

EVALUACION DE LOS RADICALES LIBRES PRESENTES EN TEJIDOS BIOLÓGICOS SOMETIDOS A ACLARADORES DENTALES POR MEDIO DE RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA

Abella, V. Botina, L. Martínez, E. Pajaro, A*
Jaimes, G. Almanza, O, López C**

RESUMEN

OBJETIVO: El objetivo es demostrar o determinar mediante Resonancia Paramagnética electrónica la presencia de radicales libres sobre: paladar de humano, sangre humana y paladar de conejo, cuando ellos interactúan con productos comerciales de aclaramiento dental que contienen peróxido de hidrogeno en diversas concentraciones. **MATERIALES Y MÉTODOS:** Se realizó un estudio experimental exploratorio in vitro en 18 muestras procedentes de 4 sujetos sanos, un conejo y una de sangre total humana. Los sujetos seleccionados para el estudio, quienes firmaron el consentimiento informado, cumplieron con los siguientes criterios de inclusión: hombres y mujeres con un rango de edad entre 20 y 35 años, con una higiene oral adecuada. Se excluyeron sujetos con patologías orales, sometidos a aclaramiento dental, comprometidos sistémicamente y sujetos con alergia a alguno de los componentes a utilizar durante el procedimiento quirúrgico. La selección del conejo se hizo teniendo en cuenta los siguientes criterios de inclusión: peso de 6kg, raza Checkered Giant, macho, de 8 meses de edad, sano, criterios elegidos por el veterinario asesor para esta investigación. **RESULTADOS:** Las muestras analizadas de paladar de humano y sangre, no mostraron señal por EPR, al menos distinguible dentro de la resolución del equipo por ello no son mostradas en este trabajo. En las muestras del paladar de conejo se observó el espectro por EPR, suma de varias señales y puede deberse a la presencia de Mn^{2+} , el cual tiene un spin nuclear de 5/2 y un spin electrónico de 1/2, a radicales libres provenientes del material orgánico constituyentes del tejido y a pequeños cluster de hierro. **CONCLUSIONES:** Por resonancia paramagnética electrónica es posible detectar la presencia de radicales libres en tejidos biológicos sometidos a aclaradores dentales, siempre y cuando se cumplan ciertos parámetros.

Palabras clave: EPR, Tejidos Biológicos, Peróxido de Hidrogeno, Radicales Libres

ABSTRACT

OBJETIVE: The objective of this work is demonstrate and determinate from electron paramagnetic resonance the presence of free radicals in: human's palate, human blood and rabbit's palate when they are subject at the commercial hydrogen peroxide action. **MATERIALS AND METHODS:** We performed an exploratory pilot study in vitro in 18 samples from 4 healthy subjects, a rabbit and a human whole blood. Subjects selected for the study, who signed the informed consent, met the following inclusion criteria: men and women with an age range between 20 and 35 years with proper oral hygiene. We excluded subjects with oral pathologies underwent dental clearance, and systemically compromised subjects with allergy to any of the components used during the surgical procedure. The selection of the rabbit was given the following inclusion criteria: the weight of 6kg, Checkered Giant breed, male, 8 months old, healthy, veterinarian criteria chosen by the advisor for this research. **RESULTS:** The samples of human blood and palate, showed no signal by EPR, andalusia less distinguishable within the resolution of the equipment are therefore not shown in this work. In the samples of rabbit palate was observed by the EPR spectrum, a sum of several signals and may be due to the presence of Mn^{2+} , which has a nuclear spin 5 / 2 electron spin and a half to free radicals from the material organic constituents of tissue and small clusters of iron. **CONCLUSIONS:** It is possible discover free radicals in biological tissues undergoing dental bleaching by electron paramagnetic resonance. They must follow a strict protocol of measurements.

Keys Word: EPR, Tissue biologics, Hydrogen peroxide, free radicals

* Residentes Postgrado de Prostdoncia Institución Universitaria Colegios de Colombia

** Asesor Científico Odontólogo UN, Licenciado en Biología Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Msc en Bioquímica UN, Candidato a Dr. en Ciencias Farmacéuticas UN.

