pg/cc y del MAA fue de 6,1 pg/cc (G. Crout et al., 1979). Por otra parte, se sugiere que el monómero residual para entrar al sistema circulatorio debe atravesar la mucosa oral y los tejidos subyacentes, estas barreras disminuyen significativamente el volumen de monómero que llega al torrente sanguíneo, donde se estima que la vida media del MMA en la sangre circulante es de 20 a 40 minutos (Anusavice et al., 2003). Con respecto a las vías de excreción del MMA, se demostró que hasta el 65% se expira como CO₂ en 2 horas, así como también se menciona que los metabolitos intermedios pueden excretarse en la orina (Bratt & Hathway, 1977).

Los cirujanos y el personal de odontología están ocupacionalmente expuestos casi a diario a este compuesto, la mayoría de ellos no son conscientes que el vapor del monómero es conocido por sus efectos nocivos en la salud, especialmente, cuando se usa frecuentemente en áreas con escasa ventilación (Al-Saadi MA et al., 2019; Aydin et al., 2002). Dentro de los efectos mencionados, podemos identificar la irritación de la piel, los ojos y las membranas mucosas del tracto respiratorio, dermatitis, estomatitis y neuropatía (Al-Saadi MA et al., 2019; Aydin et al., 2002; Donaghy et al., 1991; Sadoh et al., 1999). Al respecto, otros estudios han evaluado los daños en las vías respiratorias, específicamente, en la cavidad nasal, e informan de inflamación, atrofia glandular, hiperplasia focal de las células basales y metaplasia escamosa del epitelio de la cavidad nasal (Mainwaring et al., 2001; Parizi et al., 2005).

Por lo demás, se ha reportado que el personal dental, como los dentistas, los asistentes dentales, los rehabilitadores orales, tienen un alto riesgo de sensibilización alérgica al MMA y otros acrílicos, sobre todo, en el personal técnico dental (Aalto-Korte et al., 2007; Al-Saadi MA et al., 2019; Sasseville, 2012). En la revisión de Sasseville (2012), plantean varios informes y series de casos que han documentado dermatitis de contacto alérgica ocupacional por MMA y otros compuestos, la que afecta principalmente a la pulpa de los dedos, y es caracterizada por descamación y fisuras dolorosas que puede llegar a ser incapacitante. En este mismo estudio se ha reportado también estomatitis alérgica de contacto y dermatitis perioral en pacientes debido al uso de este compuesto en reparaciones de prótesis dentales (Sasseville, 2012).

Dado que el MMA se considera generalmente de baja toxicidad, las normas de exposición profesional para los niveles de vapor aceptables en el lugar de trabajo se han establecido históricamente con respecto a la tolerancia de los trabajadores a la irritación aguda de las vías respiratorias superiores (Pemberton et al., 2013). Existen diversas normas internacionales que establecen límites de

exposición laboral para el MMA, por ejemplo, el Código de Seguridad y Salud Laboral de Brasil estableció la media de 8 horas permitidas a la exposición de MMA a 100 ppm (Araújo et al., 2013). En Suecia, el valor para el MMA es de 200 mg/m³ basado en los efectos irritantes (Hagberg et al., 2005). Los límites de exposición recomendados por el National Institute for Occupational Safety (NIOSH) indica una concentración de 100 ppm de MMA, considerando una media ponderada en el tiempo para una jornada laboral de hasta 10 horas durante una semana laboral de 40 horas (Centers for Disease Control and Prevention, 2007).

Los efectos señalados hasta ahora han demostrado ser lo suficientemente nocivos para dentistas y otros miembros del personal dental, como para asegurarse de tomar medidas que tiendan a evitar el contacto directo con el monómero, como es la inhalación del vapor de MMA o manipulación sin protección (Aalto-Korte et al., 2007; Leggat & Kedjarune, 2003). Es importante mencionar que los estudiantes de odontología están expuestos a MMA de forma aguda en determinados períodos durante la formación de pregrado. Dado que la concentración de su vapor no puede ser estimada con exactitud, los estudiantes y también la comunidad odontológica son usuarios secundarios con una gran probabilidad de desarrollo de algún tipo de hipersensibilidad (Al-Saadi MA et al., 2019). Por estas razones, se sugiere que una buena ventilación en el lugar de trabajo puede reducir el nivel de exposición ocupacional para el personal de odontología (Aalto-Korte et al., 2007). En consecuencia, se han establecido múltiples medidas para disminuir el contacto con MMA, entre ellas, se destacan guantes, mascarillas y ventilación adecuada, no obstante, esto todavía no es suficiente para limitar la exposición al MMA y detener su inhalación (Al-Saadi MA et al., 2019; Leggat et al., 2009). En la literatura, además se destaca que el monómero de MMA es capaz de permear los guantes en tres minutos, sugiriendo una correcta selección de guantes en cuanto a material y grosor, además de un recambio frecuente al momento del contacto con el monómero (Lönnroth et al., 2003). De igual forma, se hace indispensable poder establecer medidas mínimas necesarias para reducir la exposición a este compuesto. En la Tabla II se

muestran algunas de las posibles medidas a considerar (Leggat & Kedjarune, 2003).

| Tabla II: Posibles medidas para reducir la exposición al monómero de MMA en el lugar de trabajo dental (Cooley modificado por Leggat) |
|--|
| Aumentar la conciencia entre el personal dental sobre los riesgos asociados al uso del MMA |
| Asegurar una buena ventilación en la clínica dental |
| Uso apropiado de protección ocular |
| Uso apropiado de guantes |
| Eliminación rápida de cualquier derrame del monómero |
| Limpiar el monómero del exterior del contenedor |
| Higiene general de la clínica dental o del laboratorio |
| No exponer el monómero al fuego |
| Limpeza o lavado inmediato de las áreas afectadas como la piel |

Existen otros factores que influyen en la citotoxicidad de los materiales de base acrílica, entre ellos, la relación polímero: monómero, el tiempo de almacenamiento del material e inmersión en agua. Cuanto menor sea la relación polímero: monómero, mayor será la cantidad de monómero residual y, por lo tanto, más potencial citotóxico (Alla et al., 2015). A su vez, el tiempo de almacenamiento es otra característica que juega un papel importante, donde el efecto citotóxico de las resinas acrílicas era mayor en las primeras 24 horas posterior a la polimerización y disminuía con el tiempo (Janaina Habib et al., 2003). Con respecto a la inmersión en agua, los autores concluyeron que cuanto más tiempo se empapa en agua una prótesis, menos efecto citotóxico tiene la prótesis. Al respecto, se sugiere que la disminución de la cantidad de monómero residual después de este procedimiento puede deberse a una polimerización complementaria (Janaina Habib et al., 2003; Lefebvre et al., 1994).

Por su amplio uso y manipulación en el área odontológica y en vista de las complicaciones y controversias anteriores en relación al MMA, se hace imprescindible investigar a fondo la biocompatibilidad de este material con la finalidad de establecer un adecuado y seguro manejo de este compuesto (Gautam et al., 2012; Sreekumar & Pradeep, 2012).

A la luz de estos antecedentes, resulta pertinente analizar el efecto de este compuesto sobre el tejido muscular, puesto que es un territorio escasamente investigado, cuya función es esencial para las habilidades motoras requeridas por los profesionales de la odontología, y que además es parte del sistema masticatorio.

4) Hipótesis y Objetivos:

4.1 Hipótesis.

Metil Metacrilato, en sus dos formas de presentación, monómero y polímero, produce toxicidad en cultivos de células del músculo esquelético de ratón y disminuye la función muscular en roedores expuestos a la inhalación del compuesto líquido.

4.2 Objetivo General.

Evaluar si el Metil Metacrilato en sus dos formas de presentación, monómero y polímero, ejerce efecto citotóxico sobre los cultivos primarios celulares de músculo esquelético de ratón, y evaluar el efecto sobre la fuerza y resistencia muscular en roedores expuestos a la inhalación aguda y crónica de este compuesto.

4.3 Objetivos Específicos.

1. Evaluar *in vitro* la viabilidad celular de cultivos primarios de músculo esquelético ante la exposición de diferentes concentraciones de MMA en sus dos formas de presentación.
2. Determinar los efectos *in vivo* de la inhalación del Metil Metacrilato aguda o crónica en la fuerza y resistencia muscular de roedores.

5) Materiales y Métodos:

5.1 Reactivos.

Los reactivos que se utilizarán durante el desarrollo de este trabajo fueron proporcionados por el Laboratorio de la Dra. Paola Llanos (Laboratorio de Metabolismo Muscular; con financiamiento aportado por el Proyecto FONDECYT 1190406, ANID-CHILE). Todos los reactivos aplicados en este estudio son de grado analítico. El Metil Metacrilato fue adquirido en la tienda dental Clandent, utilizándose la marca Marche®, Felix Martin y Cia Ltda., cuya elección se justifica al ser la marca comercial más ampliamente utilizada en las prácticas de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

5.2 Consideraciones Bioéticas y de Bioseguridad.

Los animales fueron utilizados de acuerdo al protocolo de uso y cuidado de animales CBA 1197 FMUCH aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile. La investigación cumplió con los requerimientos básicos de bioseguridad para ser desarrollado, y se adecúa a las exigencias establecidas por los manuales: CONICYT Bioseguridad, primera edición, 1994, Manual de Normas de Bioseguridad, segunda edición, 2008, Centro de Control y Prevención de Enfermedades, CDC, y el Manual de Bioseguridad en Laboratorios, Organización Mundial de la Salud OMS, Ginebra 2005.

