



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**EFFECTO DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO SOBRE LA ACTIVACIÓN DE LA
APOPTOSIS DEPENDIENTE DE LA MITOCONDRIA EN FIBROBLASTOS
GINGIVALES HUMANOS.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

CIRUJANO DENTISTA

P R E S E N T A:

JUAN ANTONIO ARREGUIN CANO

TUTORA: DRA. GLORIA GUTIÉRREZ VENEGAS.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos:

A la Doctora Gloria Gutiérrez Venegas por la gran ayuda que me ha brindado y conocimiento que día a día ha compartido conmigo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por el soporte institucional que he tenido para culminar mi carrera.

Dedicatorias

A Dios que me diste la oportunidad de vivir, de regalarme una familia muy buena y cuidarme para terminar uno de mis objetivos.

A mi papa Juan Arreguin Cortez por su confianza y dedicación que me ha brindado para terminar mi carrera.

A mi mama Leticia Miroslava Cano Mercado por su dedicación y paciencia que me a dado a lo largo de mi vida

A mi hermano Luis David Arreguin Cano por ayudarme a terminar mi carrera

A Grissel por todo el amor que me ha dado, por ayudarme con mis problemas, por la pasión que me da y por ser mi compañera de la vida.

Y a todas esas personas que en un momento de la realización de mi tesis me ayudaron.

INDICE

| | | |
|---------|--|----|
| 1 | Planteamiento del problema..... | 8 |
| 2 | Justificación del estudio | 8 |
| 3 | Introducción..... | 9 |
| 4 | Antecedentes..... | 9 |
| 5 | Periodonto..... | 10 |
| 5.1 | Encía..... | 10 |
| 5.1.1 | Encía marginal..... | 10 |
| 5.1.2 | Encía insertada o adherida..... | 11 |
| 5.1.3 | Encía Interdentaria..... | 12 |
| 5.1.4 | Tejido conectivo | 15 |
| 5.1.4.1 | Células..... | 15 |
| 5.1.4.2 | Fibras..... | 17 |
| 5.1.4.3 | Matriz..... | 19 |
| 5.2 | Ligamento periodontal..... | 20 |
| 5.2.1 | Ubicación de las fibras..... | 21 |
| 5.2.2 | Función del ligamento periodontal..... | 22 |
| 5.3 | Cemento..... | 23 |
| 5.3.1 | Componentes estructurales..... | 24 |
| 5.4 | Hueso alveolar..... | 25 |
| 6 | Blanqueadores dentales. peróxido de hidrógeno..... | 27 |
| 6.1 | Introducción..... | 27 |
| 6.2 | Historia | 27 |
| 6.3 | Etiología de las tinciones dentales..... | 29 |
| 6.3.1 | Tinciones extrínsecas..... | 30 |
| 6.3.2 | Tinciones intrínsecas..... | 30 |
| 6.3.2.1 | Tinciones por tetraciclina..... | 30 |
| 6.3.2.2 | Tinciones por minociclina..... | 32 |
| 6.3.2.3 | Tinciones por flúor..... | 32 |
| 6.3.2.4 | Tinciones intrínsecas post-eruptivas..... | 33 |
| 6.3.2.5 | Tinciones por la edad..... | 33 |
| 6.4 | Estructura del peróxido de hidrógeno | 34 |
| 6.5 | Estructura del peróxido de carbamida..... | 35 |
| 6.6 | Efectos histológicos del blanqueamiento dental..... | 36 |
| 7 | Apoptosis..... | 36 |
| 7.1 | Creación de radicales libres..... | 37 |
| 7.2 | Mecanismos apoptoticos..... | 38 |
| 7.2.1 | Vía extrínseca..... | 41 |
| 7.2.1 | Vía intrínseca..... | 42 |
| 7.3 | Función de la apoptosis..... | 43 |
| 7.3.1 | Procesos apoptoticos..... | 44 |
| 7.3.2 | Homeostasis..... | 44 |
| 7.3.3 | Regulación del sistema inmunitario..... | 45 |
| 7.4 | Patologías vinculadas con la apoptosis..... | 45 |
| 7.4.1 | Patologías asociadas a la inhibición de apoptosis..... | 46 |

| | | |
|--------|---|----|
| 7.4.1 | Patologías asociadas al aumento de apoptosis..... | 46 |
| 8 | Objetivo general..... | 47 |
| 9 | Objetivo específico..... | 47 |
| 10 | Hipótesis verdadera..... | 47 |
| 11 | Hipótesis falsa..... | 47 |
| 12 | Tipo de estudio..... | 47 |
| 13 | Material y métodos..... | 47 |
| 13.1 | Métodos..... | 47 |
| 13.1.1 | Ensayo de western blot..... | 47 |
| 13.1.2 | Ensayo de viabilidad celular | 48 |
| 13.2 | Materiales..... | 48 |
| 13.2.1 | Selección y tamaño de la muestra..... | 49 |
| 13.2.2 | Cultivo celular de encía..... | 49 |
| 14 | Reactivos..... | 50 |
| 15 | Análisis de datos y métodos estadísticos..... | 50 |
| 16 | Resultados | 51 |
| 17 | Discusión..... | 57 |
| 18 | Bibliografía..... | 59 |

ABREVIATURAS

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno.

HGF: Fibroblasto gingival humano.

NO: Óxido nítrico.

PI3-K: Fosfatidil Inositol 3 cinasa.

NFκ-B: Factor de transcripción nuclear kappa B.

TNF: Factor de necrosis tumoral.

IRAK: Cinasa asociada al receptor de interleucina-1.

TAK1: Cinasa activadora del factor de crecimiento transformante β-1.

Bcl-2: linfoma de células B-2.

Bim: Proteína apoptótica.

Bax: Proteína apoptótica.

Apaf-1: Apoptosis proteasa- activador de factor-1.

Bid: Proteína apoptótica.

Caspasa 3: Cisteinil aspartato proteasa 3.

Caspasa 7: Cisteinil aspartato proteasa 7.

Caspasa 8: Cisteinil aspartato proteasa 8.

Caspasa 9: Cisteinil aspartato proteasa 9.

FADD: Factor asociado a dominio de muerte.

SMAC/DIABLO: Segundo activador derivado de mitocondria para caspasas.

1. Planteamiento del problema

En la práctica odontológica el peróxido de hidrógeno ha sido ampliamente utilizado en cirugía, para la eliminación de bacterias que se presentan cuando la sutura ha pasado algún tiempo en contacto con la piel o encía, para incrementar la salud en la encía, y en el blanqueamiento dental. Todos estos procedimientos en los que se ocupa el peróxido de hidrógeno se obtiene un beneficio y en algunos casos se ocasionan efectos secundarios que repercuten en los tejidos adyacentes, ya que el H_2O_2 es muy citotóxico para las células, induciéndolas a 2 mecanismos que son: la adaptación y apoptosis siendo esta a la que nos enfocaremos en este estudio, la apoptosis es un proceso deliberado que realizan las células en los organismos multicelulares estableciéndose como uno de los principales tipos de muerte celular e involucra una serie de eventos bioquímicos que conduce a la apoptosis.

Una vez conocida la problemática del estudio decidimos caracterizar las señales apoptóticas que se dan dentro de la células cuando estas, entran en contacto con el peróxido de hidrógeno hasta llegar a un muerte controlada

En forma inicial, en el laboratorio se ha estudiado el efecto del peróxido de hidrógeno que conduce en un evento temprano de fosforilación de proteínas en residuos de tirosina y de igual forma promueve la activación de la familia de las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK) p38, ERK y JNK.