** Asesor Científico Docente de Física UN, Doctor en Física.

** Asesor Estadístico. Estadística UN

INTRODUCCION

La Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR/RPE) se enmarca dentro de una variedad importante de técnicas espectroscópicas modernas utilizadas en el estudio de la estructura y propiedades de la materia. Su principio teórico es común a la Resonancia Magnética Nuclear (más conocida por sus aplicaciones médicas) y contiene grandes similitudes con otras muchas espectroscopias en que la fuente energética es la radiación electromagnética. (1)

Las técnicas de EPR permiten exclusivamente la observación de centros paramagnéticos. La información que se obtiene mediante esta técnica es muy específica ya que se refiere únicamente al electrón desapareado y su entorno más próximo. (2,3)

Las aplicaciones de la espectroscopia de Resonancia Paramagnética Electrónica son numerosas y se extienden a diversos campos de investigación de la Química, Física, Biología, Geología y Medicina. Por su carácter no destructivo y su alta versatilidad es el complemento ideal de otros métodos de análisis, permitiendo obtener valiosa información estructural y dinámica. A diferencia de otras técnicas, puede utilizarse en el estudio de procesos fisico-químicos en evolución sin influenciar en su desarrollo. Entre sus múltiples áreas de aplicación se pueden destacar: Fenómenos de Relajación, Geocronología, Reacciones Poliméricas, Fotosíntesis y Radicales en tejidos vivos. (4)

En los tejidos vivos, las biomoléculas, en especial los ácidos nucleicos, hidratos de carbono y lípidos, no presentan en su composición sustancias paramagnéticas. Sin embargo en las proteínas que contienen metales de transición en su centro activo, se generan, durante su funcionamiento radicales libres procedentes de algún aminoácido o grupo orgánico de la proteína que son susceptibles de ser detectados mediante esta técnica. (5)

Los radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado en capacidad de aparearse, por lo que son muy reactivos. Estos radicales recorren nuestro organismo intentando captar un electrón de las moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el

radical libre ha conseguido captar el electrón que necesita para aparear su electrón libre, la molécula estable que se lo sede se convierte a su vez en un radical libre, por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una verdadera reacción en cadena que destruye nuestras células. (6)

La vida media de algunos radicales es demasiado transitoria para poder ser detectados por EPR en onda continua. La técnica de los inmovilizadores de espín consiste en la adición a la muestra de ciertos compuestos orgánicos (principalmente aminas y compuestos nitrosos) de manera que estos compuestos reaccionan con los radicales que se quieren estudiar y dan productos que son más fácilmente detectables por EPR debido a su más larga vida. (7)

La preparación de muestras biológicas para EPR presenta algunas características especiales debido a su naturaleza. Una muestra de EPR consiste simplemente en una preparación del sistema biológico, colocado en un porta muestras apropiado para introducir en la cavidad resonante. El porta muestras es un tubo de cuarzo cuyo tamaño depende de la frecuencia de microondas a la que se vaya a realizar el experimento. (8)

Un inconveniente en estudios de disoluciones acuosas a temperatura ambiente es que el agua causa pérdidas dieléctricas en la cavidad magnética y por tanto, pérdida de la capacidad de detección. Este hecho no impide la realización de este tipo de experimentos, pero limita la cantidad de muestra que se puede introducir en la cavidad (obligando además al uso de porta muestras especiales, como celdas planas o tubos más pequeños) (8)

El aclaramiento dental se ha convertido en un procedimiento de práctica común en el ejercicio odontológico, sin embargo las dificultades de acceso a información precisa ha generado el uso indiscriminado de los agentes blanqueadores y sus técnicas; provocando lesiones en los tejidos orales. Los estudios de aclaramiento para dientes vitales y no vitales in vivo e in vitro, por lo general consideran las técnicas ambulatorias o de consultorio con variación de concentración del agente aclarador y sus efectos sobre el esmalte. (9-11)

