



Institución
Universitaria
COLEGIOS
de Colombia

UNICOOC

**EVALUACION DE LOS RADICALES LIBRES
PRESENTES EN TEJIDOS BIOLOGICOS
SOMETIDOS A ACLARADORES DENTALES
POR MEDIO DE RESONANCIA
PARAMAGNÈTICA ELECTRÒNICA**

INVESTIGADORES

Dr. Víctor Hugo Abella Martínez

Dra. Liliana Botina Guevara

Dra. Erica Martínez Pabón

Dra. Adelayda Pájaro Corredor

RESIDENTES DE POSTGRADO DE PROSTODONCIA
INSTITUCIÓN UNIVERSITARIA COLEGIOS DE COLOMBIA

ASESORES

ASESOR CIENTIFICO

Dr. Gustavo Jaimes Monroy, Od, Lic. Biol., MSC en Bioquímica, Candidato a Dr. en Ciencias

ASESOR CIENTIFICO

Dr. Ovidio Almanza, Doctor en Física , Profesor Asociado Universidad Nacional de Colombia

ASESOR METODOLOGICO

Dra. Claudia Hurtado
Especialista en Seguridad Social

ASESOR ESTADISTICO

Dra. Clara López de Mesa
Estadística

INTRODUCCION

Los aclaradores dentales utilizados en la práctica odontológica tienen como principio activo el peróxido de hidrógeno el cual varía en su concentración que va desde el 25 a 38% dependiendo la casa comercial.

El peróxido de hidrógeno es un agente de daño celular, por lo cual encontrar modelos que permitan identificar la presencia de radicales libres de diversa naturaleza, se convierte en una herramienta valiosa.

PROBLEMA

¿Es posible detectar y cuantificar radicales libres por medio de Resonancia Paramagnética Electrónica en tejidos biológicos que hayan sido sometidos a peróxido de hidrógeno?

JUSTIFICACION

El uso indiscriminado de los aclaradores dentales y sus técnicas pueden causar daños a los tejidos blandos de cavidad oral, por tal motivo es importante diseñar un modelo científico para detectar radicales libres en tejidos biológicos, generados por el peróxido de hidrógeno.

MARCO TEORICO

MARCO TEORICO

La Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR) es una de las técnicas espectroscópicas modernas utilizadas en el estudio de la estructura y propiedades de la materia.

La información que se obtiene mediante esta técnica es muy específica ya que se refiere únicamente al electrón desapareado y su entorno más próximo.

1. T. Rojo, L. Lezama y J.M. Barandiarán. Espectroscopía de Resonancia Paramagnética Electrónica. Servicio Editorial UPV/EHU, (Bilbao, 1997).
2. Alger, R. S. (1968) Electron Paramagnetic Resonance: Techniques and Applications, Wiley- Interscience.
3. J. A. Weil, J. R. Bolton, J. E. Wertz, in "Electron Paramagnetic Resonance: Elementary Theory and Practical Applications", ed. John Wiley & Sons, 1994.

MARCO TEORICO

Entre sus múltiples áreas de aplicación se pueden destacar: Geocronología, Reacciones Poliméricas, Fotosíntesis y Radicales en tejidos vivos.



MARCO TEORICO

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.

MARCO TEORICO

La vida media de los radicales es muy transitoria para poder ser detectados por EPR en onda continua.

Existe La técnica de trampas de espín consistente en la adición a la muestra de compuestos orgánicos (aminas y compuestos nitrosos), estos reaccionan con los radicales que se quieren estudiar y dan productos que son más fácil de detectar por EPR debido a su más larga vida.



MARCO TEORICO

Los Aclaradores dentales tienen como principio activo



Oxidación

Produciendo el rompimiento de las moléculas oscuras por el oxígeno liberado de los aclaramiento.

Peróxido de hidrógeno

Reacciona

Genera especies reactivas de oxígeno:
Superóxidos
Iones hidroxilos
alcosilos

OBJETIVO

OBJETIVO GENERAL

Determinar la posible presencia de radicales libres en: paladar de humano, sangre humana y paladar de conejo, cuando ellos interactúan con productos comerciales de aclaramiento dental que contienen peróxido de hidrógeno en diversas concentraciones.