Sabiendo con anterioridad que con el estímulo del peróxido de hidrógeno sobre las células se activan a las MAPK, pero nos enfocaremos en las proteínas pro y anti apoptóticas que dependen de la mitocondria.

2. Justificación del estudio

Mediante la caracterización de las diferentes vías que están implicadas en la activación de las señales anti apoptóticas y pro-apoptóticas, producidas por factores internos y/o externos, se induce a la muerte celular programada (apoptosis). Este estudio es importante ya que nos ayudará en un futuro a promover la investigación para nuevos métodos de eliminación de bacterias, blanqueamientos dentales y de fármacos, que puedan interrumpir o adelantar las señalizaciones que ocurren dentro de las células. En algunas enfermedades, es necesario eliminar las células que no entran en apoptosis, aun cuando se encuentran con daño celular y se siguen reproduciendo sin control, estas células crean tejidos anormales, crecen y se dispersan en el cuerpo, como por ejemplo en algunos tipos de cáncer.

3. Introducción

El peróxido de hidrógeno es ampliamente utilizado en la odontología para diversos tratamientos como es el caso del blanqueamiento dental, para la eliminación de bacterias y el aumento en la salud de la encía

El blanqueamiento dental, es el tratamiento estético más solicitado al cirujano dentista, lo que trae como consecuencia, el uso desmedido del peróxido de hidrógeno, sin tomar en la mayoría de los casos las precauciones pertinentes; por tal motivo, se hace necesario un estudio mas a fondo sobre el mecanismo de acción que se lleva acabo a nivel celular, así como los efectos secundarios que se pueden presentar en el periodonto y mucosa yugal.

En la eliminación de bacterias se ocupa el peróxido de hidrógeno ya que es muy citotóxico para las bacterias siendo una de las principales ventajas del H₂O₂ pero esta citotoxicidad es una desventaja ya que afecta también a las células, una vez que el peróxido de hidrógeno entra en contacto con la célula, ésta tiene 2 opciones morir o adaptarse.

En este trabajo se analizó, si los estímulos internos producidos por el efecto del peróxido de hidrógeno en la célula, inducen a la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina, siendo este un evento temprano y de igual forma promueven la activación de la familia de las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK) p38, ERK y JNK. Estas proteínas forman parte de la familia Map-cinasa e interviene en la vía de transducción, que causa liberación de citocinas, producción de óxido nítrico y así mismo han sido involucradas con la apoptosis.

4. Antecedentes

El peróxido de hidrógeno es ampliamente utilizado en el hogar como colutorios que los pacientes ocupan para la prevención de la enfermedad periodontal, en el blanqueamiento dental se ocupa a una concentración de 15 a 30% para la aplicación en el consultorio y a una concentración de 10 a 15% para la aplicación en el hogar, en ocasiones los pacientes adquieren el material en los centros comerciales para propia colocación, sin los conocimientos necesarios para su aplicación y sin la supervisión de un profesional; entrando en contacto el peróxido de hidrógeno con los tejidos blandos, ocasionando lesiones, como es el caso cuando el peróxido de hidrógeno entra en contacto con la mucosa yugal causando lesiones epiteliales superficiales

Se considera que el tratamiento con peróxido de hidrógeno puede ser citotóxico, lo que desencadena respuestas apoptóticas en los tejidos que están en contacto con este; por tal motivo el uso del tratamiento de blanqueamiento dental debe de ser limitado para el cirujano dentista, por ser el que posee los criterios y conocimientos necesarios para su aplicación.

5. Periodonto

El periodonto, es el conjunto de tejidos que le dan la vitalidad al diente, ya que gracias a este soporte, el diente se mantiene en la boca para cumplir su función principal que es la masticación. El periodonto esta comprendido por los siguientes tejidos.¹

5.1 Encía

La encía es parte de la mucosa masticatoria que recubre la apófisis alveolar y rodea la porción cervical de los dientes. Adquiere su forma y textura una vez que los dientes han erupcionados por completo.

En sentido coronario, la encía tiene un color rosada, su limite coronal termina con el margen gingival libre que tiene un contorno festoneado. En sentido apical, la encía se continúa con la mucosa alveolar laxa, de un color rojo oscuro, de la que esta separada por el límite mucogingival¹

Macroscópicamente la encía se divide en:

5.1.1 Encía libre o marginal.

5.1.2 Encía adherida o insertada.

5.1.3 Encía interdientaria.

5.1.1 Encía Libre o Marginal

La encía libre o marginal es de un color rosa coral, su superficie es opaca y tiene una consistencia firme. Esta comprendida por el tejido gingival en las zonas veztibulares, linguales y palatinas de los dientes. Se extiende en un sentido coronal desde el margen gingival hasta el surco apical libre, que corresponde con el nivel de la unión cementoadamantino. Al término de la erupción el margen gingival libre se ubica sobre la superficie adamantina, midiendo aproximadamente de 0.5-3mm en sentido coronal.¹

Esta encía se asemeja a un listón de 1 a 2 mm de ancho, que contornea con su borde libre la corona clínica. Se trata de un tejido fibroso muy resistente

cubierto por epitelio queratinizado. La unión de la encía libre con la pared dentaria forman el surco gingival de 0.5 a 3 mm de profundidad, normalmente y con salud gingival. En esta región del surco, el epitelio que cubre a la encía no se encuentra queratinizado, en el fondo del surco, el epitelio se encuentra adherido al diente por medio de una inserción epitelial¹ (Fig.1).

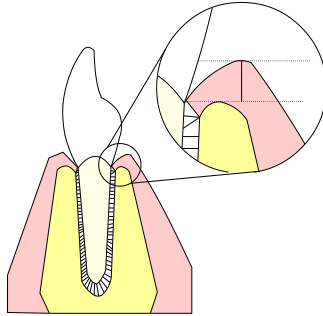


Fig. 1 (Imagen del Autor)

Se muestra el espesor de la encía marginal

5.1.2 Encía Adherida o Insertada

La encía insertada, se localiza después de la encía marginal, su aspecto exterior es granuloso como el de la cáscara de naranja, debido a la constitución fibrosa del corion, que fija la mucosa en pequeñas zonas o puntos por medio de haces de fibras, dejando a otras porciones del tejido epitelial flojas, esto le proporciona ese aspecto tan particular.

Microscópicamente este efecto de cáscara de naranja, es producto de protuberancias redondeadas que se alternan con depresiones en la superficie gingival²; en otras palabras, es la interdigitación de tejido epitelial con el tejido conectivo.