El agente aclarador de uso común en odontología es el peróxido de hidrógeno. Se han reportado efectos adversos como son reabsorción radicular, sensibilidad dental y efectos genotóxicos en estudios sobre cultivos bacterianos de células epiteliales pero se ha encontrado que estos efectos se reducen o se neutralizan en presencia de enzimas metabólicas humanas. (12) Sin embargo estudios realizados sobre hámster arrojaron indicios sobre la posible capacidad carcinogénica de los peróxidos de hidrogeno los cuales no se deben usar sin barrera gingival. (12-13)

El peróxido de hidrogeno, líquido incoloro soluble en agua, es un agente oxidante utilizado como agente aclarador a nivel industrial y clínico, desinfectante y neutralizador en la industria etílica. La reacción de los peróxidos de hidrogeno genera especies reactivas de oxigeno: los superóxidos (O_2), iones Hidroxilo (OH), peróxidos (ROO) y alcosilos (RO). (14,15)

Uno de los radicales considerado de los más reactivos es el Radical Hidroxilo. Este actúa sobre los lípidos y provoca peroxidación lipídica de las membranas. En las proteínas da lugar a inactivación enzimática; en el ADN, ocasiona mutaciones y puede provocar alteraciones en los receptores celulares. (16-17)

Los efectos nocivos que causan el peróxido de hidrogeno pueden reaccionar directamente sobre el ADN por medio de oxígenos altamente reactivos y especies radicales que causan demanda oxidativa del ADN, reconocido esto como la mayor causa de muerte celular y mutación en todas las células aeróbicas. En humanos la demanda oxidativa de ADN es el principal promotor de cáncer. (18)

Todas las técnicas de aclaramiento tienen por principio activo la oxidación y el rompimiento de las moléculas oscurecidas a través del oxígeno liberado por los agentes aclaradores. (19-20)

El objetivo de este estudio es explorar la posibilidad de detectar mediante EPR la presencia de radicales libres en tejidos biológicos sometidos a aclaramiento dental.

MATERIALES Y METODOS

Se realizó un estudio experimental exploratorio in vitro en 18 muestras procedentes de 4 sujetos sanos, un conejo y una de sangre total humana. Los sujetos seleccionados para el estudio, quienes firmaron el consentimiento informado,

cumplieron con los siguientes criterios de inclusión: hombres y mujeres con un rango de edad entre 20 y 35 años, con una higiene oral adecuada. Se excluyeron sujetos con patologías orales, sometidos a aclaramiento dental, comprometidos sistémicamente y sujetos con alergia a alguno de los componentes a utilizar durante el procedimiento quirúrgico.

La selección del conejo se hizo teniendo en cuenta los siguientes criterios de inclusión: peso de 6kg, raza Checkered Giant, macho, de 8 meses de edad, sano, criterios elegidos por el veterinario asesor para esta investigación.

TOMA DE MUESTRAS QUIRURGICAS:

El procedimiento para la toma de la muestra de paladar se realizó en las instalaciones de la Universidad Nacional siguiendo el protocolo recomendado para material biológico: Se realizaron los siguientes pasos para la toma de la muestra del paladar humano, realizado por un profesional en periodoncia, quien siguió los protocolos de asepsia y antisepsia, se procedió a anestésiar la zona de premolares con lidocaína mas epinefrina al 2%, la incisión se realizó con hoja de bisturí # 11, el tamaño de la muestra fue de 9mm de longitud x 3mm de ancho aproximadamente; se realizó el debridamiento con periostótomo obteniendo la muestra de tejido. (Figura 1)



Figura 1. Zona de premolares de donde se obtuvo la muestra

El lavado se realizó en una caja de petri con solución salina estéril durante un minuto y se seccionó la muestra en 3 partes iguales, aproximadamente, que luego fueron secadas con una gaza estéril. (Figura 2,3)



Figura 2. Muestra seccionada de paladar de humano durante el lavado



Figura 3. Tres muestras de paladar de humano sobre gasa estéril

El mismo procedimiento se siguió para las otras muestras obtenidas. Se obtuvieron un total de 12 muestras de los 4 sujetos y se llevaron en el mismo momento al medio de cultivo, compuesto por suero fetal bovino al 10%. Para ser analizadas se formaron en bloques de 3 muestras como se observa en la Figura 2 y 3

Como control negativo de las 12 muestras se tomaron 3 al azar, las cuales no fueron expuestas al peróxido de hidrógeno.

