

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

INVESTIGADORAS

Víctor Hugo Abella Martínez

Elva Liliana Botina Guevara

Erica Cristina Martínez Pabón

Adelaida Margarita Pajaro Corredor

INSTITUCIÓN UNIVERSITARIA COLEGIOS DE COLOMBIA

ÁREA DE EDUCACIÓN AVANZADA Y CONTINUADA

POSTGRADO DE PROSTODONCIA

BOGOTÁ, D.C. 2009

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

INVESTIGADORAS

**Víctor Hugo Abella Martínez
Elva Liliana Botina Guevara
Erica Cristina Martínez Pabón
Adelaida Margarita Pájaro Corredor**

ASESORES CIENTÍCOS

**Dr. Gustavo Jaimes
Od. Lic en Biología,MSD en Bioquímica
Candidato a Dr en Ciencias**

**Dr. Ovidio Almanza
Doctor en Física**

ASESORA METODOLOGICO

**Dra. Pilar Malaver Calderón
Od. Ms. Biología Énfasis Genética Humana**

ASESORA ESTADISTICA

**Clara López de Mesa
Estadística**

INSTITUCIÓN UNIVERSITARIA COLEGIOS DE COLOMBIA

ÁREA DE EDUCACIÓN AVANZADA Y CONTINUADA

POSTGRADO DE PROSTODONCIA

BOGOTÁ, D.C. 2009

TABLA DE CONTENIDO

	PÁGINA
1.ASPECTOS TEÓRICOS CIENTÍFICOS	9
1.1 PROBLEMA	9
1.2JUSTIFICACION	9
1.3 PRÓPOSITO	9
1.4 MARCO TEÓRICO	10
1.5.OBJETIVOS	17
1.5.1.Objetivos Generales	17
2. ASPECTOS METODOLÓGICOS	17
2.1.TIPO DE ESTUDIO	18
2.2.POBLACION DE ESTUDIO	18
2.3. UNIDAD DE ANALISIS	18
2.5.CRITERIOS DE SELECCIÓN	18
2.5.1.Criterios de Inclusión	18
2.5.2Criterios de Exclusión	19
2.6.MUESTREO	19
2.7.MUESTRA	19
2.8.VARIABLES	19
2.9 PROCEDIMIENTO	19
2.9.1 TOMA DE MUESTRAS QUIRURGICAS DE PALADAR DE HUMANO	19
2.9.2 TOMA DE MUESTRAS DE SANGRE TOTAL	20
2.9.3.TOMA DE MUESTRAS QUIRÚRGICAS DE PALADAR DE CONEJO	21
2.10.ANALISIS ESTADÍSTICO	22
3.RESULTADOS	22
4. DISCUSIONES	25
5. CONCLUSIONES	27
6. RECOMENDACIONES	27
7. AGRADECIMIENTOS	28
8.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

1. ASPECTOS TEÓRICOS CIENTÍFICOS

1.1 PROBLEMA

Los aclaramientos dentales de uso odontológico tienen como principio activo el peróxido de hidrógeno, el cual cuando entra en contacto con el organismo en altas concentraciones puede generar liberación de radicales libres. Este peróxido de hidrogeno es un agente de daño celular, por ello consideramos que encontrar modelos que permitan identificar la presencia de estos radicales libres de diversa naturaleza, se convierte en una herramienta valiosa para tener en cuenta de manera previa diversos productos que podrían ocasionar daño en la cavidad oral sin que el odontólogo se percate de ello.

1.2 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.