METODOLOGIA

METODOLOGIA

ESTUDIO EXPERIMENTAL EXPLORATORIO IN VITRO

METODOLOGÍA

Población de estudio

Integrantes de la investigación
Conejo raza Checkered Giant.

Unidad de análisis

Muestras de Tejido de paladar de humano
Muestras de sangre total
Muestras de paladar de conejo

CRITERIOS DE SELECCION

IMPLICACIONES ETICAS

Según la resolución 8430 de 1993 del ministerio de salud la investigación es de riesgo mayor del mínimo y fue aprobada por el comité de ética institucional

CRITERIOS DE INCLUSION

Previa firma de consentimiento informado.

- Hombres y mujeres entre 20 a 35 años
- Higiene oral adecuada.

La selección del conejo

- Peso de 6kg, raza Checkered Giant,
- Macho, de 8 meses de edad
- Sano

CRITERIOS DE EXCLUSION

- Sujetos con patologías orales
- Sometidos a aclaramiento dental
- Comprometidos sistémicamente
- Con alergia a alguno de los componentes a utilizar durante el procedimiento quirúrgico.

MUESTREO Y MUESTRA

MUESTREO:

- Por conveniencia.

MUESTRA:

Total 18 muestras

- 12 muestras de tejido de paladar duro de los cuatro investigadores .
- 3 muestra de sangre
- 3 muestras de tejido de paladar de conejo

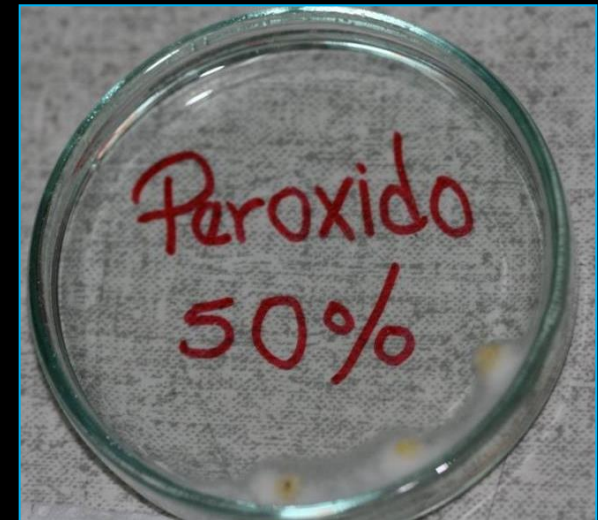
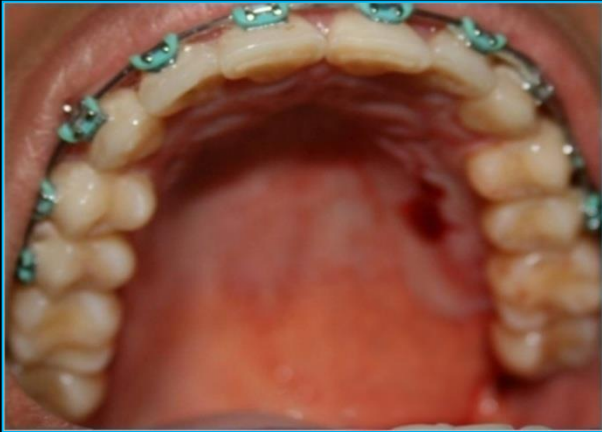
INSTRUMENTO DE RECOLECCION DE DATOS

Bloques	Muestras	Procedencia	Peróxido de hidrógeno Concentración	Tipo de Muestra	Resultados Intensidad
1	1 2 3	Paladar humano			
2	1 2 3	Paladar humano			
3	1 2 3	Paladar humano			
4	1 2 3	Paladar humano			
5	1 2 3	Sangre humana			
6	1 2 3	Paladar animal			