Como su nombre lo indica, la encía adherida o insertada está fuertemente unida a la tabla externa del hueso, lo que le otorga firmeza y consistencia. Los límites de la encía adherida están determinados coronalmente por la encía libre y apicalmente por la mucosa alveolar. (Fig. 3). Esta última es móvil y no está queratinizada como el resto de la mucosa de toda la boca, se extiende hasta el repliegue o fondo de saco del veztíbulo.¹

El ancho de esta encía en la zona veztibular difiere en las diferentes zonas de la boca. En la maxila, la zona de incisivos tiene un ancho de 3.5 mm a 4.5 mm,

en la zona de premolares y molares es de 1.9 mm. En la mandíbula la zona de incisivos tiene una anchura de 3.3 mm a 3.9 mm y en la zona de premolares y molares tiene un espesor de 1.8 mm.²

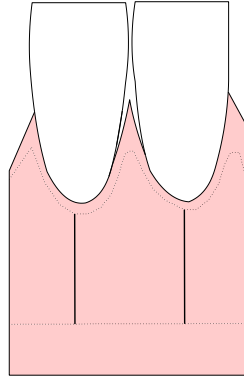


Fig. 2 (Imagen del Autor)
Muestra la longitud de la encía insertada

5.1.3 Encía Interdentaria

La forma de la encía Interdentaria está determinada por los puntos de contacto de los dientes, la anchura de las superficies dentarias proximales y el curso de la unión cemento adamantina. En la zona de anteriores, la papila dental tiene forma piramidal, mientras que en la zona de molares las papilas suelen estar más aplastadas en sentido veztíbulo lingual.²

Así, las papilas interdentarias en estas zonas, suelen tener una porción veztibular y otra lingual o palatina separadas por la región llamada col o collado (Fig. 3).¹

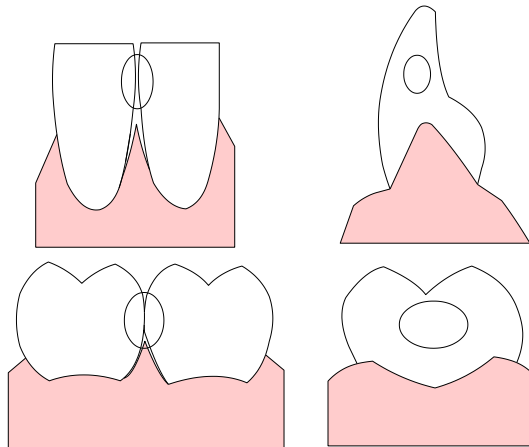


Fig. 3 (Imagen del Autor)
Muestra el punto de contacto de los órganos dentarios y el col o collado

Epitelio bucal

La encía marginal comprende todas las estructuras tisulares, constituida hasta el nivel del límite cemento adamantino. El epitelio que recubre la encía marginal se diferencia en 3: epitelio bucal que mira hacia la cavidad bucal, epitelio sulcular bucal que mira hacia el diente sin ponerse en contacto con él, epitelio de unión, que permite la adherencia de la encía y el diente.³

El límite entre el epitelio bucal y el tejido conectivo subyacente sigue un curso ondulado. Las porciones de tejido conectivo que se proyectan en el epitelio reciben el nombre de papilas conectivas y están separadas entre sí por las papilas dérmicas o crestas epiteliales.¹

Cuando la encía se encuentra en un estado de salud, las papilas conectivas y el plexo epitelial están ausentes en el límite entre el epitelio de unión y el tejido conectivo subyacente. Un rasgo morfológico característico del epitelio bucal y del epitelio sulcular es, la presencia de las papilas dérmicas, en tanto que estas estructuras faltan en el epitelio de unión.¹

El epitelio bucal es un epitelio queratinizado, estratificado y escamoso, que según el grado de diferenciación de sus células productoras de queratina, puede ser dividido en cuatro capas celulares que son:

1. Capa basal.
2. Capa espino celular.
3. Capa celular granulosa.
4. Capa celular queratinizada.

Además de las células productoras de queratina que comprenden alrededor del 90% del total de la población celular, el epitelio bucal contiene tres tipos de células más, que son los Melanocitos, células de Langerhans y células de Merkel.²

Melanocitos

Los Melanocitos son células dendríticas que se localizan en la capa basal y espinosa del epitelio gingival. Estas células crean la melanina que se sintetiza en los organelos llamados premelanosomas. Estos organelos contienen tirosinasa, que convierte a la tirosina en dihidroxifelanina que a su vez se transforma poco a poco en melanina.²

Células de Langerhans.

Estas células son dendríticas y se encuentran entre los queratinocitos en todos los niveles supra basales. Tienen gránulos elongados y son macrófagos con posibles propiedades antigénicas.²

Células de Merkel

Estas células se encuentran en la parte más profunda del epitelio y son terminales de fibras nerviosas, que se conectan a la célula adyacente por medio de desmosomas.²

Epitelio dento-gingival.

Los componentes estructurales de la región dento-gingival alcanzan sus características estructurales en conjunción con la erupción de los dientes.

Entre estos cambios se puede distinguir los siguientes:²

1. Cuando el esmalte dentario alcanza su desarrollo pleno, los ameloblastos se acortan y producen una lámina basal formando junto con las células del epitelio del esmalte externo el llamado epitelio reducido del esmalte, que rodea la corona del diente desde el momento en que el esmalte queda correctamente mineralizado, hasta que el diente comienza a erupcionar.
2. Cuando el diente se encuentra en su proceso eruptivo se acerca al epitelio bucal, hasta el momento en el que el epitelio reducido del esmalte se une al epitelio bucal siendo reemplazado gradualmente por este último.
3. Cuando el diente ha penetrado en la cavidad bucal, el epitelio reducido del esmalte y el epitelio bucal se fusionan en el borde incisal del diente. Grandes porciones apicales al área incisal del esmalte quedan cubiertas por el epitelio de unión que contiene de 3 a 4 capas de células de espesor en los primeros años de vida y con la edad aumenta de 10 a 20 capas de células, su longitud varía de 0.25 a 1.35mm.² En dientes de reciente erupción dicho epitelio se extiende desde el fondo del surco gingival, hasta el borde apical del esmalte y es una banda que varía en grosor, de 15 a 30 células cerca del surco gingival.⁴ La región cervical del esmalte en este momento se encuentra cubierta por ameloblastos y por las células externas del epitelio reducido del esmalte.
4. Durante las últimas fases de la erupción del diente, todas las células del epitelio reducido del esmalte son reemplazadas por el epitelio de unión; este epitelio se continúa con el epitelio bucal y participa en la adherencia entre el diente y la encía.¹

5.1.4 Tejido Conectivo

El tejido conectivo que predomina en la encía y el ligamento periodontal es laxo.⁵ Los componentes principales son las fibras colágenas (60%), fibroblastos (5%), vasos, nervios y matriz orgánica (35%).²

5.1.4.1 Células

En el tejido conectivo existen 4 diferentes tipos de células que son :

1. Fibroblastos: Estas células del tejido conectivo son las que más predominan en un 65%. Es una célula fusiforme o estrellada, con núcleo de forma ovalada, su citoplasma contiene un retículo endoplasmático granuloso bien desarrollado con ribosomas. Está dedicado a la producción de diversos tipos de fibras halladas en el tejido conectivo, además interviene en la síntesis de la matriz.⁶ (Fig.4)

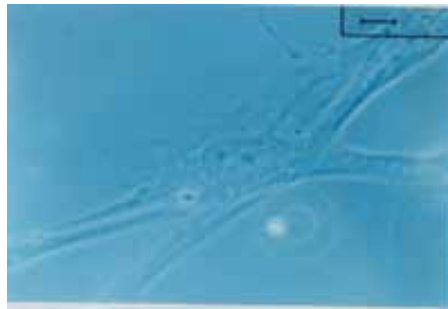


Fig. 4 Fibroblasto gingival humano. Microscopía de interferencia de Nomarski. Aumento 100x.⁷

2. Los mastocitos: son células que se encuentran en el tejido conjuntivo, son los encargados de liberar histamina, y cuando se exponen a algunos antígenos estos liberan heparina. (Fig.5)⁸