Como control positivo se tomaron las 9 muestras restantes, las cuales fueron sometidas a peróxido de hidrógeno al 50% durante 15 minutos. (Figura 4)



Figura 4. Tres muestras de paladar de humano en peróxido de hidrógeno al 50%

Se secaron con gasa estéril y fueron llevadas una a una al equipo de EPR para su lectura. (Figura 5)

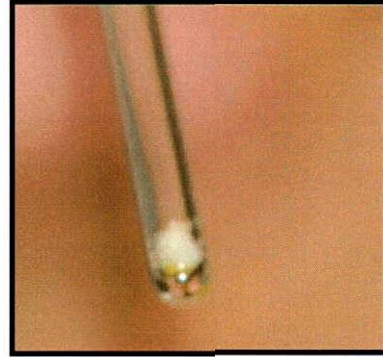


Figura 5. Una muestra de paladar en tubo de cuarzo para llevar a la lectura en equipo de EPR

La muestra de sangre, se obtuvo de uno de los sujetos participantes en el estudio la cual se tomó en un laboratorio clínico por una bacterióloga, utilizando un equipo de vacutainer heparinizado, se tomaron 5ml.

Para el control negativo, de la muestra de sangre total, en un vaso de precipitado se adicionaron 5mg de PBN (Trampa de Spin) en 20 ml de peróxido de hidrógeno al 50% por medio de una pipeta y se llevó a la celda para líquido para su lectura en el equipo de EPR. (Figura 6)

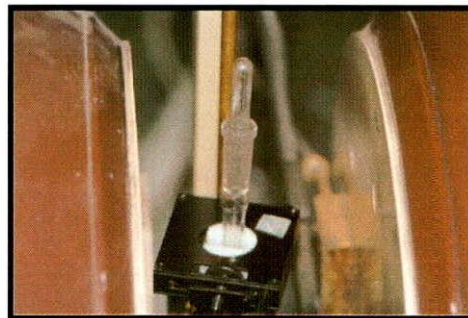


Figura 6. Muestra de peróxido de hidrógeno más PBN en celda para líquidos

Para el segundo control negativo se adicionaron en un vaso de precipitado 2ml de sangre con PBN (Trampa De Spin) para su lectura en EPR. (Figura 7)



Figura 7. Muestra sangre + PBN en celda para líquidos

Para el control positivo en un tubo de cuarzo del equipo de EPR, a una muestra de 2ml de sangre se le adicionaron peróxido de hidrogeno al 50% con 5mg PBN y se llevo para su lectura. (Figura 8)

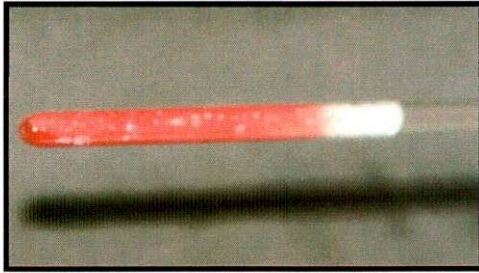


Figura 8. Muestra de sangre + PBN + peróxido al de hidrogeno a 50% en tubo de cuarzo

El procedimiento para la obtención de las muestras de paladar de conejo se adelanto en las instalaciones de la Universidad Nacional por un Médico veterinario quien indujo la sedación del conejo con Xiloxina 1mg/Kg IM. Luego de 10 minutos se procedió a la profundización de la anestesia con Ketamina 5mg/Kg más Diazepam 0.4mg/kg IV en la oreja izquierda. (Figura 9,10)