1.3 PRÓPOSITO

Detectar y cuantificar radicales libres por medio de resonancia paramagnética electrónica en tejidos biológicos que han sido sometidos a peróxido de hidrógeno

1.4 MARCO TEÓRICO

El inicio de la resonancia paramagnética electrónica (RPE) se considera a partir del experimento del ruso Zavoisky quien en 1945 detectó una línea de absorción en una muestra de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Observó resonancia a un campo magnético de 4.76 mT para una frecuencia de 133 MHz. Los experimentos de Zavoisky fueron interpretados por Frenkel como una absorción de resonancia paramagnética. Posteriores a mas altas frecuencias (microondas) en campos magnéticos de 100-300 mT mostraron las ventajas de la utilización de altas frecuencias y campos. Las principales contribuciones en la interpretación de los espectros de EPR fueron realizadas por algunos teóricos entre los que podemos destacar a Abragam, Bleany, Pryce y Van Vleck.(1)

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 (RMN) más conocida por sus aplicaciones médicas. Es preciso tener en cuenta que, existen dos importantes diferencias entre un espectrómetro de EPR y uno de RMN. En primer lugar, la fuente de energía que en RMN realiza barridos en la zona de radiofrecuencias (106-109 Hz), en RPE emite en la zona de microondas (109-1011 Hz, banda X) pero, en este caso, emite radiación monocromática a frecuencia constante. En segundo lugar, mientras que en RMN el campo magnético externo permanece constante, en EPR es necesario barrer el espectro variando linealmente el campo magnético externo. Estas diferencias hacen que el mecanismo de

funcionamiento de un espectrómetro de EPR sea en la práctica muy diferente al de su homólogo de RMN. Además, la detección directa de una señal de absorción sólo es posible en muestras que contienen una alta concentración de electrones desapareados; en caso contrario, el ruido que acompaña a la señal hace muy difícil su detección. Para evitar este problema se precisa un modulador de campo, lo que supone un aumento de los parámetros a tener en cuenta a la hora de registrar un espectro. Es preciso tener en cuenta que la información que vamos a poder deducir de un espectro de EPR puede depender enormemente de factores instrumentales y experimentales, que es preciso conocer para optimizar el rendimiento de la técnica. (2-4)

Uno de estos factores experimentales es la preparación de muestras. Las muestras biológicas para EPR presentan algunas características especiales debido a su naturaleza, consiste en colocar la muestra de material biológico 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. (2)

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) (2)

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 físico-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. (1,5)

En principio, la posesión de un momento neto de espín electrónico es la única condición necesaria (y suficiente) que debe cumplir un material para poder ser estudiado por EPR. Son numerosos los sistemas que satisfacen esta condición: Radicales libres, en estado sólido, líquido o gaseoso, tierras raras, defectos en los cristales iónicos, electrones de conducción en los semiconductores y biradicales. (1,6)

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)

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 . (7)

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. (8)

Así mismo, los radicales libres también pueden formarse cuando un enlace covalente se rompe y cada electrón de la pareja compartida permanece en un átomo, tienen por lo tanto, un periodo de vida corto que se puede medir incluso en fracciones de microsegundo y su concentración en el estado estacionario es baja, esto dificulta poder su detección por EPR en onda continua. Existe 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. (8,9)

Cuando un radical libre reacciona con un compuesto no radical pueden formarse otros radicales libres, de manera que se formen reacciones en cadena y den lugar a efectos biológicos lejos del sistema que originó el primer radical. La mayoría de los radicales libres de interés biológico suelen ser extremadamente reactivos e inestables. Las proteínas, los lípidos insaturados, los ácidos nucleicos y los carbohidratos son los blancos fundamentales de las reacciones de los radicales libres. (10)

El radical hidroxilo (OH), considerado uno de los más agresivos, actúa sobre todo tipo de biomoléculas, en los lípidos, 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. Este radical hidroxilo es liberado cuando el peróxido de hidrogeno reacciona y genera especies reactivas de oxígeno. (11)

El peróxido de hidrógeno es un compuesto peligroso para las células porque es un potente oxidante que atraviesa fácilmente las membranas biológicas. La reducción del oxígeno molecular por tres electrones da lugar al citado radical hidroxilo, presenta una vida media y un radio de acción muy cortos (microsegundos y angstroms, respectivamente).