5.3 Tipo de estudio, Población y selección de la muestra.

Estudio experimental *in vitro* e *in vivo*. La población que participó en este estudio corresponden a células musculares esqueléticas aisladas desde modelos experimentales de roedores. La muestra del estudio fueron cultivos celulares primarios de fibras musculares de ratón. Los ratones machos Balb/C de ocho semanas se obtuvieron del Animal Facility de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

5.4 Cultivo de fibra muscular a partir del músculo FDB.

Fibras musculares adultas aisladas desde el *Flexor digitor brevis* (FDB), las cuales fueron obtenidas por digestión enzimática del músculo completo de ratón, tal y como ha sido reportado por Llanos y colaboradores, 2015 (Llanos et al., 2015). Brevemente, el músculo completo fue disectado e incubado con 450-500 unidades/ml de colagenasa tipo 2 (Worthington Biochemical, Lakewood, NJ, USA) por 90 min a 37°C. Posteriormente, el músculo fue disociado mecánicamente con pipetas Pasteur de diferentes diámetros hasta obtener fibras únicas. Las fibras aisladas fueron sembradas en cubreobjetos pre-tratados con gel ECM (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) en medio de cultivo (*Dulbecco's modified Eagle's medium* – DMEM, 10% suero de caballo y 1% penicilina/estreptomicina, Gibco, Grand Island, NY, USA) hasta el día siguiente que se realizan las pruebas.

5.5 Ratones.

En el estudio se utilizaron dieciséis ratones macho de la cepa Balb/C de ocho semanas, quienes contaban con un peso que oscilaba entre 25 y 35 gramos. Este tamaño muestral de n=8 para el análisis de la viabilidad se basa en estudios reportados previamente por Kinoshita 2019; n=8 (Kinoshita et al., 2019), para análisis de inhalación del compuesto MMA como fue reportado por Araujo 2013 donde se determinó el número necesario para evaluar diferencia entre la condición control y expuestos a MMA. Se mantuvieron en un ciclo de luz y oscuridad de 12:12 con acceso ilimitado a la comida estándar para roedores y agua en un ambiente a una temperatura de 21°C ± 2°C. Los ratones utilizados en este estudio provienen del Bioterio del Campus Norte de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, bajo el Proyecto FONDECYT 1190406, ANID-CHILE.

5.6 Medición de viabilidad celular.

Los cultivos celulares primarios de fibras musculares esqueléticas aisladas desde el músculo FDB de ratón fueron expuestos durante dos horas, a diferentes concentraciones del compuesto Metil Metacrilato, en sus dos presentaciones líquido y sólido, tal y como se detalla a continuación:

- **MMA presentación líquido:** Los cultivos celulares musculares fueron expuestos a diferentes concentraciones del monómero de autopolimerización líquido de MMA (1; 2,5; 5 y 10% v/v) en el medio de cultivo, (Marche®, Felix Martin y Cia Ltda) por un periodo de incubación de 2 h.
- **MMA presentación sólido:** Los cultivos celulares musculares fueron expuestos a diferentes concentraciones del acrílico rosado de autopolimerización veteadado sólido de MMA (9,4; 18,8; 32,5 y 75 mg/ml) en el medio de cultivo, (Marche®, Felix Martin y Cia Ltda) por un periodo de incubación de 2 h.

La viabilidad celular fue evaluada por método del bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiasolil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Bandarra et al., 2019). El ensayo colorimétrico MTT es un método sensible, cuantitativo y seguro que mide el metabolismo celular. Este se basa en la reducción de la sal de MTT de color amarillo, realizada por enzimas oxidorreductasas, mitocondriales y citosólicas capaces de metabolizar el MTT a su forma insoluble de color azul o cristales de formazán, permitiendo de esta forma determinar la viabilidad de las células tratadas. Dado que la cantidad de formazán producida es presumiblemente directamente proporcional al número de células vivas (Bahuguna et al., 2017; Riss et al., 2013), se sembraron las células musculares en una placa de 96 pocillos de una densidad de 1×10^2 células/pocillo, durante 12 horas a 37°C en una incubadora al 5% CO₂. Brevemente, las células se trataron con distintas concentraciones del compuesto MMA durante dos horas a 37°C en una incubadora al 5% CO₂. Posteriormente, el sustrato del MTT se preparó en una

solución fisiológicamente equilibrada, añadiéndose a las células en cultivo, normalmente, a una concentración final de 0,2 - 0,5 mg/ml e, incubándose durante dos horas. Una vez transcurrido ese período de tiempo, se aspiró el MTT cuidadosamente de las placas con células, donde la cantidad de formazán fue directamente proporcional al número de células viables. Se midió registrando los cambios en la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm mediante un espectrofotómetro de lectura de placa. El MTT fue expresado como porcentaje de viabilidad celular con respecto al control. Por último, se utilizó Metanol (MeOH) como control positivo de muerte (Kruse, 2012; McMartin et al., 2016).

5.7 Medición de la resistencia y fuerza muscular.

Se expuso a los ratones a la inhalación del compuesto MMA de forma aguda y crónica, según se detalla a continuación:

- **Exposición aguda:** Los ratones fueron expuestos a la inhalación de Metil Metacrilato durante 3 horas por 4 días consecutivos.
- **Exposición crónica:** Los ratones fueron expuestos a la inhalación de Metil Metacrilato durante 3 horas por 4 días consecutivos a la semana, durante un periodo de 4 semanas.

Para ello, se utilizaron características similares al estudio de Araújo (2013), donde en la jaula se sujetó un vaso precipitado con 20 ml de MMA líquido con una tapa perforada, cada perforación de 1 cm de diámetro, que permitió el paso del vapor del MMA. Para los ratones controles se utilizó el vapor de agua como control, se consideraron ambientes separados para las jaulas de los ratones controles y de los expuestos para evitar así la filtración del vapor del MMA que pudiese contaminar a los ratones controles. Los operadores se protegieron a la inhalación del MMA con el uso adecuado de mascarilla, sala ventilada y uso de guantes. El MTT fue descartado en una botella hasta su posterior entrega en bioseguridad.

Para evaluar la fuerza muscular y la resistencia de los ratones se realizaron dos test: de agarre de pantalla invertida y de nado forzado con peso respectivamente. En las Figuras 3 y 4 se presentan las líneas temporales de los experimentos realizados. La prueba de la fuerza de agarre, corresponde a una prueba no invasiva *in vivo* que puede evaluar el rendimiento muscular y tiene un valor considerable como prueba fenotípica (Castro & Kuang, 2017). Este test interpreta los cambios en la fuerza de agarre como evidencia de neurotoxicidad muscular y pertenece al conjunto de pruebas estándar del *Functional Observational Battery* (FOB) para estudios de toxicidad, y está enfocada en medir la capacidad y coordinación neuromuscular (Moser, 2011).

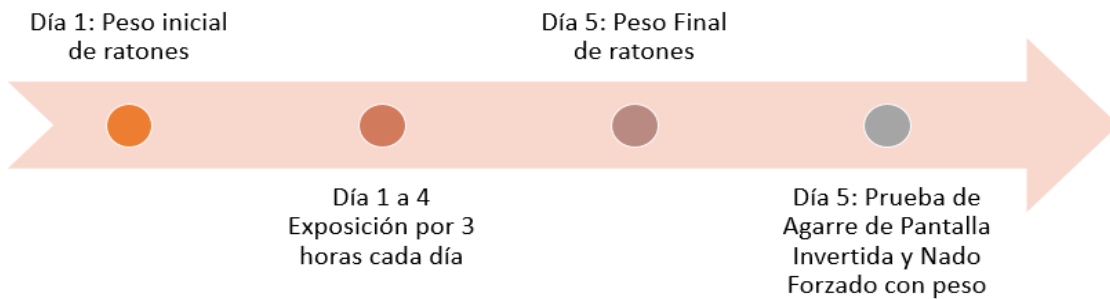


Figura 3. Línea de tiempo experimental exposición aguda.

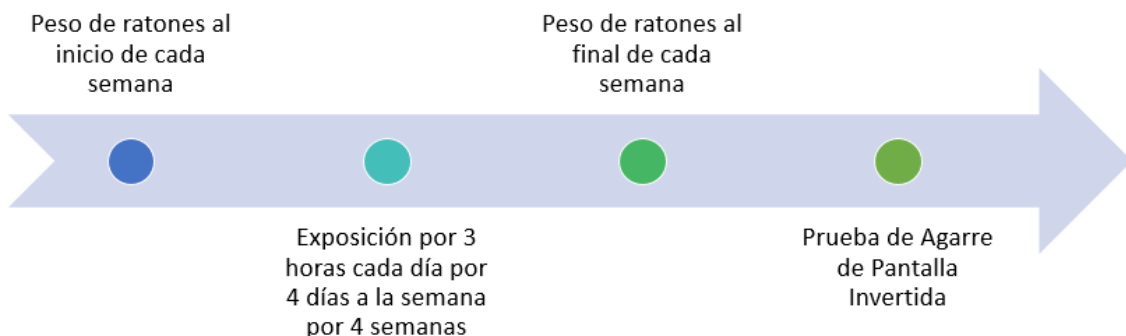


Figura 4. Línea de tiempo experimental exposición crónica.