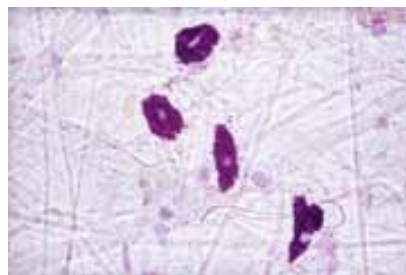


Fig. 5 Mastocitos.⁹

3. Macrófagos: La palabra macrófago procede del griego macro que significa grande y fagos que significa comer con un significado completo de gran comedor. Su función es fagocitar, abundan en especial en el tejido inflamado, derivan de los monocitos sanguíneos migrados dentro del tejido, a menudo se encuentran restos de material fagocitado en sus vezículas lisosómicas que son los fagosomas.¹⁰ Los macrófagos son células del sistema inmunitario, que se localizan en los tejidos

procedentes de la emigración desde la sangre a partir de un tipo de leucocito llamado monocito. (Fig. 6)



Fig. 6 Macrófago.¹¹

4. Leucocitos Polimorfonucleares: Son células con un núcleo lobulado y en el citoplasma se encuentran numerosos lisosomas. (Fig. 7)

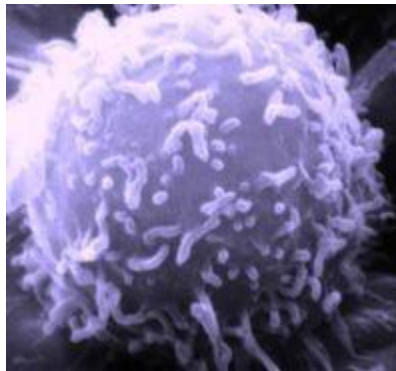


Fig. 7 Leucocito PMN.¹²

5. Linfocitos: Se caracterizan por presentar un núcleo esférico que contiene zonas localizadas de cromatina densa (Fig. 8).



Fig. 8 Linfocito saliendo de la médula.¹³

5.1.4.2 Fibras del tejido conectivo

Las fibras del tejido conectivo son producidas por los fibroblastos y se divide en:

- 1) Fibras colágenas. Predominan en el tejido conectivo y constituyen los componentes más esenciales del periodonto. La unidad menor de la molécula de colágeno, suele ser conocida como tropocolágeno que se compone de tres cadenas de polipéptidos entrelazadas para formar una hélice. Cada cadena contiene unos 1000 aminoácidos¹⁴ (Fig. 9). Un tercio de ellos son glicina y alrededor del 20% prolina e hidroxiprolina. La síntesis del tropocolágeno se realiza dentro del fibroblasto, desde el que la molécula será secretada hacia el espacio extracelular. Primero, las moléculas de tropocolágeno se agregan longitudinalmente para formar protofibrillas, que posteriormente se integran lateralmente y paralelas en las fibrillas colágenas.¹⁴

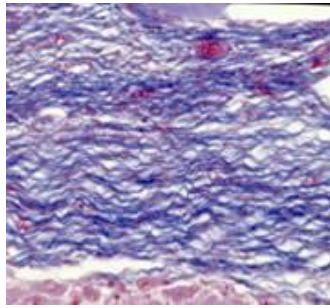


Fig. 9. Fibra de Colágeno Tipo I.¹⁵

- 2) Fibras de reticulina: Son numerosas en el tejido adyacente a la membrana basal. Sin embargo también aparecen en grandes cantidades en el tejido conectivo laxo, que rodea a los vasos sanguíneos. De tal modo, que están presentes en las interfaces de los tejidos, como entre el epitelio y el tejido conectivo y endotelio y tejido conectivo.¹⁴(Fig.10)

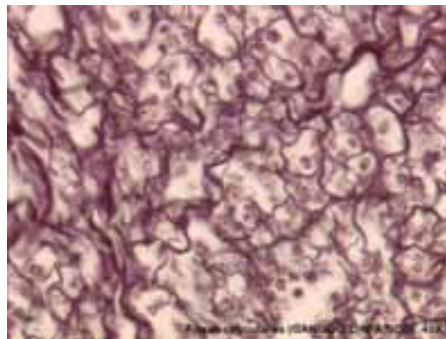


Fig. 10 Fibras Reticulares.¹⁶

- 3) Fibras Oxitalánicas: Están presentes en la encía y ligamento periodontal, simulan estar compuestas por fibrillas finas y largas con un diámetro aproximadamente de 150 Å¹, estas fibras solo se pueden ver con el

microscopio óptico después de que se han oxidado con ácido paracético. (Fig. 11)



Fig. 11 La fotomicrografía ilustra las Fibras Oxitalánicas en el ligamento periodontal donde siguen un curso principalmente paralelo al eje longitudinal del diente.¹

- 4) Fibras elásticas: En el tejido conectivo de la encía y del ligamento periodontal, sólo hay fibras elásticas en asociación con los vasos sanguíneos.¹ Sin embargo, son numerosas en el tejido conectivo de la mucosa alveolar. La encía en visión coronal del límite mucogingival no contiene fibras elásticas.¹⁷

Aunque muchas de las fibras colágenas en la encía y el ligamento periodontal están distribuidas irregularmente o aleatoriamente, la mayoría tienden a estar dispuestas en grupos de haces con una clara orientación. De acuerdo con su inserción y curso dentro de los tejidos, los haces de las fibras se encuentran orientados en la encía y pueden dividirse en los siguientes grupos:¹

- 1) Fibras circulares. Son haces de fibras que siguen un curso dentro de la encía libre y rodean al diente como un anillo¹ (Fig.12).
- 2) Fibras transeptales. Corren a través del tabique interdentario y están incluidas en el cemento de dientes adyacentes¹ (Fig. 12).

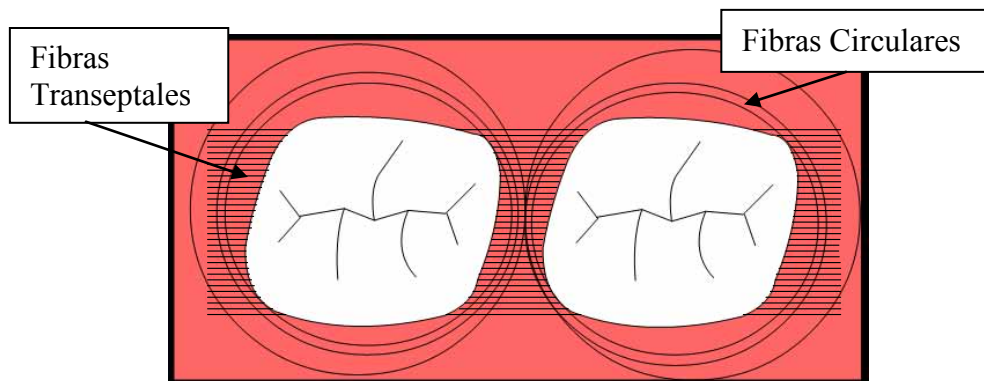


Fig.12 Muestra de las fibras circulares y transeptales.

- 3) Fibras dentogingivales. Están incluidas en el cemento de la porción supra alveolar de la raíz y se proyectan desde el cemento hacia el tejido gingival libre que se encuentra en veztibular, lingual e interproximal, tiene una configuración de abanico¹ (Fig.13).
- 4) Fibras dentoperiósticas. Están incluidas en la misma porción del cemento que las fibras dentogingivales, pero siguen un curso apical sobre la cresta ósea veztibular y lingual; terminan en el tejido de la encía adherida¹ (Fig. 13).