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. (12,13)

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. (14,15)

1.4.1 ACLARADORES DENTALES

En la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento de tipo no invasivo para recuperar la apariencia de dientes pigmentados, se ha utilizado diferentes técnicas y materiales para devolver el color natural a los dientes o mejorar su apariencia. Se han manejado diferentes compuestos químicos con este fin, pero los agentes de mayor uso como aclaradores dentales están compuestos por peróxido de hidrógeno en diferentes concentraciones.

El peróxido de hidrógeno pese a su alta citotoxicidad, aparentemente no afecta directamente las células del sistema inmune, debido a mecanismos de control disponible en las células sanas que involucran la descomposición del peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua por la acción de enzimas como súper óxido dismutasa, la catalasa y el glutamato peroxidasa, las vitaminas como el tocoferol, los carotenos y el ácido ascórbico. (13,14)

Los resultados de los agentes aclaradores dependen en gran medida de la etiología de la pigmentación. Las causas son diversas y pueden estar asociadas a necrosis pulpar, contaminación pulpar durante el proceso

endodóntico, hemorragia pulpar, materiales restaurativos, administración de antibióticos, tabaquismo y alimentación. Las pigmentaciones pueden ser tipo extrínseco cuando se forman en la superficie del esmalte y son producidas por la saliva, alimentos o bebidas como el té, café y/o vino tinto; y de tipo intrínseco cuando se presenta en esmalte y dentina y se deben a problemas sistémicos o congénitos como fluorosis, tetraciclinas, hemorragia por trauma y materiales de obturación como amalgama, eugenolato y conos de gutapercha (15,16).

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, la acción del oxígeno es sobre estas moléculas, transformándolas en moléculas pequeñas y simples. Por tal acción el diente refleja la luz generando una percepción óptica de una superficie más clara. (13)

La incidencia de aparición de efectos adversos durante la aplicación de agentes aclaradores dentales con base en peróxido de hidrógeno, trascienden a una irritación gingival localizada y sensibilidad dental. Estas condiciones se resuelven después de varios días de no usar el agente aclarador. La producción de inflamación gingival no se ha reportado como factor que pueda desencadenar cáncer oral. Además no es usual la aparición de cáncer en tejido gingival (17)

Clínicamente, no se han reportado con frecuencia problemas en los tejidos blandos, sin embargo, puede existir una irritación de la encía o mucosa durante

la fase inicial del tratamiento. Histológicamente, varios autores como Hoffman, Meneghini y Tenovuo, Larjava (1.984), reportaron que los fibroblastos gingivales son afectados por el peróxido de hidrógeno. Igualmente Tipton y colaboradores (1.995), refieren que el peróxido de carbamida también es citotóxico para los fibroblastos gingivales, produciendo así efectos significativos en la viabilidad y morfología celular y en la proliferación y producción de fibronectina y colágeno, los cuales fueron significativamente reducidos.(18)

En nuestro estudio queremos resaltar la importancia de diseñar un modelo científico para detectar radicales libres en tejidos biológicos, generados por el peróxido de hidrógeno, debido al uso indiscriminado de los aclaradores dentales que pueden causar daños a los tejidos blandos de cavidad oral.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la posible presencia de radicales libres en tres modelos de tejidos biológicos: paladar de humano, sangre humana y paladar de conejo, luego de ser expuestos a una sustancia blanqueadora: peróxido de hidrogeno a diferentes concentraciones.

2. ASPECTOS METODOLÓGICOS

2.1 TIPO DE ESTUDIO

Estudio Experimental Exploratorio In Vitro

2.2 POBLACION DE ESTUDIO

Integrantes de la investigación y conejo raza Checkered Giant.

2.3 UNIDAD DE ANÁLISIS

Muestras de tejido de paladar de humano

Muestras de sangre total

Muestras de paladar de conejo

2.5 CRITERIOS DE SELECCIÓN

2.5.1 Criterios de Inclusión

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.

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.

2.5.2 Criterios de Exclusión

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.