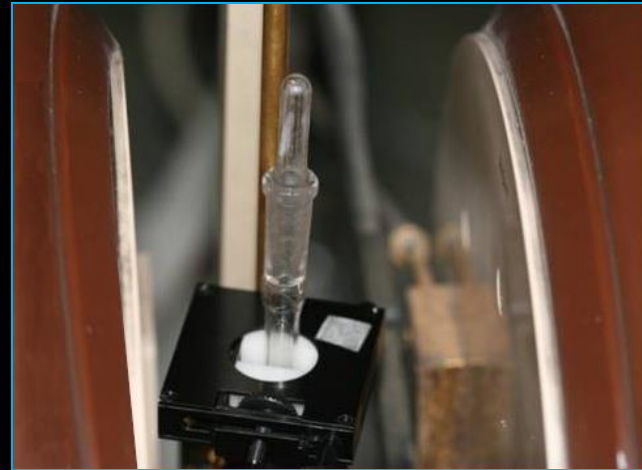
Total muestras n= 18

PROCEDIMIENTO

MUESTRAS DE PALADAR DE HUMANO



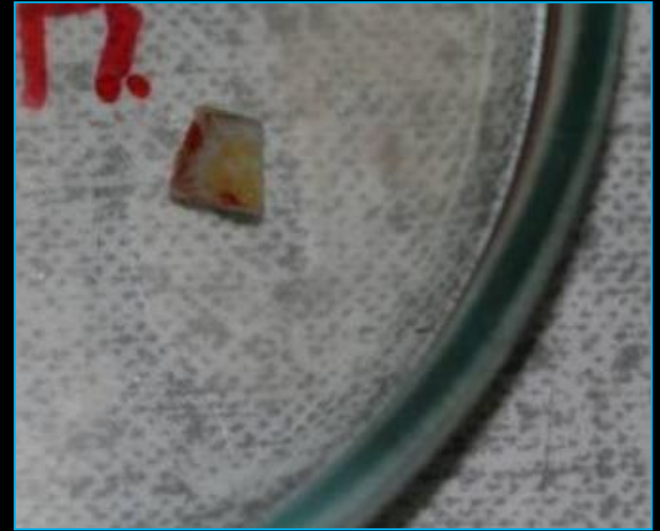
MUESTRA DE SANGRE



MUESTRA DE PALADAR DE CONEJO



MUESTRA DE PALADAR DE CONEJO



Muestras de 35 y 38%
Se siguió igual
Procedimiento en
diferentes zonas



Los ensayos por EPR realizados en los bloques 1,2,3,4,6 fueron llevados a cabo a temperatura de 250 K.

Con una frecuencia de microondas de 9.43 Ghz, potencia de microondas de 10 mW y frecuencia de modulación de 100 Khz.



ANALISIS ESTADISTICO

- Los resultados describen el experimento de las 18 muestras, distribuidos en 6 bloques según concentraciones de peróxido de hidrogeno y procedencia 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

Tabla 1. Descripción de resultados de muestras de tejidos blandos y sangre según concentraciones de Peróxido de hidrógeno mediante Resonancia paramagnética electrónica