Test Agarre de Pantalla Invertida. En primera instancia, los ratones control y expuesto fueron pesados al inicio de la semana. Una vez efectuado este primer paso, se procedió a poner al ratón de prueba sobre la parte superior de la red, permitiendo que el animal agarre la cuadrícula de alambre de $43 \times 43 \text{ cm}^2$ con las cuatro patas, o con la base de la cola. Manteniendo el torso del ratón paralelo a la rejilla, se giró suavemente la rejilla en 180° hasta que el ratón quedó por debajo de ella, agarrándose con sus extremidades. Cada ratón fue sometido a tres pruebas con un período de descanso entre ellas. Se registró el tiempo que persistió el ratón agarrado hasta que se liberó de la red. Al respecto, se recomienda utilizar la media de los mejores valores registrados para el análisis de datos. Para cerrar esta evaluación, se pesó nuevamente al ratón al final de la semana de pruebas, siendo devuelto a su jaula y, limpiándose la rejilla con etanol al 70%.

La prueba de natación forzada con peso es uno de los test utilizados para la evaluación individual de la capacidad física y resistencia en los roedores y es comúnmente aplicado tanto en experimentos bioquímicos como de comportamiento (Chen et al., 2005; Wu et al., 2014). En esta prueba, el tiempo de natación con un peso cargado se considera como una escala adecuada para medir el nivel de fatiga de forma objetiva y cuantitativa (Tanaka, 2003).

Test de natación forzada con peso. Brevemente, los ratones fueron puestos en una piscina llena de agua dulce a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, de aproximadamente 30 cm de profundidad para que los ratones no se sostuviesen tocando el fondo con sus patas traseras. A continuación, se incorporó un peso de un 5% del peso corporal del ratón amarrado en la raíz de su cola. Esto último, obligó al ratón a mantener un continuo y rápido movimiento de patas (Wei et al., 2017). Para efectos de este estudio, el período de natación fue considerado como el tiempo que pasa el ratón nadando en el agua hasta su agotamiento. En este sentido, se considerarán

agotados cuando no fueron capaces de subir a la superficie del agua para respirar en un plazo de 7s. Al final de la sesión, los ratones fueron removidos del agua, se secaron con toallas de papel, y se devolvieron nuevamente a sus jaulas.

5.8 Análisis de Resultados.

Los datos son presentados como promedio \pm error estándar de la media (SEM). Las diferencias significativas entre grupos múltiples fueron examinadas usando Kruskal-Wallis de distribución no paramétrica. Se utilizó el test Mann Whitney para comparación entre dos variables. Se fijó un intervalo de confianza del 95% aceptando diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$ el cual fue considerado para la significancia estadística. Para el análisis estadístico de la evidencia recopilada se usó el software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA).

6) Resultados:

6.1 Efectos de Metil Metacrilato sobre la viabilidad celular en cultivos primarios de células musculares esqueléticas de ratón.

Para establecer si la exposición de diferentes concentraciones de MMA en sus dos formas de presentación, líquido y sólido, afectaban la viabilidad celular de los cultivos primarios de músculo esquelético, se aplicó el método del MTT. Con respecto al efecto de Metil Metacrilato líquido (Figura 5), las células mostraron una reducción del MTT siendo significativa a 10% v/v alcanzando valores de $4 \pm 4,1\%$. Tras una exposición de dos horas al compuesto ($n=3$). Se usó metanol (MeOH) como control positivo de muerte, alcanzando valores de $24,3 \pm 7,8\%$ en la viabilidad.

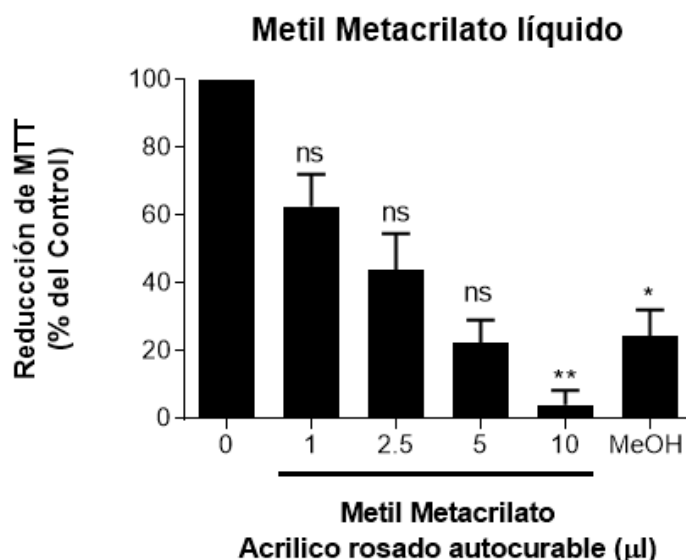


Figura 5. Efectos de Metil Metacrilato, en su presentación líquida sobre la viabilidad en células musculares de ratón. Los cultivos celulares fueron expuestos por 2 h al compuesto, tras la incubación, las células mostraron una reducción de la viabilidad a altas concentraciones del compuesto: $63 \pm 9,4\%$; $44 \pm 10,8\%$; $22 \pm 6,7\%$; $4 \pm 4,1\%$ a las concentraciones probadas ($n=3$). MeOH: metanol como control positivo de muerte a una concentración de 20%. Promedio \pm SEM; * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; ns: no significativo. (Test Kruskal- Wallis, Test Dunn para corrección de múltiples comparaciones).

De igual modo y bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas, se midió el efecto de Metil Metacrilato sólido. Como se muestra en la Figura 6, se encontró una reducción del MTT estadísticamente significativa a una concentración de 9,4 mg/ml alcanzando valores de $56 \pm 8,8$ % (n=5). Estos datos sugieren que a bajas concentraciones el compuesto en su forma sólida genera una reducción del MTT.

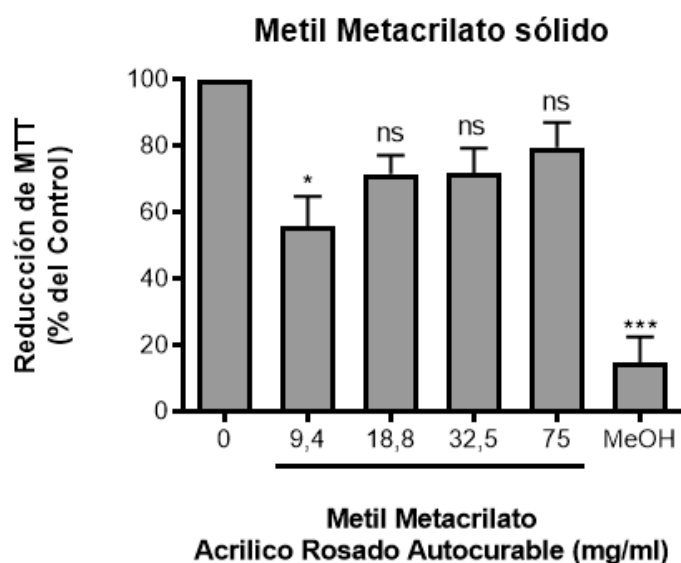


Figura 6. Efectos de Metil Metacrilato, en su presentación sólida sobre la viabilidad en células musculares de ratón. Los cultivos celulares fueron expuestos por 2 h al compuesto, tras la incubación se obtuvieron los siguientes resultados $56 \pm 8,8$ % ; $71 \pm 5,5$ % ; $71 \pm 7,5$ % ; $79 \pm 7,4$ % (n=5). Se utilizó metanol como control de muerte. Promedio \pm SEM; * p <0.05; *** p <0.0001; ns: no significativo. (Test Kruskal-Wallis, Test Dunn para corrección de múltiples comparaciones).

6.2 Efecto agudo de Metil Metacrilato líquido en el rendimiento físico en ratones.

Tempranamente, se ha sugerido que la inhalación del vapor de Metil Metacrilato genera efectos inhibitorios sobre la tensión muscular en músculo esquelético de anfibios (Martin et al., 1981). Para determinar si la inhalación aguda del MMA afecta la fuerza y resistencia muscular de ratones, realizamos los test de agarre y de nado forzado respectivamente. Con la finalidad de caracterizar si esta exposición afecta el peso corporal de los animales, se midió el peso inicial y final de los ratones, no hubo variación del peso en los animales expuestos (datos no mostrados), sugiriendo que este compuesto no altera el peso corporal. Por otro lado, la Figura 7 entrega datos sobre el tiempo de agarre del animal normalizado por su peso corporal. Al respecto, los animales expuestos a la inhalación aguda se sostuvieron $1,2 \pm 0,1$ segundos, mientras que los animales controles se sostuvieron $2,1 \pm 0,3$ segundos ($n=4$). Con respecto a la resistencia muscular, la cual fue evaluada por el efecto de la inhalación aguda sobre el tiempo de nado forzado del animal normalizado por su peso corporal de los ratones, ésta alcanzó valores de 7,9 segundos, disminuyendo a un 9,7% comparado con el animal control (Figura 8). Lamentablemente, los datos presentados corresponden a un experimento, puesto que los otros tres animales de experimentación murieron tras la medición del proceso, sugiriendo que el animal sometido a la inhalación del compuesto tiene menor resistencia física a esta prueba.