Figura 9. Sedación del conejo en pata izquierda



Figura 10. Profundización de la anestesia del conejo en oreja izquierda

Después de 15 minutos se aplicó peróxido de hidrogeno al 25% en la zona más posterior del paladar duro aproximadamente de 3 x 3mm durante 15 minutos. (Figura 11)

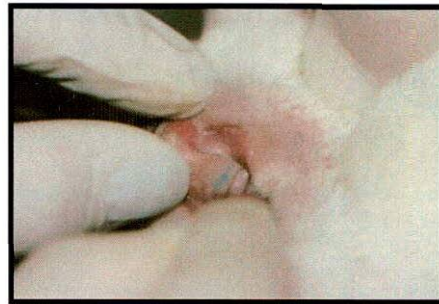


Figura 11. Aplicación de peróxido de hidrógeno al 25% en zona posterior del paladar del conejo

Luego se procedió a la obtención de la muestra realizando una incisión con una hoja de bisturí #11 en la zona tratada y posteriormente el debridamiento con periostotomo. (Figura 12)

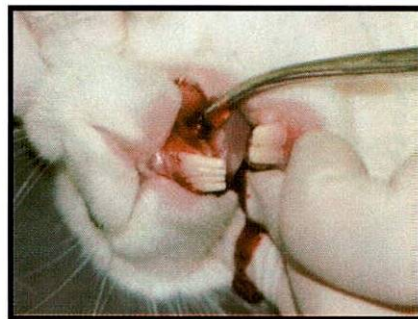


Figura 12. Obtención de la muestra de paladar de conejo sometida a peróxido de hidrogeno al 25%

La muestra extraída se lavó con agua desmineralizada durante un minuto y se secó con gasa estéril para ser llevada al equipo de EPR para su lectura.

Se efectuó igual procedimiento para las muestras sometidas a peróxido de hidrogeno al 35 y 38% pero en distintas zonas del paladar medio y anterior respectivamente.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se presentan en la Tabla 1 describiendo el experimento de las 18 muestras, distribuidos en 6 bloques según concentraciones de peróxido de hidrogeno y precedencia de la muestra, con señales positivas y negativas donde se cuantifica la señal obtenida a la concentración de 25% de peróxido de hidrogeno y cualitativa en concentraciones de 35 y 38% según el reporte del laboratorio de resonancia paramagnética electrónica de la universidad nacional.

RESULTADOS

El total de muestras analizadas fueron 18 y se formaron bloques de 3 muestras aleatorias. En la Tabla 1, los bloques 1, 2, 3, 4, procedentes de paladar de humano expuestos a concentraciones al 50% de peróxido de hidrógeno no presentaron señal.

Tabla 1. Descripción de resultados de muestras de tejidos blandos y sangre según concentraciones de Peróxido de hidrógeno mediante Resonancia paramagnética electrónica					
Bloques	Muestras	Procedencia	Peróxido de hidrógeno Concentración	Bloques	Resultados Intensidad
1	1	Paladar humano	0%	Control negativo	Sin señal
	2				
	3				
2	1	Paladar humano	50%		Sin señal
	2				
	3				
3	1	Paladar humano	50%		Sin señal
	2				
	3				
4	1	Paladar humano	50%		Sin señal
	2				
	3				
5	1	Sangre humana	0% + PBN + sangre	Control negativo	Sin señal
	2		50% + PBN	Control negativo	Sin señal
	3		50% + PBN + sangre	Control positivo	Sin señal
6	1	Paladar animal	25%	Experimental	Alta
	2		35%		Baja
	3		38%		Baja
Total muestras = 18					

* -Ancho pico a pico (Gaus)= 51.1
 *Constante hiperfina = 92
 *Valor g central= 2.02

El bloque 5 procedente de sangre humana conformado por 3 muestras, la primera con PBN y sangre, la segunda expuesta al 50% con PBN y la tercera expuesta al 50% con PBN y sangre, los resultados en EPR no detectaron señales. (Tabla 1)

Los resultados del bloque 6 procedentes de paladar de animal fueron positivos a menor concentración del peróxido de hidrógeno. (Tabla1)

La concentración de 25% presentó el Ancho pico a pico (Gaus)= 51.1, Constante hiperfina = 92, Valor g central= 2.08 La señal asociada a radicales libres está marcada como línea 8. (Figura 13).