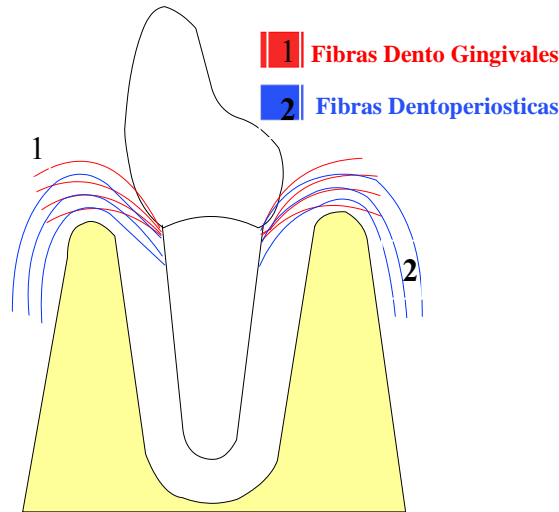


Fig.13 (Imagen del Autor)
Imagen del autor esquema de las fibras dento gingivales en color rojo y Fibras Dentoperiósticas en color azul.

5.1.4.3 Matriz

La matriz del tejido conectivo es producida primero por los fibroblastos, aunque algunos componentes son generados por los mastocitos y otros provienen de la sangre. Es el medio en el que las células están incorporadas y es indispensable para el buen funcionamiento de todas las células, ya que ayuda en el transporte de nutrientes, metabolitos, electrolitos y agua.¹

Los componentes de la matriz son macromoléculas de carbohidratos y se dividen en dos: proteoglicanos y glicoproteínas. Los proteoglicanos contienen glicosaminoglicanos como unidad principal de los hidratos de carbono, a través de los enlaces covalentes se juntan a una o más proteínas. El compuesto de los hidratos de carbono es siempre predominante en los proteoglicanos, ya que estas proteínas son flexibles, grandes y con carga negativa. Se unen y ocupan espacios aun más grandes, por esto las moléculas mas pequeñas como el agua y los electrolitos pueden pasar libremente; así mantienen el control de los líquidos estabilizando la presión osmótica.¹

Debido a su estructura e hidratación, las macromoléculas ejercen resistencia a la deformación, lo que actúa como reguladores de la coherencia del tejido conectivo.¹

5.2 Ligamento Periodontal

El ligamento periodontal es un tejido conectivo que rodea la raíz del diente relacionándolo de forma directa con el hueso, éste se continúa con el tejido conectivo de la encía y se comunica con el hueso mediante los canales vasculares, ubicados en los espacios medulares del mismo¹ (Fig. 14).

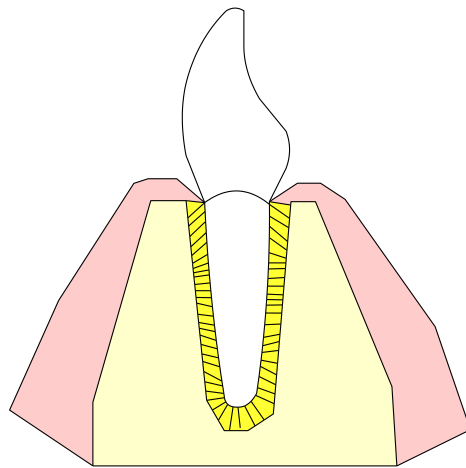


Fig. 14 (Imagen del Autor)

La imagen muestra el ligamento periodontal de un diente sano.

El ligamento periodontal se compone por fibras periodontales.

Las principales fibras del ligamento periodontal están compuestas de colágeno tipo 1.¹⁸ La configuración molecular del colágeno les confiere fuerza tensible y flexibilidad a los tejidos que la contienen, se encuentran dispuestas a manera de haces siguiendo un curso ondulado; su porción terminal se inserta en el cemento radicular y en el hueso denominándose fibras de Sharpey (Fig. 15).¹

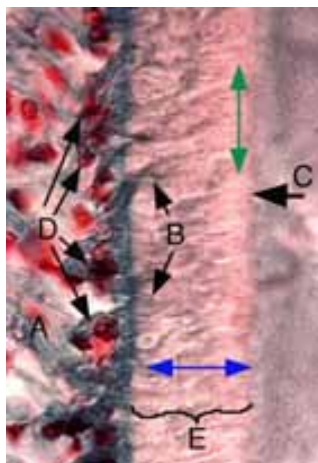


Fig. 15 Fibras de Sharpey en cemento acelular. Podemos ver en A. Fibras de ligamento periodontal. B. Fibras de Sharpey. C. Unión de dentina-cemento. D. Cementoblastos. E. Cemento acelular.

5.2.1 Ubicación de las Fibras

Las fibras periodontales se dividen en 5 grupos¹⁹ (Fig. 16).

1. Cresto-alveolares. Van del cemento que se encuentra debajo del epitelio de unión a la cresta alveolar. Estas fibras también corren del cemento hasta el estrato fibroso del periostio cubriendo al hueso alveolar. Su función consiste en prevenir la extrusión del diente y resistir los movimientos laterales.
2. Fibras horizontales. Se insertan en el cemento y corren por todo el eje longitudinal del diente hasta fijarse al hueso alveolar.
3. Fibras oblicuas. Es el grupo más grande de fibras periodontales; ya que se insertan en el cemento y se dirigen en dirección coronal oblicua al hueso. Su función es resistir las fuerzas verticales en la masticación y transformarlas en tensión que absorberá el hueso alveolar.
4. Fibras apicales. Surgen del cemento de la zona del foramen apical y se insertan en el hueso. No están presentes en dientes con raíz incompleta.
5. Fibras inter radicales. Se despliegan en abanico desde el cemento a la zona de la furca de dientes multi radicales.

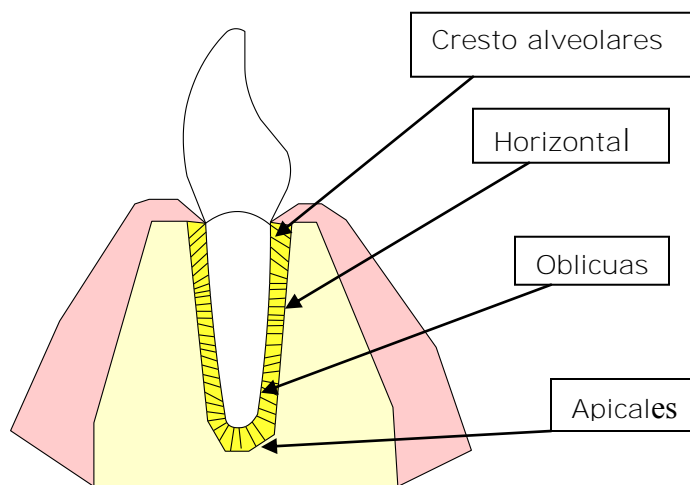


Fig. 16 (Imagen del Autor)

La ilustración muestra la ubicación y dirección de las fibras del ligamento periodontal.

5.2.2 Funciones del Ligamento Periodontal

Las funciones del Ligamento Periodontal se dividen en: físicas y sensoriales.

Funciones físicas.¹⁸ (Fig. 17)

1. Brinda protección contra posibles fracturas de los conductos sanguíneos y nervios.
2. Transmiten las fuerzas oclusales hacia el hueso.
3. Adhieren el diente al hueso.
4. Mantienen los tejidos gingivales en relación con los dientes.
5. Resisten el impacto de las fuerzas oclusales.