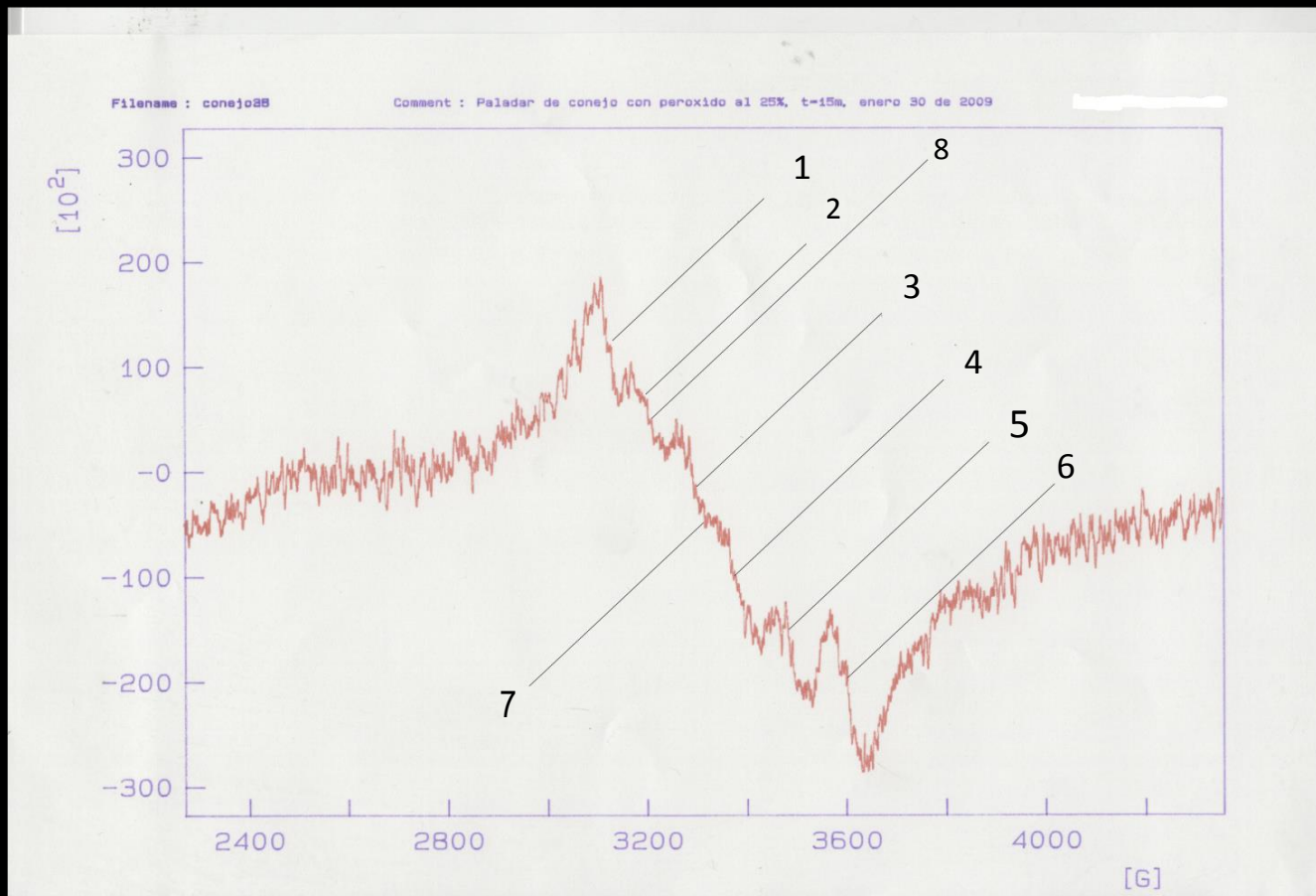
Bloques	Muestras	Procedencia	Peróxido de hidrógeno Concentración	Tipo muestra	Resultados Intensidad
1	1 2 3	Paladar humano	0%	Control negativo	Sin señal
2	1 2 3	Paladar humano	50%		Sin señal
3	1 2 3	Paladar humano	50%		Sin señal
4	1 2 3	Paladar humano	50%		Sin señal
5	1 2 3	Sangre humana	0% PBN + sangre 50% + PBN 50% + PBN + sangre	Control negativo Control negativo Control positivo	Sin señal Sin señal Sin señal
6	1 2 3	Paladar animal	25% 35% 38%	Experimental	Alta* Baja Baja

Total muestras n= 18

* •Ancho pico a pico (gaus)= 51.1
•Constante hiperfina = 92
•Valor g central= 2.08