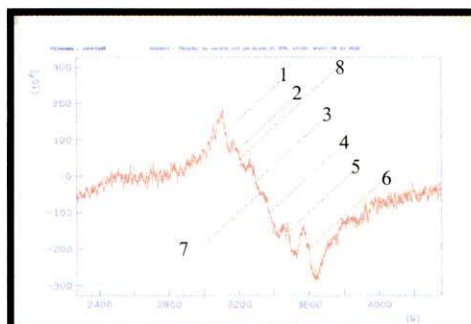


Figura 13. El espectro de EPR proveniente del Mn²⁺ está constituido por seis señales, de los cuales los Las señales están marcadas en la Figura 13 con valores numéricos del 1 al 6.

En la Figura 14, a y b, se observan los espectros de EPR obtenidos en muestras de paladar de conejo tratadas con peróxido de hidrógeno al 35 y 38 % respectivamente. La intensidad de las señales es mucho menor que la observada en la muestra tratada al 25%.

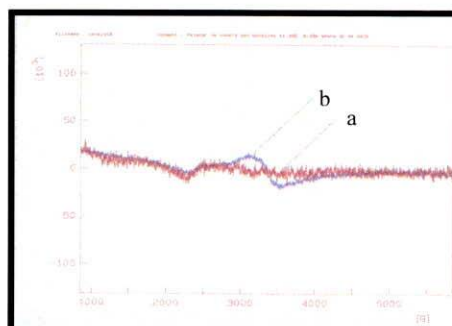


Figura 14. Espectro obtenido de muestras de paladar de conejo sometidas a peróxido de hidrógeno al 35 y 38 %

DISCUSIÓN

La resonancia paramagnética electrónica resulta efectiva en determinados tejidos cuyas características permiten la tenencia de señales fácilmente detectables por el equipo. Debido a la poca información bibliográfica existente donde se muestre la aplicación de la técnica de EPR en modelos biológicos, en particular tejidos de paladar, se decidió estudiar este material en donde se obtuvieron resultados. Lo anterior servirá de base para estudios posteriores.

La técnica descrita y los datos mostrados en este trabajo, corresponden a experiencias iniciales cuyo objetivo final fue demostrar o determinar mediante Resonancia Paramagnética Electrónica la presencia de radicales libres sobre 18 muestras divididas en bloques: 12 de paladar de humano, 3 de sangre humana y 3 de paladar de conejo, cuando ellos interactúan con productos comerciales de aclaramiento dental que contienen peróxido de hidrógeno en diversas concentraciones.

Para las muestras en las cuales no se obtuvo señal, (Bloques 1-4) provenientes de tejido de paladar de humano la causa puede ser que la aplicación del peróxido fue después de extraída la muestra, lo que disminuye la posibilidad de reacción entre el peróxido de hidrógeno y la muestra por "muerte celular" de la misma. Así pues, queda establecido que el mejor método para ver los efectos del peróxido sobre el tejido es cuando el estudio se realiza sobre muestras a las cuales se les aplica el aclarador antes de ser extraídas. No obstante las muestras extraídas fueron pequeñas, la condición de ser mantenidas en suero fetal bovino al 10% (inocua para los tejidos vivos) podría permitir un lapso de tiempo más amplio para el ensayo sin que las afecte estados de oxidación o degradación importantes.