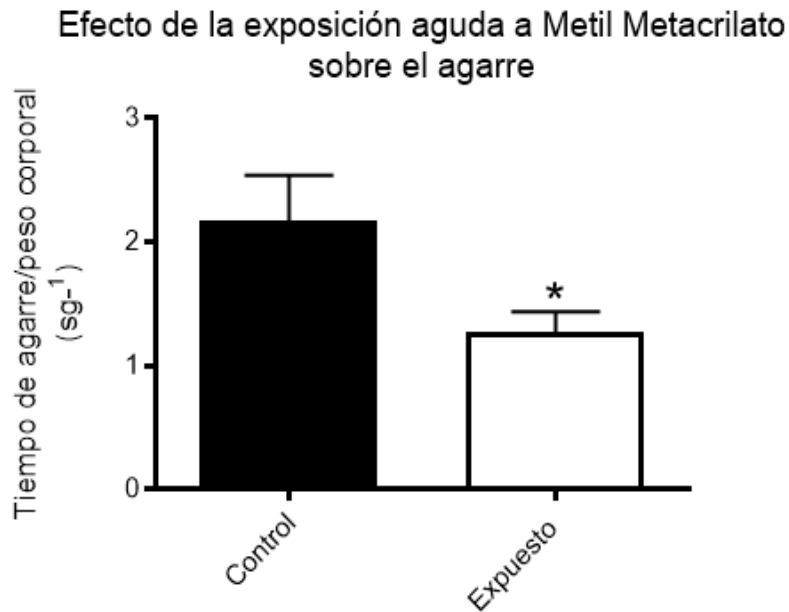


Figura 7. Efecto agudo del Metil Metacrilato en la fuerza muscular. Los ratones fueron expuestos durante 3 horas por 4 días a la inhalación de Metil Metacrilato. El gráfico muestra el tiempo de agarre del animal normalizado por su peso corporal. (n=4, * p <0.05, Test Mann Whitney).

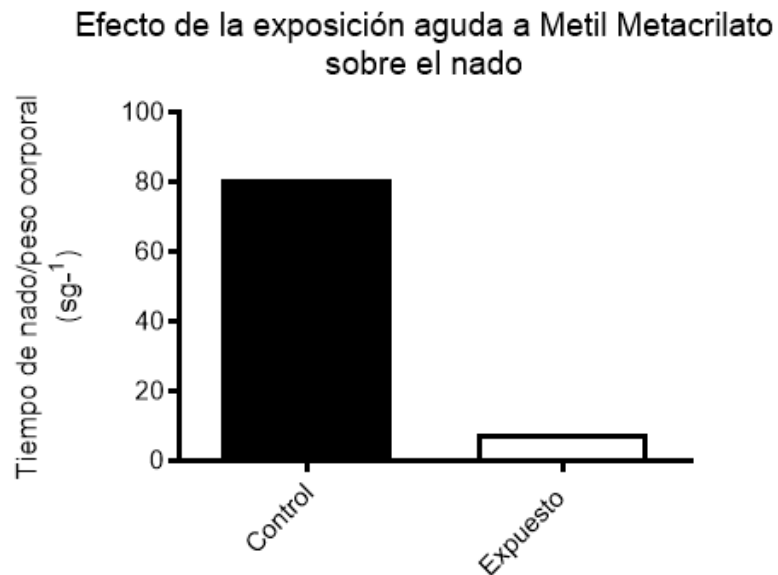


Figura 8. Efecto agudo del metil metacrilato en la resistencia muscular Exposición aguda de Metil Metacrilato en el nado de roedores. Los ratones fueron expuestos durante 3 horas por 4 días a la inhalación de Metil Metacrilato. El gráfico muestra el tiempo de nado del animal normalizado por su peso corporal.

6.3 Efecto crónico del Metil Metacrilato líquido en la fuerza muscular en roedores.

La pareja de animales que sobrevivió tras la prueba de nado forzado fue sometida a la inhalación crónica del MMA por 4 semanas. A ellos se les aplicó el test de agarre de pantalla invertida para medir los efectos sobre la fuerza muscular de la pareja de animal. En esta ocasión, se registró la variación del peso corporal de los animales durante cada semana, como se muestra en la Figura 9. En ella se observa como el animal expuesto mantiene un alza de peso al pasar las semanas en comparación con el control. La cuantificación del tiempo de agarre del roedor fue normalizada por el peso corporal (n=1, Figura 10). De interés, la fuerza muscular del animal expuesto disminuye en comparación al control, alcanzando los valores 1,01 y 3,2 segundos respectivamente, a la cuarta semana de exposición.

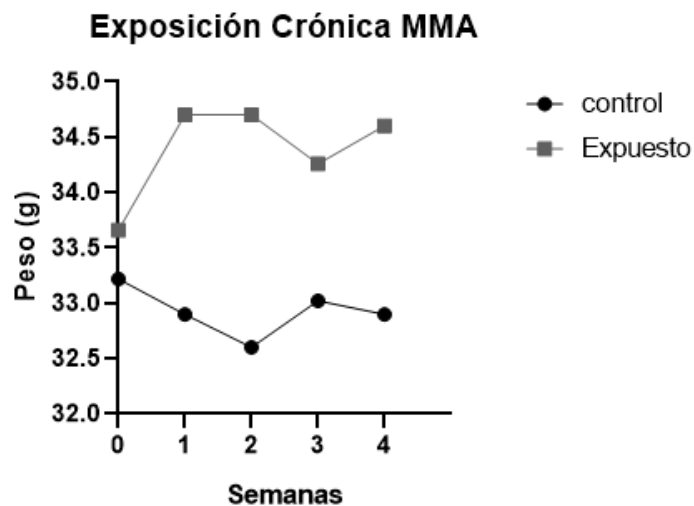


Figura 9. Diferencia del peso corporal del ratón a la exposición crónica de Metil Metacrilato. El animal control disminuye en un 1% del peso original, mientras que el animal expuesto aumenta un 2% de su peso corporal inicial.

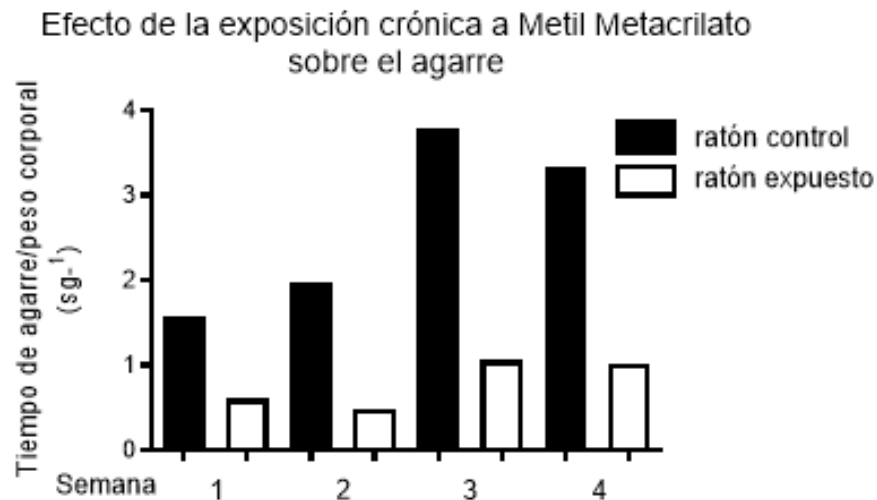


Figura 10. Exposición crónica de Metil Metacrilato en roedores. Los ratones fueron expuestos 4 días a la semana por 4 semanas durante 3 horas cada día. La cuantificación del tiempo de agarre del ratón fue normalizado por el peso corporal (n=1).

7) Discusión:

En esta investigación, se utilizó el ensayo de citotoxicidad MTT para estudiar los efectos sobre la viabilidad de células musculares a distintas concentraciones de MMA. Se encontraron diferencias significativas en la viabilidad celular, que se redujo a altas dosis del MMA en presentación líquida, y a bajas dosis en presentación sólida. Estos resultados van de acuerdo con la literatura existente, donde los reportes indican citotoxicidad del MMA utilizando otras presentaciones. Por una parte, Bandarra y colaboradores el año 2019, utilizaron el extracto de la resina polimerizada en base a MMA en un medio de cultivo durante 24 horas, donde los fibroblastos expuestos a este extracto mostraron una pérdida de viabilidad dependiente de la dosis en el ensayo de MTT (Bandarra et al., 2019). Por otro lado, en el estudio de Campaner y colaboradores en el año 2020, se

incubaron los fibroblastos gingivales de ratones macho Balb/C sobre los discos de resinas de autopolimerización de MMA a 24, 48, 72 horas. Esta exposición directa fue citotóxica en todos los periodos analizados (Campaner et al., 2020).