2.6 MUESTREO

Por Conveniencia

2.7 MUESTRA

12 muestras de paladar de humano

3 muestras de sangre total

3 muestras de paladar de conejo

2.8 VARIABLES

1. Procedencia de la muestra
2. Concentración del peróxido de hidrógeno
3. Intensidad de la señal

2.9 PROCEDIMIENTO

2.9.1 TOMA DE MUESTRAS QUIRURGICAS PALADAR DE HUMANO

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 con 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. 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.

El mismo procedimiento se siguió para las otras muestras. 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.

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

Como control positivo se tomaron las 9 muestras restantes, las cuales fueron sometidas a peróxido de hidrogeno al 50% durante 15 minutos. Se secaron con gasa estéril y fueron llevadas una a una al equipo de EPR para su lectura.

2.9.2 TOMA DE MUESTRA DE SANGRE TOTAL

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 hidrogeno al 50% por medio de una pipeta y se llevó a la celda para liquido para su lectura en el equipo de EPR.

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.

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.

2.9.3 TOMA DE MUESTRAS QUIRURGICAS PALADAR DE CONEJO

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.

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.

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.

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.

2.10 ANALISIS ESTADISTICO

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.

3. 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 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	

Tabla 1 resultados de muestras de tejidos blandos y sangre total

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 1).

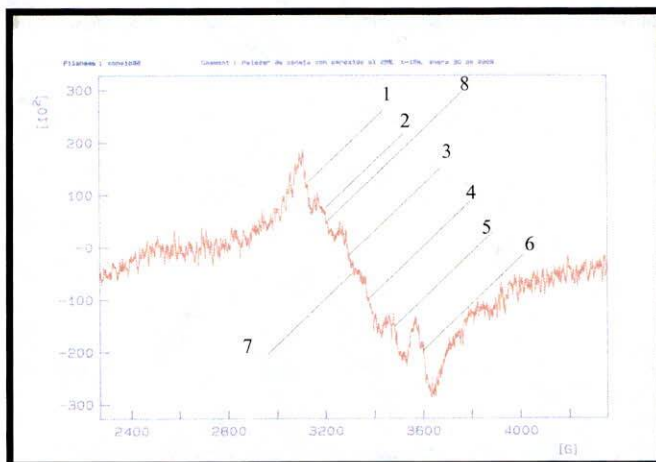


Figura 1. El espectro de EPR proveniente del Mn^{2+} está constituido por seis señales, de los cuales las señales están marcadas en la Figura 13 con valores numéricos del 1 al 6.

En la Figura 2, 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%.

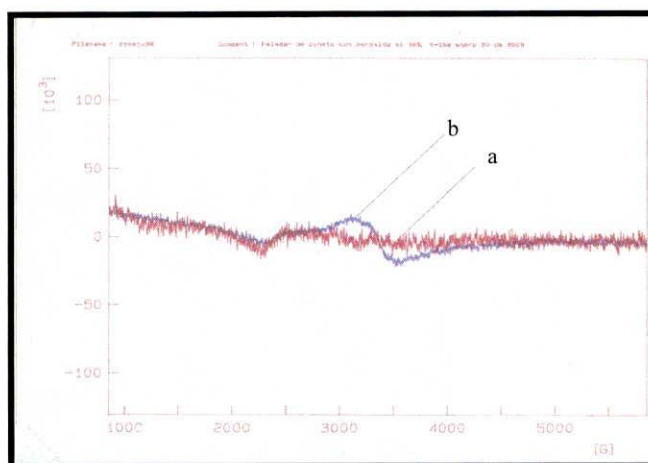


Figura 2. Espectro obtenido de muestras de paladar de conejo sometidas a peróxido de hidrógeno al 35 y 38 %

4. DISCUSION

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 hidrogeno 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 hidrogeno producido en su metabolismo, al descomponer dicho peróxido en agua y oxigeno 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 si solo tiene un poder catalítico sobre peróxido de hidrógeno cuando actúa sobre él. (19)

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 hidrogeno al 25, 35,38%.