Respecto al bloque 5 la causa probable, es la actividad catalasa. Esta es una enzima que detoxifica las células del peróxido de hidrógeno producido en su metabolismo, al descomponer dicho peróxido en agua y oxígeno molecular. Se conoce en general que cada molécula de catalasa que puede estar entre los 210 a 280 kD, consta de cuatro subunidades idénticas que se mantienen unidas por interacciones no covalentes. Cada subunidad contiene un grupo prostético de protoporfirina IX, con un contenido de hierro que representa el 0.09 % del peso molecular total de la enzima (23,24). Esta enzima puede estar implicada en la respuesta negativa, puesto que su actividad podría estar limitando la presencia de radicales activos en los bloques 1-5. Por otra parte el hierro por sí solo tiene un poder catalítico sobre peróxido de hidrógeno cuando actúa sobre él. (25)

El peróxido de hidrógeno es altamente reactivo cuando entra en contacto con sustancias que lo pueden descomponer. En concentraciones muy altas como 50%, utilizada en paladar de humano y sangre humana, del presente estudio, no se encontró señal, las razones pueden obedecer a diversas causas, pero la más probable es que a

altas concentraciones aumente la cinética de la reacción y con ello la producción de radicales es mucho mayor que a concentraciones inferiores como la de los productos en estudio, peróxido de hidrógeno al 25, 35, 38%.

Así, el primer problema a resolver es la concentración del peróxido de hidrógeno puesto que la intensidad de las señales de las muestras sometidas a 35% y 38% es mucho menor que la observada en la muestra tratada al 25%. (26)

CONCLUSIONES

La técnica de resonancia paramagnética electrónica es altamente sensible para la determinación de radicales libres. Sin embargo, en algunas situaciones se deben tener unas consideraciones relevantes para obtención de resultados, tales como: utilización de trampas de spin y manipulación adecuada de muestras. En nuestro estudio además jugó un papel importante la concentración del peróxido de hidrógeno.

Los resultados mostraron la presencia de manganeso 2+ y pequeños clusters de hierro. Se pudo observar la presencia de pequeñas cantidades de radicales libres, esto está avalado por la poca intensidad de la señal de EPR asociadas a ellos.

RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar nuevos ensayos sobre tejido que haya sido sometido a aclaradores dentales antes de ser retirado de la cavidad oral para la medición en EPR.

Siempre que se quiera realizar mediciones con peróxido de hidrógeno, es recomendable iniciar con menores concentraciones, para así evitar distintas velocidades de oxidación que ocurren en la muestra debido al mayor porcentaje de peróxido, lo que disminuye notablemente la posibilidad de detección de los radicales libres

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional, Departamento de Física, Laboratorio de EPR; a los Drs. Ovidio Almanza y Gustavo Jaimes por su asesoría científica, a la Dra. Claudia Hurtado por su asesoría Metodológica, a la Dra. Clara López de Mesa por su asesoría estadística a nuestros compañeros que tomaron las muestras, residentes de Periodoncia UNICOC, al médico veterinario Iván Restrepo por su colaboración.