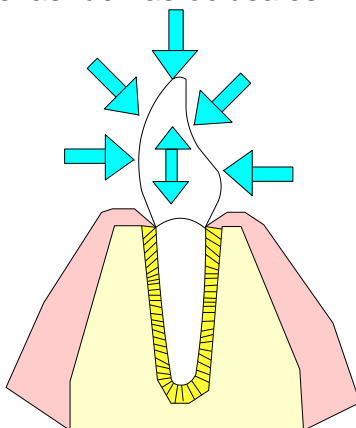


Fig. 17 (Imagen del Autor)

Muestra las diferentes cargas que puede presentar un diente y cómo actúa el ligamento.

Funciones sensoriales¹⁸ (Fig. 18):

1. Terminaciones libres: tienen una configuración ramificada que conducen sensaciones de dolor.
2. Mecanorreceptores de Ruffino: localizados principalmente en el área periapical.
3. Corpúsculos de Meissner: también son mecanorreceptores y se encuentran principalmente en el tercio medio de la raíz.
4. Terminaciones propioceptivas y sensoriales que están rodeadas de una capsula fibrosa, localizándose principalmente en el ápice.

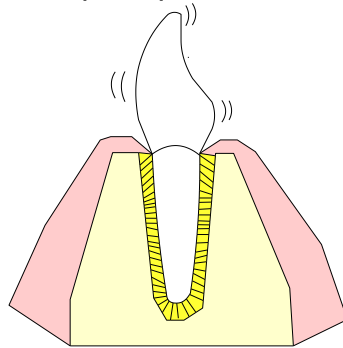


Fig.18 (Imagen del Autor)

Muestra como el ligamento sirve de propioceptivo ante movimientos muy levez.

5.3 Cemento

El cemento es un tejido mineralizado, avascular, mesenquimático y especializado, que cubre la raíz y en ocasiones pequeñas porciones de la corona de los dientes. Tiene muchas características en común con el tejido óseo, sin embargo, el cemento no contiene vasos sanguíneos o vasos linfáticos, no tiene inervación y no experimenta resorción fisiológica o remodelación, pero se caracteriza por la continua deposición de cemento durante toda la vida. Al igual que otros tejidos mineralizados, contiene fibras de colágeno incrustadas en una matriz orgánica, su principal componente es la hidroxiapatita ¹(Fig. 19).

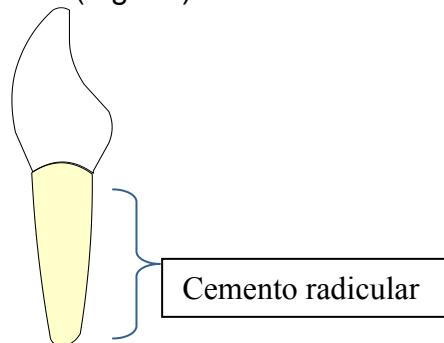


Fig. 19 (Imagen del Autor)

Cemento radicular.

Existen 3 clasificaciones del cemento que son: ¹ (Fig. 20).

1. Cemento Acelular: Se encuentra en la parte coronal y en el tercio medio de la raíz, contiene principalmente paquetes de fibras de Sharpey.

2. Cemento Celular Mixto: Este contiene dos tipos de cemento: acelular y celular, se produce en el tercio apical de las raíces y en el furca, contiene fibras extrínsecas e intrínsecas así como cementocitos.

3. Cemento Celular: Contienen fibras intrínsecas, cementocitos y se encuentra en la porción apical del diente.

El espesor del cemento disminuye de apical a coronal. Aumentando el grosor con la edad, dependiendo de las fuerzas de masticación mas el tiempo en que el diente ha estado en oclusión.

El cemento proporciona un medio de retención por anclaje de las fibras colágenas del ligamento periodontal, que fijan el diente al hueso alveolar, controla el ancho del espacio periodontal, permite la reorientación de fibras periodontales, conserva la inserción de dichas fibras durante el movimiento dentario, transmite las fuerzas oclusales a la membrana periodontal, repara la superficie radicular cuando se presentan fracturas o resorciones y compensa el desgaste del diente por atrición.¹

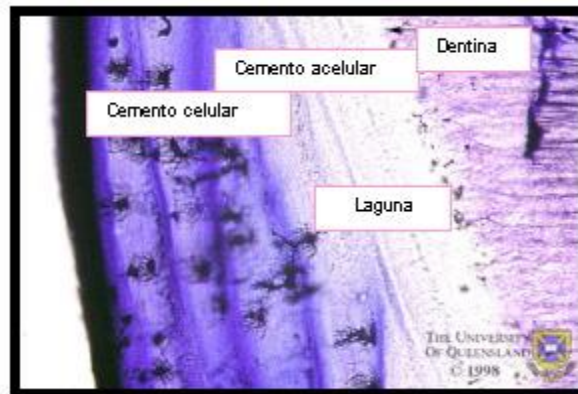


Fig. 20 Imagen histológica del cemento dentario, donde se puede apreciar el cemento celular, el cemento acelular y las lagunas en las que quedan atrapados los cementoblastos.²⁰

5.3.1 Componentes estructurales

El cemento está formado por células y por una matriz extracelular calcificada. Las principales células son los cementoblastos y los cementocitos.¹

Los cementoblastos se encargan de sintetizar tropocolágeno que formará las fibras colágenas intrínsecas y los proteoglicanos o glucosaminoglicanos que formarán la matriz extracelular.¹

Estos cementoblastos se encuentran adosados a la superficie del cemento del lado del ligamento periodontal. Si se presentan activos, se observan como células cúbicas vascófilas, por el contrario, si se encuentran inactivos, se observan aplanados con núcleos de heterocromatina.¹

En los dientes con raíces completamente formadas, los cementoblastos activos se encuentran solo a partir del tercio medio de la raíz o solo en el tercio apical, es decir, en las zonas donde hay deposición de cemento secundario. Entre los cementoblastos activos y el cemento mineralizado, existe una delgada capa de sustancia cementoide o cemento inmaduro, que representa la deposición más reciente de matriz orgánica donde no se han precipitado sales minerales.²¹

Los Cementocitos son los cementoblastos que quedaron atrapados en el cemento mineralizado. Estos se alojan en cavidades denominadas cementoplastos o lagunas.²¹, presentan entre 10 y 20 prolongaciones citoplasmáticas que emergen del cuerpo celular y se extienden hacia la superficie externa en dirección al periodonto, que representa su fuente de nutrición.²¹

5.4 Hueso alveolar

El hueso alveolar se define como las partes de la maxilar y la mandíbula que da sustento a todos los dientes (Fig.21). El proceso alveolar se genera en conjunto con el desarrollo y la erupción de los dientes. Ésta formado por el estímulo de las células del folículo dental y el desarrollo de las células que son osteocitos y osteoblastos, siendo independientes de los dientes. La unión de la raíz, cemento, membrana periodontal y hueso alveolar constituyen el aparato de soporte de los dientes.²²

Las células que conforman el hueso son

Osteoblastos: células creadoras de hueso.

Osteocitos: células en reposo dentro de una laguna.

Osteoclastos: células que reabsorben el hueso.