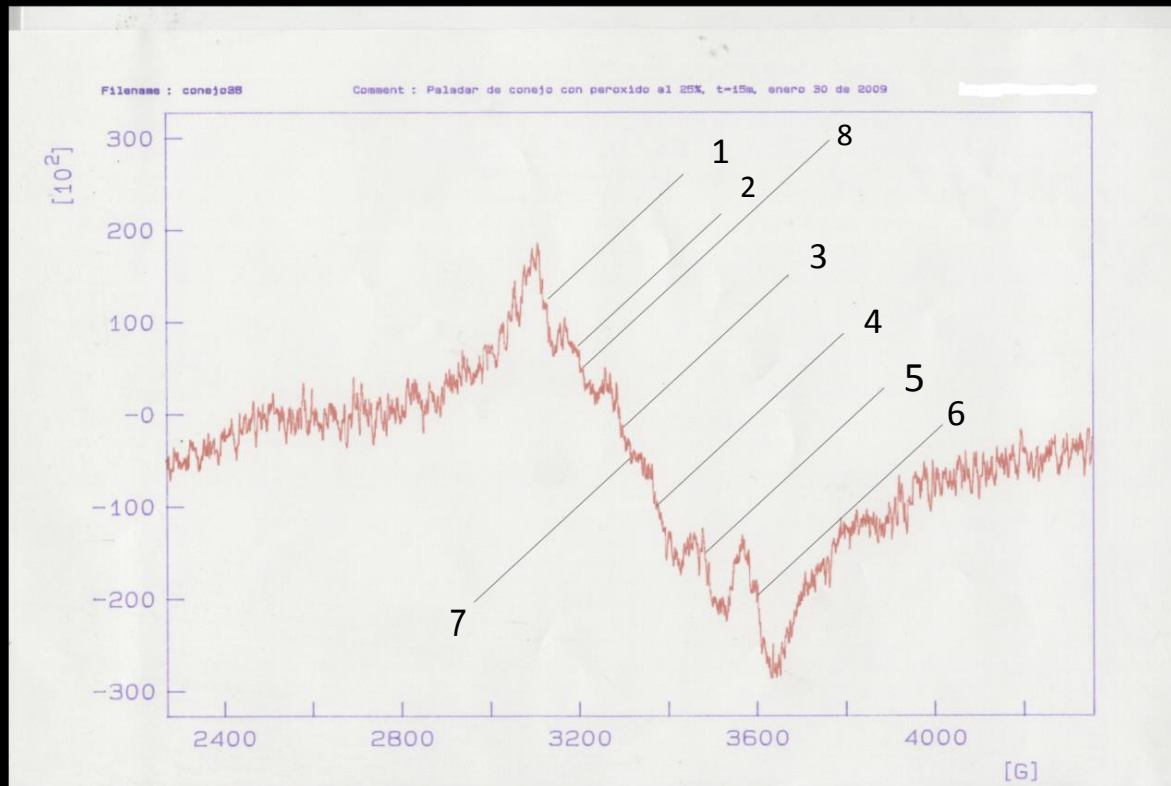
RESULTADOS

Espectro de EPR obtenido en muestra de paladar de conejo, tratada con peróxido de hidrógeno al **25%**.