A pesar de que en nuestra investigación no se trabajó con la resina polimerizada, sino que, con los componentes de ésta, el polvo y el líquido, los datos obtenidos indican que el MMA en ambas presentaciones producen una reducción de la viabilidad de células musculares. En el estudio de Kedjarune y colaboradores 1999, expusieron a fibroblastos orales a concentraciones del orden de 1 mg/ml de MMA, ellos obtuvieron que la viabilidad celular fue reduciéndose a medida que la concentración aumentaba (Kedjarune et al., 1999). Por nuestra parte, encontramos que en la presentación sólida (polvo), a bajas concentraciones, 9,4 mg/ml, las células musculares expuestas mostraron los niveles más bajos de viabilidad celular. Esto podría deberse a que la presentación líquida está compuesta mayoritariamente por el monómero del MMA, mientras que la presentación sólida, se compone principalmente por cadenas cortas de polímero de MMA. Entonces a bajas concentraciones de la presentación sólida, probablemente, se tiene una mayor cantidad de monómero libre que a altas concentraciones, donde se habrán formado más cantidad de polímeros. En ese sentido, es importante mencionar que el inhibidor de la polimerización espontánea se encuentra en la parte líquida, por ende, es posible que exista polimerización espontánea en la parte sólida. En consecuencia, se sugiere que posiblemente el estado monomérico del MMA es el que genera mayor muerte celular tras la incubación. Pese a que este estudio no contempla dilucidar cuáles son los mecanismos involucrados en la reducción de la viabilidad, una de las razones puede ser que, como se señala en el estudio de Bereznowski 1994, el MMA producía una alteración de la membrana de las mitocondrias aisladas de hígado de rata, a su vez, se evidenció que el MMA produjo inhibición de la cadena respiratoria. Por lo tanto, se puede suponer que el efecto del MMA *in vitro* afecta la síntesis de ATP, lo que puede ser causante de la citotoxicidad inducida por el

MMA (Bereznowski, 1994). Por otra parte, Hattori y colaboradores 2008, utilizando células HepG2, indicó que el monómero de MMA a una concentración de 10 mM regula la expresión genética de enzimas de fase II, como las glutatión S-transferasas (GST), encargadas de catalizar la conjugación de GSH, el cual funciona como un importante agente reductor intracelular, manteniendo el entorno intracelular en un estado reducido, al mismo tiempo que actúa como barredor para las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Hattori et al., 2008). Por consiguiente, al disminuir la cantidad de GST, se acumula ROS generando daño celular. Se ha visto que el agotamiento de la cantidad de glutatión puede predisponer a las células a la apoptosis o desencadenar directamente la muerte celular (Franco & Cidlowski, 2009). El estudio de Yamada y colaboradores 2009, determinó que las células tipo odontoblastos expuestas al extracto de resina autopolimerizable, a base PMMA, mostraron una fuerte tendencia a la apoptosis asociada al aumento de ROS y a la disminución del GSH intracelular, y que N-acetil-cisteína (NAC) previno significativamente los efectos citotóxicos restaurando los niveles del glutatión de forma dosis dependiente (Yamada et al., 2009). Futuros experimentos podrán esclarecer si estos mecanismos están presentes en la célula muscular, al realizar experimentos en condiciones reductoras incubando las células con el MMA.

El entorno laboral está lleno de diferentes tipos de contaminantes, pero el efecto exacto de estos contaminantes depende de su concentración, el tiempo de exposición y las circunstancias de la exposición. El Metil Metacrilato representa el vapor tóxico más utilizado en el campo de la odontología (Al-Saadi MA et al., 2019). Ello significa que los estudiantes de odontología se encuentran expuestos igualmente a la inhalación de este compuesto durante el estudio del pregrado. Por ello, con el objeto de simular las condiciones de inhalación del MMA, se expuso ratones a la inhalación aguda y crónica de este compuesto, a fin de evaluar los efectos sobre dos características importantes de la función muscular: la fuerza y resistencia muscular. En la investigación *in vivo*, la exposición al MMA fue a

temperatura ambiente y se controló el tiempo de exposición del animal al compuesto, previo a realizar los test para medir la fuerza y la resistencia muscular, midiéndose además el peso corporal de los ratones. Es interesante observar que los animales expuestos agudamente a MMA, mantienen su peso corporal, en tanto que en el animal expuesto crónicamente se observa una tendencia al aumento de peso a la cuarta semana en comparación al control (ver Figura 9). Estos hallazgos, se diferencian de los reportados en la literatura general, donde el peso corporal de las ratas macho expuestas tanto a altas como a bajas concentraciones del MMA, durante largos periodos de tiempo (81 y 104 semanas), disminuye en comparación a las ratas controles (Lomax et al., 1997; National Toxicology Program (NTP), 1986). Esta diferencia podría deberse a diversos factores, tales como una adaptación inicial al efecto tóxico, las diferencias entre las especies utilizadas, los diferentes niveles de concentración del compuesto y el tiempo de exposición. Se recomienda entonces, realizar futuros experimentos en condiciones controladas, considerando la concentración del compuesto en partes por millón para poder contrastar nuestros datos con la evidencia.

Con respecto al efecto del MMA sobre la actividad muscular, el reporte de Martin y colaboradores de 1981, indicó una alteración en la tensión muscular de anfibios posterior a la inhalación del vapor de MMA a 2000 ppm durante 30 minutos. En concordancia, en nuestro estudio se observó una disminución, tanto de la fuerza muscular como de la resistencia, ante una exposición aguda del compuesto. En una primera aproximación pudimos observar una reducción de la fuerza muscular a las cuatro semanas de inhalación del compuesto, se necesitan más experimentos de exposición crónica a futuro para poder comprender mejor el efecto del MMA.

Los resultados obtenidos señalan que la función muscular está disminuida en los animales expuestos a la inhalación del compuesto. Estos efectos del MMA sobre la actividad muscular pueden deberse a una alteración del músculo

propiamente tal, daños sobre la placa neuromotora o daños neuronales. Como indican los resultados *in vitro*, existe reducción de la viabilidad de células del músculo esquelético ante la exposición del MMA. Interesante sería investigar los efectos en animales a la inhalación de este compuesto sobre el sistema nervioso. En la literatura se han encontrado reportes a nivel celular del daño neuronal inducido por el MMA, se ha señalado que los responsables parciales del daño sobre las neuronas corticales primarias fueron el anión superóxido y/u otros radicales libres, y que la neurotoxicidad del MMA fue atenuada por el pretratamiento con SOD/catalasa o vitamina C (Chen MS et al., 1998). En estudios en animales sobre la inhalación del MMA y sus efectos sobre el sistema antioxidante, Aydin y colaboradores, en el año 2002, encontró una disminución de GSH en ratas expuestas a la inhalación del MMA de una concentración de 1000 ppm, por seis horas al día durante cinco días a la semana en un periodo total de cuatro semanas, ello, en un ambiente de escasa ventilación (Aydin et al., 2002). Nuevamente se postula el estrés oxidativo promovido por el MMA como un posible mecanismo implicado en el efecto tóxico biológico.

Por otra parte, el estudio de Verkkala y colaboradores 1983, encontró respuestas musculares anormales ante la estimulación de los nervios motores de la cola de rata expuesta al MMA líquido luego de cuatro semanas. En este estudio se sugirió que era poco probable que esta respuesta muscular encontrada se deba a un efecto directo sobre la membrana de las células musculares, sino más bien que se debía a las ramas del nervio motor que estaban implicadas (Verkkala et al., 1983). Sin embargo, como se ha dado a conocer en esta investigación, las células musculares esqueléticas si son afectadas por el MMA. Nuestros resultados son aún incipientes para dilucidar los mecanismos por los cuales el vapor del MMA produce estos efectos *in vivo*, por lo que se necesitan aún más estudios en esta línea de investigación.

A pesar de que en esta investigación el tamaño muestral es pequeño, de todas formas, entrega indicios de que existe una tendencia a la disminución de la función muscular ante una exposición aguda y una disminución de la fuerza ante una exposición crónica. Sería conveniente entonces aumentar el número de animales en próximos estudios, que permitirían dar mayor robustez al trabajo experimental aquí realizado. A su vez, sería interesante investigar si se mantiene esta tendencia al prolongar el tiempo de exposición crónica más allá de las cuatro semanas estipuladas en esta investigación.

8) Conclusiones:

Metil Metacrilato, tanto en su presentación líquida como sólida, produce citotoxicidad en células musculares esqueléticas de ratón. La inhalación del vapor de MMA por ratones ante una exposición aguda disminuye su función muscular, afectando la fuerza muscular. Por esto y los demás efectos adversos reportados en la literatura, se sugiere que uso sea controlado y supervisado, con la finalidad de mantener el estado de salud de la comunidad Odontológica.