Estas células se encuentran en las siguientes zonas:

1. En la superficie de las trabéculas óseas del hueso esponjoso.
2. En la superficie externa del hueso cortical que conforma los maxilares.
3. En las paredes alveolares, del lado del ligamento periodontal.
4. En la porción interna del hueso cortical, del lado de los espacios medulares.²



Fig. 21 (Imagen del Autor) Hueso alveolar de la maxila

La reabsorción del hueso está vinculada siempre a los osteoclastos (Fig. 22), estas son células gigantes, especializadas en la degradación de la matriz mineralizada (hueso, dentina, cemento); probablemente se generan a partir de los monocitos vasculares. La osteolisis (degradación del hueso) es un proceso celular activo ejercido por los osteoclastos. Estas células están activas en la reabsorción, se adhieren a la superficie del hueso y crean concavidades lagunares denominadas lagunas de Howship. Los osteoclastos son móviles y capaces de migrar por la superficie ósea.²

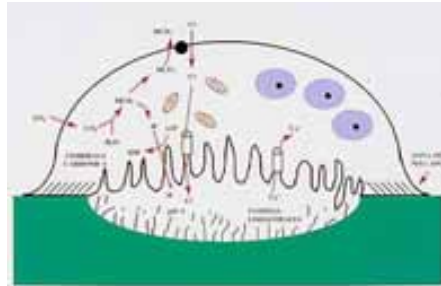


Fig. 22 Se muestran las reacciones químicas que se tienen en una acción osteoclástica, iniciando la reacción con la presencia del osteoclasto y CO₂, tras una serie de reacciones se da la secreción de Cl y H produciendo un pH de 4, desmineralizando el hueso y extrayendo el Ca para que el osteoclasto siga su acción osteoclástica.²³

Tanto el hueso cortical como el esponjoso experimentan continuamente un remodelado (reabsorción seguida de neoformación), en respuesta al desplazamiento de los dientes y a los cambios en las fuerzas funcionales que actúan sobre los dientes.²⁴ Durante el crecimiento óseo, se forman los osteonas primarios, mientras que los osteonas secundarios se generan durante el proceso de remodelación. Primero, los osteoclastos forman un conducto de reabsorción; después los osteoblastos aparecen y comienzan a llenar el conducto con laminillas concéntricas. El remodelado de las trabéculas óseas se inicia con la reabsorción de la superficie ósea por los osteoclastos. Después de un breve periodo, los osteoblastos comienzan a depositar hueso nuevo y finalmente, se forma un nuevo paquete (unidad estructural ósea), delimitado claramente por una línea de hueso más denso.²

Las fibras colágenas del ligamento periodontal están insertadas en el hueso mineralizado que tapiza la pared del alveolo dentario. Este hueso, que se denomina hueso fasciculado, tiene un alto ritmo de recambio. Las porciones de las fibras colágenas insertadas en el hueso fasciculado se llaman fibras de Sharpey. Estas fibras se mineralizan en su periferia, pero a menudo tienen un núcleo central no mineralizado. Los haces de fibras colágenas insertadas en el hueso fasciculado tienen generalmente un diámetro mayor, y son menos numerosos que los haces de fibras correspondientes del cemento del lado opuesto del ligamento periodontal. Los haces individuales de fibras pueden ser seguidos desde el hueso alveolar hasta el cemento. Pero a pesar de estar en el mismo haz de fibras, el colágeno adyacente al hueso es siempre menos maduro, que el adyacente al cemento. El colágeno del lado dentario tiene un ritmo de recambio bajo. Así mientras el colágeno junto al hueso se renueva con relativa rapidez, el colágeno adyacente a la superficie radicular se renueva lentamente.²⁵

6. Blanqueamiento dental y peróxido de hidrógeno

6.1 Introducción

El blanqueamiento dental es el proceso que se utiliza para tratar los dientes con fines estéticos y para lograr esto se debe eliminar el efecto de manchas o coloraciones de origen extrínseco o intrínseco. Ya que si a una persona se le pregunta que es lo que le gustaría cambiar de su boca probablemente diría que el color de sus dientes, esto es porque los dientes blancos reflejan juventud, salud y un mayor atractivo físico.²⁶

6.2 Historia

A lo largo de la historia de la humanidad, el ser humano se ha preocupado por lograr y obtener una apariencia física agradable, y ha considerado la sonrisa como un medio eficaz para alcanzar ese objetivo. A través de los tiempos, el hombre ha recurrido a diferentes métodos de acuerdo con su cultura, creencias y tendencias predominantes en una época determinada; por ejemplo, una referencia de 2000 a.C menciona una costumbre japonesa llamada ohaguro, confinada a decolorar los dientes, la cual producía dientes negros o de color café profundo: otras citas relatan cómo durante la primera centuria del Imperio Romano, los sumos sacerdotes manifestaban que lavarse los dientes con orines, especialmente cuando éstos eran de origen portugués, mantenían los dientes saludables y blancos.²⁷

El blanqueamiento dental se ha convertido en la modalidad más frecuente de tratamiento, llegando a ser el tratamiento que ha cambiado más conductas en la odontología, debido a que es una técnica sencilla, conservadora, obteniendo resultados a corto plazo y satisfaciendo la expectativa del paciente de verse con los dientes más blancos y brillantes.²⁷

El blanqueamiento dental no es nuevo, el primer reporte del que se tiene conocimiento data del año 1877, con el uso del óxido oxalático. En 1895, se comenzó a usar peróxido de hidrógeno y hasta hoy sigue siendo el agente blanqueador de uso interno y externo por excelencia a una concentración del 100% mezclado con éter llamado superoxol. Este se recomienda utilizarse a una temperatura de 46 a 60°C cuando estén implicados dientes vitales, y una gama de 60 a 71°C en dientes no vitales, teniéndose en consideración la edad del paciente y tamaño de la cámara pulpar. Cuando el paciente reporte sensibilidad térmica se debe reducir la temperatura, y se indica un descenso de la temperatura de 5°C.²⁷

Sin embargo, fue durante las décadas de 1970 y 1980 que muchas prácticas de blanqueamiento se realizaron sobre dientes vitales y no vitales usando altas concentraciones de peróxido de hidrógeno al 35% con y sin perborato de sodio, en combinación con luz de alta intensidad o bajo calor. Mientras esos agentes proveían un considerable efecto blanqueador, la técnica

misma mostraba algunas desventajas, ya que durante el tratamiento se presentaba irritación gingival y pulpar frecuentes, además cuando se sobrecalentaba el diente, existían cambios en la estructura superficial del tejido dental y en dientes no vitales era posible inducir una reabsorción radicular interna o externa.²⁷

Dentro de estas investigaciones es importante señalar las siguientes:²⁷

En 1972; *Arens*, ante el aumento de tinciones por tetraciclinas en la década de los 70's reactiva las técnicas de blanqueamiento de Abbot, caídas en desuso, consistentes en la aplicación de peróxido de hidrógeno activado por calor.²⁷

En 1980; *Zaragoza y Cols.* Introducen la técnica termoquímica denominada "blanqueamiento BV" peróxido de hidrógeno al 70% activado por calor en una cubeta térmica. Aunque con interesantes resultados cae en desuso por ser poco práctica y peligrosa por la alta concentración del producto que requiere excepcionales medidas de seguridad.²⁷

En 1984; *McCloskey* establece el empleo de una solución diluida de ácido clorhídrico frotándola contra el esmalte con bolas de algodón.²⁷

En 1986; *Croll y Cavanaugh* combinan un 18% de ácido clorhídrico con piedra pómez y raíces vegetales.²⁷

En 1986; *Munro*. Desarrolla el primer agente comercial blanqueador con 10% peróxido de carbamida.²⁷

En 1989; *Feinman y Cols.*, seguidores de *Arens*, son los primeros en definir cuidadosamente la técnica de peróxido de hidrógeno activado por calor y, sobre todo, su real campo de aplicación.²⁷