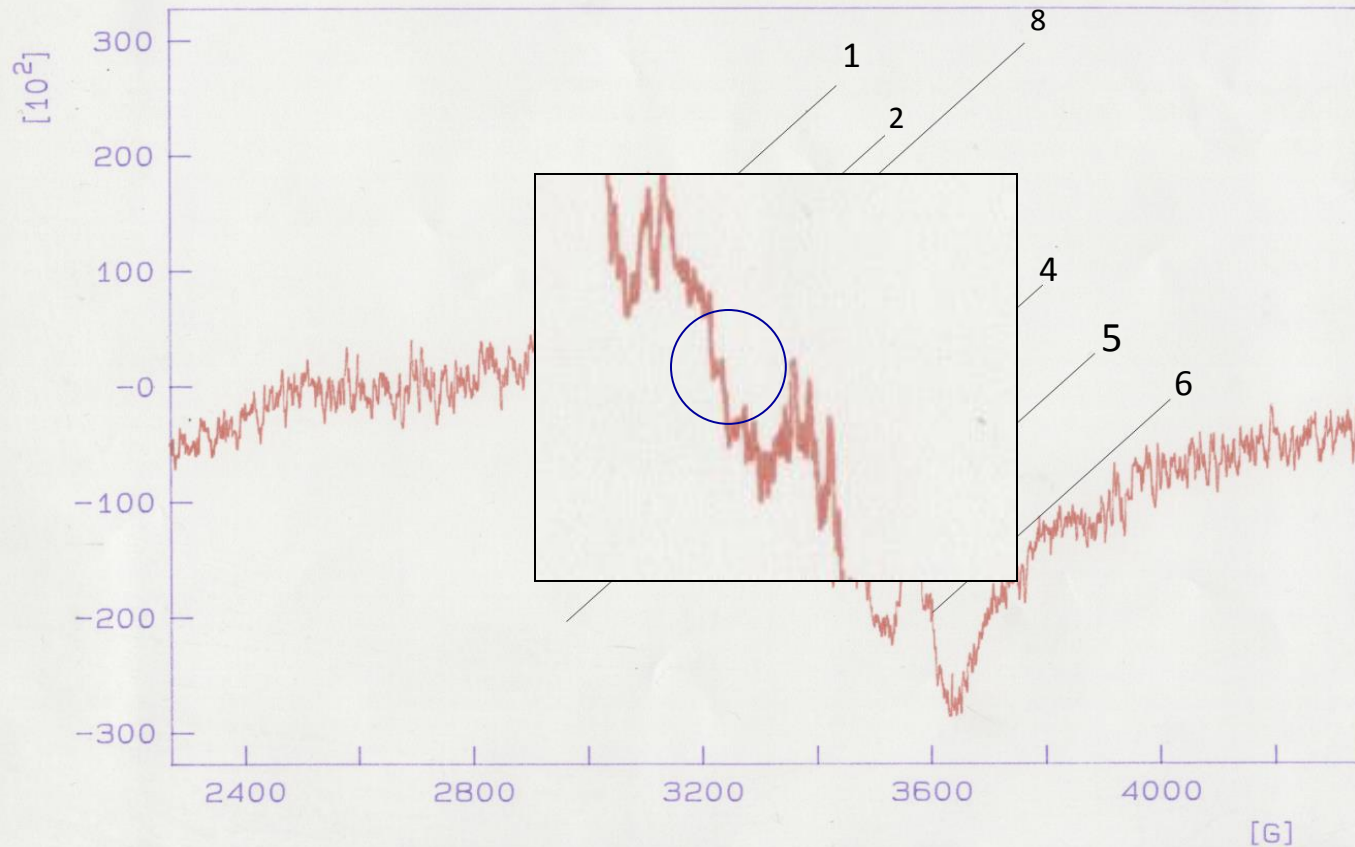
RESULTADOS

- El espectro de EPR proveniente del Mn^{2+} está constituido por seis señales y de los cuales los valores de ancho pico a pico, constante de separación hiperfina y valor g están dados en la tabla .