9) Referencias Bibliográficas:

- Aalto-Korte, K., Alanko, K., Kuuliala, O., & Jolanki, R. (2007). Methacrylate and acrylate allergy in dental personnel. *Contact Dermatitis*, 57(5), 324-330. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.2007.01237.x>
- Abebe, W., West, D., Rueggeberg, F. A., Pashley, D., & Mozaffari, M. S. (2016). Effects of acrylic resin monomers on porcine coronary artery reactivity. *Journal of biomaterials science. Polymer edition*, 27(10), 986–1002. <https://doi-org.uchile.idm.oclc.org/10.1080/09205063.2016.1175775>
- Alla, R., KN, Raghavendra, S., & Vyas, R. (2015). Conventional and Contemporary polymers for the fabrication of denture prosthesis: Part I – Overview, composition and properties. *International Journal of Applied Dental Sciences*, 1(4), 82-89.
- Al-Saadi, M., Al-Yasiry, A., Al-Jammali, Z., & Moez, A. (2019). Effect of acute methyl methacrylate vapor inhalation on smokers' and non-smokers' respiratory function in a sample of male dentistry students. *Dent Med Probl*. 2019;56(1):75–80s, 75-80. <https://doi.org/10.17219/dmp/100444>
- Anadioti, E., Musharbash, L., Blatz, M., Papavasiliou, G., & Kamposiora, P. (2020). 3D printed complete removable dental prostheses: A narrative review. *BMC Oral Health*, 20(1), 343. <https://doi.org/10.1186/s12903-020-01328-8>
- Anusavice, K., Shen, C., & Rawls, H. (2003). *Phillips' Science Of Dental Materials (11^o)*. Elsevier/Saunders.
- Araújo, A., Alves, G., Avanço, G., Parizi, J., & Nai, G. (2013). Assessment of methyl methacrylate genotoxicity by the micronucleus test. *Brazilian Oral Research*, 27(1), 31-36. <https://doi.org/10.1590/S1806-83242013000100006>
- Aydin, O., Attila, G., Dogan, A., Aydin, M., Canacankatan, N., & Kanik, A. (2002). The Effects of Methyl Methacrylate on Nasal Cavity, Lung, and Antioxidant System (An Experimental Inhalation Study). *Toxicologic Pathology*, 30(3), 350-356. <https://doi.org/10.1080/01926230252929927>
- Azhar, D., Syed, S., Luqman, M., & Ali, A. (2013). Evaluation of methyl methacrylate monomer cytotoxicity in dental lab technicians using buccal micronucleus cytome assay. *Dental Materials Journal*, 32(3), 519-521. <https://doi.org/10.4012/dmj.2012-322>
- Bahuguna, A., Khan, I., Bajpai, V., Kang, S. (2017). MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 12(2), 115-118.
- Bahrani, F., Vojdani, M., Safari, A., & Karampoor, G. (2012). Comparison of Hardness and Surface Roughness of Two Denture bases Polymerized by Different

Methods. *World Journal of Dentistry*, 3(2), 171-175. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10015-1151>

Bandarra, S., Mascarenhas, P., Luís, A., Catrau, M., Bekman, E., Ribeiro, A., Félix, S., Caldeira, J., & Barahona, I. (2019). In vitro and in silico evaluations of resin-based dental restorative material toxicity. *Clinical Oral Investigations*, 24, 2691-2700. <https://doi.org/10.1007/s00784-019-03131-4>

Barrett K.E., & Barman S.M., & Boitano S, & Brooks H.L.(Eds.), (2016). *Ganong. Fisiología médica*, 25e. McGraw Hill. <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1800§ionid=125141799>

Bereznowski, Z. (1994). Effect of methyl methacrylate on mitochondrial function and structure. *International Journal of Biochemistry*, 26(9), 1119-1127. [https://doi.org/10.1016/0020-711X\(94\)90134-1](https://doi.org/10.1016/0020-711X(94)90134-1)

Bratt, H., & Hathway, D. (1977). Fate of methyl methacrylate in rats. *British Journal of Cancer*, 36(1), 114-119. <https://doi.org/10.1038/bjc.1977.161>

Brook, M., Wilkinson, D., Phillips, B., Perez-Schindler, J., Philp, A., Smith, K., & Atherton, P. J. (2016). Skeletal muscle homeostasis and plasticity in youth and ageing: impact of nutrition and exercise. *Acta physiologica (Oxford, England)*, 216(1), 15–41. <https://doi-org.uchile.idm.oclc.org/10.1111/apha.12532>

Campaner, M., Takamiya, A., Bitencourt, S., Mazza, L., de Oliveira, S., Shibayama, R., Barão, V., Sukotjo, C., & Pesqueira, A. (2020). Cytotoxicity and inflammatory response of different types of provisional restorative materials. *Archives of Oral Biology*, 111, 104643. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.104643>

Castro, B., & Kuang, S. (2017). Evaluation of Muscle Performance in Mice by Treadmill Exhaustion Test and Whole-limb Grip Strength Assay. *Bio-protocol*, 7(8), e2237. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2237>

Centers for Disease Control and Prevention. (2007). NIOSH Pocket Guide to Chemical Hazards. <https://www.cdc.gov/niosh/docs/2005-149/pdfs/2005-149.pdf>

Chal, J., & Pourquié, O. (2017). Making muscle: skeletal myogenesis in vivo and in vitro. *Development (Cambridge, England)*, 144(12), 2104–2122. <https://doi-org.uchile.idm.oclc.org/10.1242/dev.151035>

Chen, M., Wu, J., Yang, S., Hsieh, W., Liu, J., Fu, E. & Liu, D. (1998). Free radicals are involved in methylmethacrylate-induced neurotoxicity in human primary neocortical cell cultures. *Chinese Journal of Physiology*, 41(4), 203-209.

Chen, Y., Kong, L. D., Xia, X., Kung, H. F., & Zhang, L. (2005). Behavioral and biochemical studies of total furocoumarins from seeds of *Psoralea corylifolia* in the forced swimming test in mice. *Journal of ethnopharmacology*, 96(3), 451–459. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.09.033>

Cimpan, M., Matre, R., Cressey, L., & Tysnes, B. (2000). The effect of heat- and auto-polymerized denture base polymers on clonogenicity, apoptosis, and necrosis

in fibroblasts: Denture base polymers induce apoptosis and necrosis. *Acta Odontologica Scandinavica*, 58(5), 217-228. <https://doi.org/10.1080/000163500750051773>

Cimpan, M., Cressey, L., Skaug, N., Halstensen, A., & Lie, S. (2000). Patterns of cell death induced by eluates from denture base acrylic resins in U-937 human monoblastoid cells. *European Journal of Oral Sciences*, 108, 59-69.

Croom, E. (2012). Metabolism of Xenobiotics of Human Environments. *En Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 112, pp. 31-88). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415813-9.00003-9>

Crout, D., Corkill, J., James, M., & Ling, R.. (1979). Methylmethacrylate Metabolism in Man: The Hydrolysis of Methylmethacrylate to Methacrylic Acid During Total Hip Replacement. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, NA;(141), 90-95. <https://doi.org/10.1097/00003086-197906000-00010>

Dahl, O., Garvik, L., & Lyberg, T. (1994). Toxic effects of methylmethacrylate monomer on leukocytes and endothelial cells in vitro. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 65(2), 147-153.

de Andrade, C., Machado, A., Vergani, C., de Souza, R., & Giampaolo, E. (2012). Cytotoxicity of denture base and hard chairside reline materials: A systematic review. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 107(2), 114-127. [https://doi.org/10.1016/S0022-3913\(12\)60037-7](https://doi.org/10.1016/S0022-3913(12)60037-7)

Donaghy, M., Rushworth, G., & Jacobs, J. (1991). Generalized peripheral neuropathy in a dental technician exposed to methyl methacrylate monomer. *Neurology*, 41(7), 1112-1112. <https://doi.org/10.1212/WNL.41.7.1112>

Durner, J., Walther, U., Zaspel, J., Hickel, R., & Reichl, F.-X. (2010). Metabolism of TEGDMA and HEMA in human cells. *Biomaterials*, 31(5), 818-823. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.097>

Felton, D. (2016). Complete Edentulism and Comorbid Diseases: An Update: Comorbidity and Edentulism Update. *Journal of Prosthodontics*, 25(1), 5-20. <https://doi.org/10.1111/jopr.12350>

Ferracane, J. (2011). Resin composite—State of the art. *Dental Materials*, 27(1), 29-38. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2010.10.020>

Franco, R., & Cidlowski, J. (2009). Apoptosis and glutathione: Beyond an antioxidant. *Cell Death & Differentiation*, 16(10), 1303-1314. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.107>

Frontera, W., & Ochala, J. (2015). Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcified tissue international*, 96(3), 183–195. <https://doi.org.uchile.idm.oclc.org/10.1007/s00223-014-9915-y>

Gad, M., Fouda, S., Al-Harbi, F., Nöpänkangas, R., & Raustia, A. (2017). PMMA denture base material enhancement: A review of fiber, filler, and nanofiller addition. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 12, 3801-3812.