REFERENCIAS

- 1) Quinta Escuela Nacional de Resonancia Paramagnética Electrónica. Valencia 17-21 Sep. 2007. Rojo T, Lezama L, Barandiarán J.M. Espectroscopía de Resonancia Paramagnética Electrónica.
- 2) Quinta Escuela Nacional de Resonancia Paramagnética Electrónica. Valencia 17-21 Sep. 2007. Alger RS. Electron Paramagnetic Resonance: Techniques and Applications, Wiley- Interscience.
- 3) Weil JA, Bolton JR, Wertz JE, in "Electron Paramagnetic Resonance: Elementary Theory and Practical Applications", ed. John Wiley & Sons, 1994.
- 4) Carrington A , Lachlan MC. Introduction to Magnetic Resonance with Applications to Chemistry and Chemical Physics. Chapman and Hall. London 1979.
- 5) Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy of Iron Complexes and Iron-Containing Proteins. Cammack R and Cooper ce en methods in enzymology Volume 227. Metallobiochemistry. Academic press inc. 1993
- 6) Kannan Subburaj. Free Radical Biology and Medicine. Theor Biol Med Model. Vol 36, No.9, p 1072-1086. 2004
- 7) Recent Developments In EPR Spin-Trapping. Davies MJ In Electron Paramagnetic Resonance. Vol.18. Ed Gilbert, Davies And Murphy. Royal Society Of Chemistry 2002.
- 8) Quinta Escuela Nacional de Resonancia Paramagnética Electrónica. Valencia 17-21 Sep. 2007. García I. Aplicaciones de RPE en sistemas Biológicos: Técnicas de Spin Labelin y spin Trapping.
- 9) Fearon J. Tooth whitening: concepts and controversies. Jlr Dent Assoc. 2007 Autumn;53(3):132-40. Review
- 10) Li Y. Review Tooth bleaching using peroxide-containing agents: current status of safety Tissues. Compend Contin Educ Dent. 1998
- 11) Dahl JE, Pallesen U. Review Tooth bleaching--a critical review of the biological aspects. Crit Rev. Oral Biol Med. 2003
- 12) Tredwin CJ, Naik S, Lewis NJ, Scully C. Hydrogen peroxide tooth-whitening (bleaching) products: review of adverse effects and safety issues.Br Dent J. 2006 Apr 8;200(7):371-6.
- 13) Naik, Supritha, Blanqueamiento Dental Con Peróxido De Hidrógeno: Revisión De La Seguridad Con Relacion A Posible Carcinogénesis. Oral Oncology Vol 42 p 668 – 674 2005
- 14) Mahony C, Felter SP, McMillan DA. An exposure-based risk assessment approach to confirm the safety of hydrogen peroxide for use in home tooth bleaching. Regul Toxicol Pharmacol. 2006 Mar;44(2):75-82. Epub 2005.
- 15) Naik S, Tredwin CJ, Scully C. Hydrogen peroxide tooth-whitening (bleaching): review of safety in relation to possible carcinogenesis. Oral Oncol. 2006 Aug;42(7):668-74. Epub 2006
- 16) Montero Maria. Los radicales libres y las defensas antioxidantes. Revisión anales de la facultad de medicina universidad nacional mayor de san marcos. vol. 57, nº4 p 120-125 1996.
- 17) Valko M, Rhodes CJ, b, Moncola, M. IZAKOVIC a, M. Mazura: Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer
- 18) Araki Daniel, Alencar ME .Study of DNA damage induced by dental bleaching agents in vitro. Estudio de danos no DNA induzidos por agentes clareadores dentais in vitro Braz Oral Res 2006;20(1):47-51
- 19) Carrasco LD, Guerisoli DM, Rocha MJ, Pécora JD, Fröner IC: Efficacy of intracoronal bleaching techniques with different light activation sources. Int Endod J. 2007 Mar; 40(3):204-8.
- 20) Dahl JE, Pallesen U. Tooth bleaching--a critical review of the biological aspects.Crit Rev Oral Biol Med. 2003;14(4):292-304.
- 21) Mendoza O, Plazas MC, Almanza O, Comportamiento de los radicales libres en la radiolisis de la Sangre por EPR. Revista Colombiana de Física, vol. 38, no. 1, 2006
- 22) Dubner, D.L.; Dávila, F.A.; Boveris, A.; Puntarulo, S.; Gisone, P.A. y Pérez, M. del R. Estudio preliminar de aplicación de la resonancia paramagnética electrónica a la dosimetría retrospectiva en esmalte dentario. Publicado como PI-28/98 de la Autoridad Regulatoria Nuclear

23) Céspedes M, Hernández I, Janer N. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: II. Catalasa. Rev Cubana Invest Bioméd 1996 Dic.

24) Protein Data Bank- PDB- en: <http://www.rcsb.org/pdb/results/results.do?outformat=>)

25) Imlay James, Pathways of oxidative damage- Annu. Rev. Microbiol. 2003. 57:395-418

26) Jones L, Peter W. Química: Moléculas, Materia y Cambio. 4 Ed. Cap 10.P. 205-216.