Así, el primer problema a resolver es la concentración del peróxido de hidrogeno 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%.
(20)

5. 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 hidrogeno y los tiempos entre la obtención de la muestra y la lectura del espectro.

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.

6. 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 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.

7. 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 medico veterinario Iván Restrepo por su colaboración.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

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. García I. Aplicaciones de RPE en sistemas Biológicos: Técnicas de Spin Labelin y spin Trapping.
3. Quinta Escuela Nacional de Resonancia Paramagnética Electrónica. Valencia 17-21 Sep. 2007. Vidal J. Aspectos Experimentales de la Resonancia Paramagnética Electrónica.
4. Carrington A , Lachlan MC. Introduction to Magnetic Resonance with Applications to Chemistry and Chemical Physics. Chapman and Hall. London 1979.
5. Quinta Escuela Nacional de Resonancia Paramagnética Electrónica. Valencia 17-21 Sep. 2007. Alger RS. Electron Paramagnetic Resonance: Techniques and Applications, Wiley- Interscience.
6. Weil JA, Bolton JR, Wertz JE, in "Electron Paramagnetic Resonance: Elementary Theory and Practical Applications", ed. John Wiley & Sons, 1994.
7. Cammack R, Cooper CE Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy of Iron Complexes and Iron-Containing Proteins. en methods in enzymology Vol 227. Metallobiochemistry. Academic press inc. 1993
8. Kannan Subburaj. Free Radical Biology and Medicine. Theor Biolg Med Model. Vol 36, No.9, p 1072-1086. 2004

9. Davies MJ. Recent Developments In EPR Spin-Trapping in Electron Paramagnetic Resonance. Vol.18. Ed Gilbert, Davies And Murphy. Royal Society Of Chemistry 2002.
10. Martínez Cayuela M. Toxicidad de xenobióticos mediada por radicales libres de oxígeno, Xenobiotic toxicity mediated by oxygen free radicals. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Polígono Universitario de Cartuja, s/n. Universidad de Granada. España.
11. Montero María. los radicales libres y las defensas antioxidantes. Revisión anual de la facultad de medicina Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vol 57, N°4 p 120-125 1996.
12. Gallego Gabriel, Zuloaga Oliver .Combinación de tres técnicas de Blanqueamiento en dientes no vitales. Reporte de un caso .Revista CES Odontología Vol. 19 - No. 2 2006.
13. García T, Bárbara E, García JC, Saldana A. La peroxidación lipídica en la etiopatogenia de la enfermedad periodontal inflamatoria. *Rev Cubana Estomatol*, ene.-abr. Vol.35, no.1, p.25-29. 1998.
14. Araki D, Alencar ME .Study of DNA damage induced by dental bleaching agents in vitro. Estudo de danos no DNA induzidos por agentes clareadores dentais in vitro. *Brazil Oral Res*, Vol 20 (1): 47-51 2006.
15. Carrasco LD, Guerisoli DM, Rocha MJ, Pécora JD, Froner IC. Efficacy of intracoronal bleaching techniques with different light activation sources. *Int Endod J*. Mar. Vol 40 (3): 204-8. 2007.
16. Dahl JE, Pallesen U. Tooth bleaching--a critical review of the biological aspects. *Crit Rev Oral Biol Med*. Vol 14 (4): 292-304. 2003.

17. Munro IC, Williams GM, Heymann HO, Kroes R. Tooth whitening products and the risk of oral cancer. *Food Chem Toxicol.* 2006 Mar. Vol 44 (3): 301-15. Sep 2005.
18. Lozada O. Garcia C. Riesgos y Beneficios del Blanqueamiento Dental. *Acta odontológica de Venezuela.* Vol 38 No1 p 14-17 enero 2000.
19. James I, Pathways of oxidative damage *Annu. Rev. Microbiol.* Vol 57 (3) :395-418 2003.
20. Jones L, Peter W. *Química: Moléculas, Materia y Cambio.* 4 Ed. Cap 10.P. 205-216.