Filename : conejo28

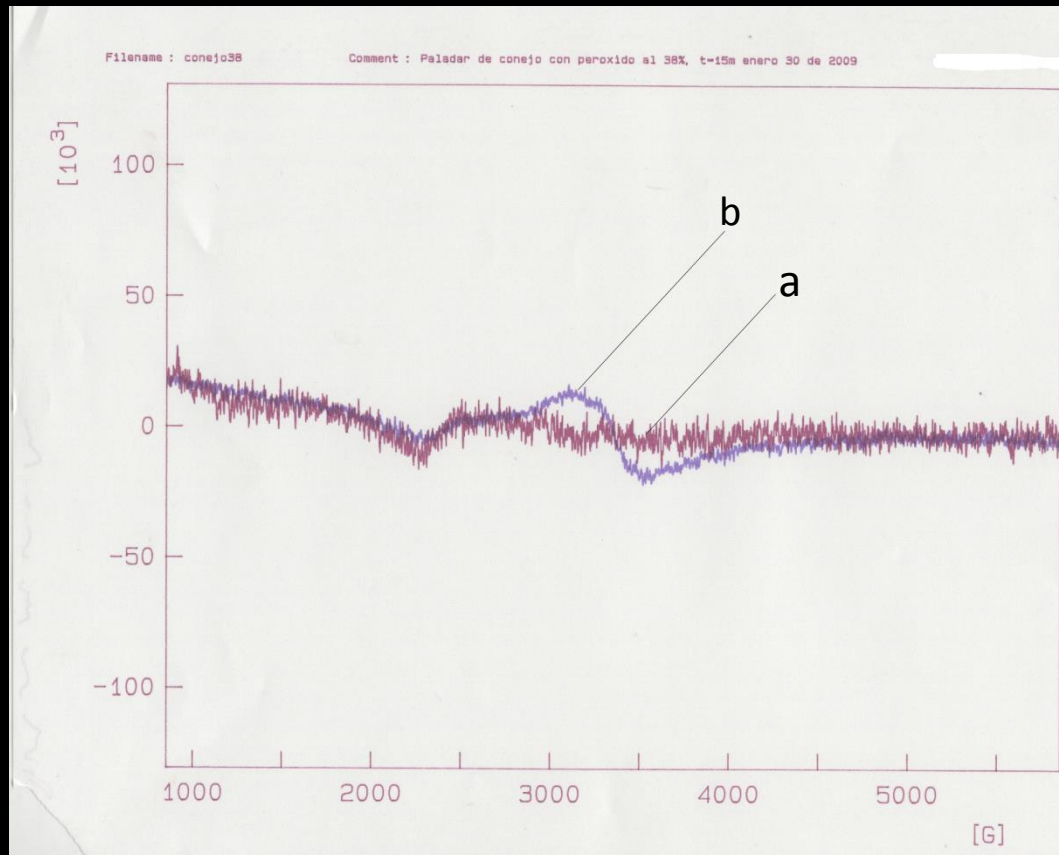
Comment : Paladar de conejo con peroxido al 25%, t=15m, enero 30 de 2009



Ancho pico a pico medio de las señales (Gauss)	Constante hiperfina (Gauss)	Valor g Central
51.127	92.958	2.08

RESULTADOS

Los espectros de EPR obtenidos en muestras de paladar de conejo tratadas con peróxido de hidrógeno al 35% (a) y 38 % (b) respectivamente.



DISCUSION

- Factores a tener en cuenta en la obtención de resultados

Momento de Aplicación de H₂O₂

Actividad catalasa

Concentración de H₂O₂

DISCUSION

MUESTRAS DONDE NO SE OBTUVO SEÑAL



Aplicación de peróxido después de extraída la muestra



Lo que disminuye la posibilidad de reacción entre el peróxido de hidrógeno y la muestra por "muerte celular"

DISCUSION

ACTIVIDAD CATALASA



Detoxifica las células del peróxido de hidrógeno producido en su metabolismo



Descompone dicho peróxido en agua y oxígeno molecular

DISCUSION

CONCENTRACION

La señal de la muestra sometida a 25% es mayor que las de la muestra tratada al 35 y 38%

Esto puede deberse a distintas velocidades de oxidación que ocurren en la muestra por el mayor porcentaje de peróxido, lo cual disminuye notablemente la posibilidad de detección de los radicales libres.



CONCLUSIONES

1. La técnica de Resonancia Paramagnética Electrónica es altamente sensible para la determinación de radicales libres.
2. Se forman radicales libres en muestra de paladar cuando estos entran en contacto con aclaradores dentales como el peróxido de hidrógeno, usado en este trabajo

CONCLUSIONES

3. Se forman pequeños clusters de óxidos de hierro debido al contacto del peróxido de hidrógeno con el hierro presente en la hemoglobina de la sangre o de la interacción con el Fe III de la catalasa.
4. En nuestro estudio además jugó un papel importante la concentración del peróxido de hidrogeno

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.

RECOMENDACIONES

- Siempre que se quiera realizar mediciones con peróxido de hidrogeno, 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 y Química, 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, a nuestros compañeros que tomaron las muestras residentes de Periodoncia UNICOC y al médico veterinario Iván Restrepo por su colaboración.

**MUCHAS
GRACIAS**