<https://doi.org/10.2147/IJN.S130722>

Gautam, R., Singh, R., Sharma, V., Siddhartha, R., Chand, P., & Kumar, R. (2012). Biocompatibility of polymethylmethacrylate resins used in dentistry. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 100B(5), 1444-1450. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.32673>

Gratton, D., & Aquilino, S. (2004). Interim restorations. *Dental Clinics of North America*, 48(2), 487-497. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2003.12.007>

Hagberg, S., Ljungkvist, G., Andreasson, H., Karlsson, S., & Barregård, L. (2005). Exposure to Volatile Methacrylates in Dental Personnel. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 2(6), 302-306. <https://doi.org/10.1080/15459620590958732>

Hatfield, M. J., Umans, R. A., Hyatt, J. L., Edwards, C. C., Wierdl, M., Tsurkan, L., Taylor, M. R., & Potter, P. M. (2016). Carboxylesterases: General detoxifying enzymes. *Chemico-Biological Interactions*, 259, 327-331. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.02.011>

Hattori, N., Suzuki, T., Jinno, S., Okeya, H., Ishikawa, A., Kondo, C., Hayashi, T., Ito, M., Kanamori, T., Kawai, T., & Noguchi, T. (2008). Methyl Methacrylate Activates the Gsta1 Promoter. *Journal of Dental Research*, 87(12), 1117-1121. <https://doi.org/10.1177/154405910808701214>

Heying, J.. (2009). Flexural strength of interim fixed prosthesis materials after simulated function [Master of Science, University of Iowa]. <https://doi.org/10.17077/etd.tzwo4kfr>

Homlar, K., Sellers, M., Halpern, J., Seeley, E., & Holt, G. (2013). Serum Levels of Methyl Methacrylate Following Inhalational Exposure to Polymethylmethacrylate Bone Cement. *The Journal of Arthroplasty*, 28(3), 406-409. <https://doi.org/10.1016/j.arth.2012.06.038>

Husain, R., Srivastava, S., & Seth, P. (1985). Methyl methacrylate induced behavioural and neurochemical changes in rats. *Archives of Toxicology*, 58(1), 33-36. <https://doi.org/10.1007/BF00292613>

Janaina Habib, J., Machado, A., Vergani, C., & Eunice, G. (2003). Cytotoxicity of denture base acrylic resins: A literature review. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 90(2), 190-193. [https://doi.org/10.1016/S0022-3913\(03\)00349-4](https://doi.org/10.1016/S0022-3913(03)00349-4)

Janda, R. (2009). *Polímeros orgánicos: Química y física, 1.a parte*. Quintessence Técnica, 20(1), 36-50.

Karlsson, J., Wendling, W., Chen, D., Zelinsky, J., Jeevanandam, V., Hellman, S., & Carlsson, C. (1995). Methylmethacrylate monomer produces direct relaxation of vascular smooth muscle in vitro. *Acta anaesthesiologica Scandinavica*, 39(5), 685-689. <https://doi-org.uchile.idm.oclc.org/10.1111/j.1399-6576.1995.tb04148.x>

Kedjarune, U., Charoenworluk, N., & Koontongkaew, S. (1999). Release of methyl methacrylate from heat-curved and autopolymerized resins: Cytotoxicity testing related to residual monomer. *Australian Dental Journal*, 44(1), 25-30.

<https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.1999.tb00532.x>

Kenneth, R. (2007). Biocompatibility of Dental Materials. *The Dental Clinics Of North America*, 51, 747-760. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2007.03.003>

Kim, Y.-H., Cho, Y., & Kim, H. (2003). Effects of methyl methacrylate on Ca²⁺ uptake of cardiac sarcoplasmic reticulum. *Pharmacological Research*, 47(1), 11-16. [https://doi.org/10.1016/S1043-6618\(02\)00256-6](https://doi.org/10.1016/S1043-6618(02)00256-6)

Kinoshita, H., Orita, S., Inage, K., Yamauchi, K., Abe, K., Inoue, M., Norimoto, M., Umimura, T., Eguchi, Y., Fujimoto, K., Shiga, Y., Kanamoto, H., Aoki, Y., Furuya, T., Suzuki, M., Akazawa, T., Takahashi, K., & Ohtori, S. (2019). Skeletal Muscle Cell Oxidative Stress as a Possible Therapeutic Target in a Denervation-Induced Experimental Sarcopenic Model. *Spine*, 44(8), E446–E455. <https://doi.org/10.1097/BRS.0000000000002891>

Kruse J. (2012). Methanol and ethylene glycol intoxication. *Critical care clinics*, 28(4), 661–711. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2012.07.002>

Lai, Y.-L., Chen, Y.-T., Lee, S.-Y., Shieh, T.-M., & Hung, S.-L. (2004). Cytotoxic effects of dental resin liquids on primary gingival fibroblasts and periodontal ligament cells in vitro. *Journal of Oral Rehabilitation*, 31(12), 1165-1172. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2842.2004.01355.x>

Lefebvre, C., Knoernschild, K., & Schuster, G. (1994). Cytotoxicity of eluates from light-polymerized denture base resins. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 72(6), 644-650. [https://doi.org/10.1016/0022-3913\(94\)90298-4](https://doi.org/10.1016/0022-3913(94)90298-4)

Leggat, P., & Kedjarune, U. (2003). Toxicity of methyl methacrylate in dentistry. *International Dental Journal*, 53(3), 126-131. <https://doi.org/10.1111/j.1875-595X.2003.tb00736.x>

Leggat, P., Smith, D., & Kedjarune, U. (2009). Surgical Applications of Methyl Methacrylate: A Review of Toxicity. *Archives of Environmental & Occupational Health*, 64(3), 207-212. <https://doi.org/10.1080/19338240903241291>

Llanos, P., Contreras-Ferrat, A., Georgiev, T., Osorio-Fuentealba, C., Espinosa, A., Hidalgo, J., Hidalgo, C., & Jaimovich, E. (2015). The cholesterol-lowering agent methyl- β -cyclodextrin promotes glucose uptake via GLUT4 in adult muscle fibers and reduces insulin resistance in obese mice. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 308(4), E294–E305. <https://doi-org.uchile.idm.oclc.org/10.1152/ajpendo.00189.2014>

Lomax, L., Krivanek, N., & Frame, S. (1997). Chronic inhalation toxicity and oncogenicity of methyl methacrylate in rats and hamsters. *Food and Chemical Toxicology*, 35(3-4), 393-407. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(97\)80198-6](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(97)80198-6)

Lönnroth, E.-C., Wellendorf, H., & Ruyter, E. (2003). Permeability of different types of medical protective gloves to acrylic monomers: Permeability of gloves to monomers. *European Journal of Oral Sciences*, 111(5), 440-446. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0722.2003.00064.x>

Maddux, W., Abebe, W., Schuster, G., & Mozaffari, M. (2002). Effects of dental

resin components on vascular reactivity. *Journal of biomedical materials research*, 61(4), 572–580. <https://doi-org.uchile.idm.oclc.org/10.1002/jbm.10237>

Mainwaring, G., Foster, J., Lund, V., & Green, T. (2001). Methyl methacrylate toxicity in rat nasal epithelium: Studies of the mechanism of action and comparisons between species. *Toxicology*, 158(3), 109-118. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(00\)00332-2](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(00)00332-2)

Martin, J., Digioia, W., Werley, M., & Tansy, M. (1981). Inhibitory effects of inhaled methyl methacrylate vapor on amphibian skeletal muscle. *Journal of Dental Research*, 60(6), 1028-1030. <https://doi.org/10.1177/00220345810600060401>

McMartin, K., Jacobsen, D., & Hovda, K. E. (2016). Antidotes for poisoning by alcohols that form toxic metabolites. *British journal of clinical pharmacology*, 81(3), 505–515. <https://doi-org.uchile.idm.oclc.org/10.1111/bcp.12824>

Morais, F., Mello, B., Souza, I., Ponzi, E., & Revoredo, G.. (2007). Polymers: a base methylmetacrylate. Importance in Dentistry. *International Journal of Dentistry, Recife*, 6(2), 63-66.

Moser V. C. (2011). Functional assays for neurotoxicity testing. *Toxicologic pathology*, 39(1), 36–45. <https://doi.org/10.1177/0192623310385255>

National Toxicology Program (NTP). (1986). Toxicology and carcinogenesis studies of methyl methacrylate in F344/N rats and B6C3F1 mice (Inhalation studies). U.S. Department of Health and Human Services - Public Health Service: National Institutes of Health, 87-2570.

Parizi, J., Nai, G., Batalha, C., Lopes, C., Rizzo, M., Falcone, C., & Bertão, J. (2005). Assessment of methyl methacrylate vapor toxicity on the rat tracheal epithelium. *Brazilian Oral Research*, 19(3), 223-227. <https://doi.org/10.1590/S1806-83242005000300012>

Pemberton, M., Bailey, L., & Rhomberg, L. (2013). Hypothesis-based weight-of-evidence evaluation of methyl methacrylate olfactory effects in humans and derivation of an occupational exposure level. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 66(2), 217-233. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2013.04.001>

Rakhshan, V. (2015). Marginal integrity of provisional resin restoration materials: A review of the literature. *The Saudi Journal for Dental Research*, 6(1), 33-40. <https://doi.org/10.1016/j.sjdr.2014.03.002>

Redinbo, M., & Potter, P. (2005). Keynote review: Mammalian carboxylesterases: From drug targets to protein therapeutics. *Drug Discovery Today*, 10(5), 313-325. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(05\)03383-0](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(05)03383-0)

Restrepo, D., & Ardila, C. (2010). Reacciones adversas ocasionadas por los biomateriales usados en prostodoncia. *Avances en Odontoestomatología*, 26(1), 19-30.

Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2013). Cell Viability Assays. In S. Markossian (Eds.) et. al., *Assay Guidance Manual*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing

Translational Sciences.

Sadoh, D., Sharief, M., & Howard, R. (1999). Occupational exposure to methyl methacrylate monomer induces generalised neuropathy in a dental technician. *British Dental Journal*, 186, 380-381.

Sasseville, D. (2012). Acrylates in Contact Dermatitis. *Dermatitis*, 23(1), 6-16. <https://doi.org/10.1097/DER.0b013e31823d1b81>

Schmalz, G., & Galler, K. (2017). Biocompatibility of biomaterials – Lessons learned and considerations for the design of novel materials. *Dental Materials*, 33(4), 382-393. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2017.01.011>

Seiss, M., Track, N., Hickel, R., & Reichl, F.-X. (2009). In vitro stability of methylmethacrylic acid, TEGDMA and HEMA exposed to esterases. *Dental Materials*, 25(8), 1044-1049. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2009.03.005>

Shahi, S., Özcan, M., Maleki Dizaj, S., Sharifi, S., Al-Haj Husain, N., Eftekhari, A., & Ahmadian, E. (2019). A review on potential toxicity of dental material and screening their biocompatibility. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 29(5), 368-377. <https://doi.org/10.1080/15376516.2019.1566424>

Soykut, B., Erdem, O., Akay, C., & Pişkin, B. (2017). Investigation of the oxidative stress condition for occupational exposure to methyl methacrylate. *Toxicology and Industrial Health*, 33(1), 61-66. <https://doi.org/10.1177/0748233716659840>

Soykut, B., Erdem, O., Yalçın, C. Ö., Üstündağ, A., Duydu, Y., Akay, C., & Pişkin, B. (2020). Occupational exposure of dental technicians to methyl methacrylate: Genotoxicity assessment. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 852, 503159. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2020.503159>

Sreekumar, A., & Pradeep, N. (2012). An in vitro Investigation into the Cytotoxicity of Methyl Methacrylate Monomer. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, 13(6), 838-841. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10024-1239>

Tanaka, M., Nakamura, F., Mizokawa, S., Matsumura, A., Nozaki, S., & Watanabe, Y. (2003). Establishment and assessment of a rat model of fatigue. *Neuroscience letters*, 352(3), 159–162. <https://doi.org.uchile.idm.oclc.org/10.1016/j.neulet.2003.08.051>

Tapia, R., Valenzuela Aránguiz, V., Zamorano Pino, X., & Baena Águila, R. (2010). Heat Production Measuring in Autopolimerizing Acrylics. *Avances en Odontoestomatología*, 26(2), 91-96.

Verkkala, E., Rajaniemi, R., & Savolainen, H. (1983). Local neurotoxicity of methylmethacrylate monomer. *Toxicology Letters*, 18(1-2), 111-114. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(83\)90079-6](https://doi.org/10.1016/0378-4274(83)90079-6)

Wang, D.-D., Zou, L.-W., Jin, Q., Hou, J., Ge, G.-B., & Yang, L. (2017). Recent progress in the discovery of natural inhibitors against human carboxylesterases. *Fitoterapia*, 117, 84-95. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2017.01.010>

Wei, W., Li, Z., Zhu, T., Fung, H. Y., Wong, T. L., Wen, X., Ma, D. L., Leung, C. H., & Han, Q. B. (2017). Anti-Fatigue Effects of the Unique Polysaccharide Marker of *Dendrobium officinale* on BALB/c Mice. *Molecules* (Basel, Switzerland), 22(1), 155. <https://doi-org.uchile.idm.oclc.org/10.3390/molecules22010155>

Wu, R., Sun, Y., Zhou, T., Zhu, Z., Zhuang, J., Tang, X., Chen, J., Hu, L., & Shen, X. (2014). Arctigenin enhances swimming endurance of sedentary rats partially by regulation of antioxidant pathways. *Acta pharmacologica Sinica*, 35(10), 1274–1284. <https://doi.org/10.1038/aps.2014.70>

Yamada, M., Kojima, N., Att, W., Hori, N., Suzuki, T., & Ogawa, T. (2009). Acetyl cysteine restores viability and function of rat odontoblast-like cells impaired by polymethylmethacrylate dental resin extract. *Redox Report*, 14(1), 13-22. <https://doi.org/10.1179/135100009X392430>

Young, H., Smith, C., & Morton, D. (2001). Comparative in vitro evaluation of two provisional restorative materials. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 85(2), 129-132. <https://doi.org/10.1067/mpr.2001.112797>

10) Anexos y apéndices:



Santiago, 16 de diciembre de 2021

Certificado N°: 21515 – MED – UCH

CERTIFICADO

El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile, certifica que en el Protocolo CBA 1197 FMUCH del Proyecto de Investigación titulado "Estudio preliminar: efectos del Metil-Metacrilato sobre la viabilidad de células musculares, fuerza y resistencia muscular en ratones", de la investigadora Srta. Pamela Alvarado, estudiante de Odontología y de la académica patrocinante Dra. Paola Llanos, Profesora Asistente, Instituto de Ciencias Odontológicas, Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, no se plantean acciones en sus procedimientos que contravengan las normas bioéticas de manejo y cuidado de animales. Así mismo, la metodología experimental planteada satisface lo estipulado en el Programa Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile.

Las investigadoras se han comprometido a la ejecución de este proyecto dentro de las especificaciones señaladas en el protocolo revisado y autorizado por el CICUA, a mantener los procedimientos experimentales planteados y a no realizar ninguna modificación sin previa aprobación por parte de este Comité.

Se otorga la presente certificación para el uso de 24 ratones, especie *Mus musculus*, cepa BALB/c, provenientes del Bioterio Central, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, desde diciembre del 2021 hasta diciembre del 2023, tiempo estimado de ejecución del estudio, el cual será financiado por Proyecto Fondecyt Regular 1190406.

El CICUA de la Universidad de Chile, forma parte de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo, y está constituido por 33 miembros: 3 médicos veterinarios, 39 académicos (12 de ellos médicos veterinarios), y 9 miembros no asociados a la academia o investigación, y que cuentan con experiencia en bioética relacionada a mantención y uso de animales. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del "Protocolo de Manejo y Cuidado de Animales" después de un estudio acucioso y de la acogida de las investigadoras de las observaciones exigidas por el Comité.

Claudia Delgado Acevedo
Directora Ejecutiva
CICUA – VID
Universidad de Chile



Dr. Emilio Herrera Videla
Presidente
CICUA - VID
Universidad de Chile

Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA)
Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo (VID) – Universidad de Chile

<http://www.uchile.cl/portal/investigacion/152120/comite-institucional-de-cuidado-y-uso-de-animales-cicua>

email: coordinador.cicua@uchile.cl



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA

Unidad de Prevención de Riesgos & Bioseguridad

Santiago, 23 de Abril 2019.-

Señores

FONDECYT Regular N° 1190406

PRESENTE

Estimados señores:

La Unidad de Prevención de Riesgos & Bioseguridad, Facultad de Medicina, Universidad de Chile certifica que ha recibido del investigador responsable Dra. Paola Llanos Vidal para su estudio el proyecto titulado **"NLRP3 Inflammasome in skeletal muscle: a novel link between cholesterol accumulation and insulin-mediated glucose transport in insulin resistance."** Laboratorio de metabolismo muscular del CEMC, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, el cual cumple con los requerimientos básicos de Bioseguridad para ser desarrollado, además se adecua a las exigencias establecidas por los manuales: CONICYT "Bioseguridad 1ra edición, 1994" y "Manual de Normas de Bioseguridad, 2da edición 2008", "Manual de Normas Bioseguridad y Riesgos asociados Fondecyt - CONICYT, versión 2018", Centro de Control y Prevención de Enfermedades. CDC, 4ª edición, Manual Bioseguridad en laboratorios, Organización Mundial de la Salud OMS, Ginebra 2005, por tal motivo nuestra Unidad da el visto bueno para su realización.

El investigador responsable Dra. Paola Llanos Vidal, se compromete a cumplir con las normas de bioseguridad indicadas en los manuales antes mencionados y las establecidas en el Reglamento Interno del funcionamiento de los laboratorios, Unidad de Prevención de Riesgos y Bioseguridad, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. En concomitancia se hace responsable de que todos los participantes del proyecto cumplan con las normas de bioseguridad establecidas.

Tomé conocimiento: Dra. Paola Llanos Vidal

Ing. Elizabeth Quintanilla G.
Directora de Unidad de Prevención de Riesgos y Bioseguridad

C.C.

- Decano, Dr. Manuel Kukuljan
- Investigador responsable, Dra. Paola Llanos Vidal
- Archivo