En 1989; *Haywood y Heymann* también recomiendan el uso del gel de peróxido de carbamida al 10% equivalente al peróxido de hidrógeno al 3.6% aplicado en la boca mediante finas cubetas de plástico individualizadas para cada paciente; usándolos durante varias horas diarias en domicilio durante un período de 1-2 semanas. Esto fue el origen de alguna de las actuales técnicas más extendidas y económicas, que presentan una gran ventaja usando sustancias blanqueadoras a concentraciones muy bajas en el blanqueamiento domiciliario. En la actualidad existen innumerables productos de esta categoría en el mercado.²⁷

A fines de la década de los 80's, algunos clínicos fortuitamente notaron que el antiséptico de peróxido de carbamida, usado en el tratamiento de úlceras aftosas en tejidos blandos y como desinfectante después de cirugía periodontal, mostraba como resultado un blanqueamiento significativo del esmalte dental, especialmente cuando se utilizaba con la técnica de cubetas como apósitos.²⁷

En 1989, el primer artículo sobre guardas nocturnas para el blanqueamiento de dientes vitales, usando peróxido de carbamida, fue publicado por Haywood y Heymann después de ser evaluado por la University of North Carolina. Estudios posteriores probaron que las aplicaciones de peróxido de carbamida podían disminuir o eliminar decoloraciones del esmalte.²⁷

6.3 Etiología de las tinciones

Los dientes pueden llegar a tener una infinita variedad de gama de colores a causa de diferentes motivos, pero básicamente el color de los dientes viene determinado genéticamente, lo que quiere decir, que el color de los dientes es una característica innata como el color de la piel.²⁶

A veces los dientes se tiñen antes de la erupción, en otras ocasiones por la edad, por causa genéticas, médicas y ambientales, siendo las mas frecuentes las causas externas como fumar, tomar café, té o alimentos con mucho colorante.²⁶

Las tinciones también se producen por la penetración en la estructura dental de fármacos sistémicos o ingesta excesiva de fluoruros durante el desarrollo del esmalte y dentina, o bien por productos derivados del organismo como bilirrubina, que se deposita en los túbulos dentinarios, enfermedades hepáticas, traumatismos dentales donde se encuentra la descomposición de la hemoglobina, agresiones externas como bruxismo, cepillado excesivo, bebidas alcohólicas o bulimia.²⁶

Las tinciones si no desaparecen con el tiempo tienden a provocar problemas sociales y psicológicos en los pacientes.²⁶

El color está dado por un conjunto de estructuras como son, el esmalte, cuyo su grosor en dientes anteriores varia de 2 a 2.5mm en el borde incisal y en los dientes posteriores hasta de 3mm de espesor, a partir de la cara oclusal o incisal, el esmalte se va adelgazando hasta llegar a cervical, otro factor que determina el color del diente es la calidad del esmalte ya que puede presentar diferentes patologías como hipoplasia. La dentina es otro factor que da el color al diente, en los jóvenes se tiene un color pardo amarillento, que en ocasiones tiene un tinte rosado, con el avance de la edad se van obteniendo colores mas pardos y mas en personas con habito de tabaquismo.²⁸

6.3.1 Tinciones extrínsecas

Las tinciones extrínsecas se obtienen cuando el diente esta en contacto directo como los pigmentos como en el caso de placa dentobacteriana, bacterias cromogénicas que degradan proteínas superficiales, colutorios, alimentos, suspensiones dietéticas, sustancias químicas y algunos hábitos. Estas pigmentaciones son fáciles de eliminar ya que se presentan por factores que solo pigmentan al diente de una forma superficial. La mayoría de los pigmentos

normalmente se colocan en las superficies linguales de dientes anteriores y otros por veztibular como es el caso del tabaco y marihuana que produce anillos delimitados en cervical de un color verde marrón, el café y el té pueden crear tinciones de un color marrón a negro, estas pigmentaciones son difíciles de eliminar en fisuras, focetas y en defectos del esmalte. Antes de realizar el tratamiento de blanqueamiento se recomienda tratar de eliminar la tinción de la superficie del esmalte o dentina.²⁷

6.3.2 Tinciones intrínsecas

Estas tinciones se producen por depósitos de materiales cromogénicos en el interior del esmalte o dentina y se puede clasificar en dos tipos preruptivas y posteruptivas.²⁷

Preeruptivas: dentro de esta clasificación se encuentran las enfermedades hematológicas, enfermedades del hígado y alteraciones en el esmalte y/o dentina. Como algunas de estas enfermedades requieren del uso de medicamentos para su tratamiento, los cuales ocasionan pigmentaciones como es el caso de la tetraciclina, minociclina, otros antibióticos y otros casos como el flúor que en concentraciones muy altas causan pigmentaciones.²⁷

Posterutivas: dentro de esta clasificación encontramos los causados por traumatismos, caries primaria y secundaria, materiales restauradores, envejecimiento, tabaquismo, agentes químicos, algunos alimentos, minociclina.²⁷

6.3.2.1 Manchas por tetraciclina

El periodo de riesgo de tinciones dentarias por tetraciclina abarca todo aquel momento en el que el diente se encuentra en formación de tejido dentario especialmente coronario. Por lo que la susceptibilidad se encuentra entre el 2º trimestre del embarazo hasta los 8 años de edad y solo basta que un niño entre en este rango y tome por 3 días tetraciclina, para que se observen tinciones de moderadas a severas. Es por esto que esta absolutamente contraindicada la medicación de tetraciclina a niños menores de 8 años, a no ser que la salud del paciente así lo requiera.²⁷

Las tetraciclinas se fijan al tejido dentario y óseo en formación, a través de su avidez “quelante” por el calcio. La exposición a la luz desencadena reacciones fotoquímicas cromogénicas, por lo que la superficie veztibular de los dientes anteriores sufren una mayor transformación de coloración observándose bandas de una tonalidad grisácea a marrones. (Fig.23). Se afectan tanto el esmalte, como la dentina.²⁹



Fig. 23 Manchas por tetraciclina.²⁶

Existen cuatro grados de tinciones por tetraciclina según la clasificación Jordán y Boksman de 1984 que son las siguientes:²⁷

Tinción de primer grado.

Va de un color amarillo a gris encontrándose en la totalidad de la corona de una forma totalmente distribuida y sin bandas.

Tinciones de segundo grado.

Estas van de un color amarillo o gris, no presentan bandas, para el tratamiento de este tipo de tinciones se necesita más de 5 citas.

Tinción de tercer grado.

Se presenta una coloración gris o azul con presencia de bandas, para esto se da un tratamiento amplio con la ocupación de opacadores.

Tinción de cuarto grado.

Este tipo de tinciones se aprecian en los pacientes una coloración gris azulada en las encías, para su tratamiento se recomienda un blanqueamiento a largo plazo, si las pigmentaciones no desaparecen por completo y el paciente aún está a disgusto, lo único que se puede hacer es la colocación de prótesis estéticas.

6.3.2.2 Tinciones por minociclina

La minociclina es un derivado semisintético de tetraciclinas de segunda generación. Es antibiótico de amplio espectro lipofílico, que necesita altas concentraciones en el plasma. Es bacteriostático y desarrolla una actividad antibacteriana mayor que sus análogos. Se ocupa para el tratamiento del acné, su naturaleza lipofílica facilita la penetración a los líquidos corporales y después de su administración, la concentración que alcanza en la saliva es de un 30 a 60% de la concentración.

Este medicamento se absorbe en el tracto gastrointestinal, los pacientes que lo toman tienen el riesgo de presentar pigmentaciones en mucosa, piel, huesos y dientes. La pigmentación dentaria se produce por la quelación con el hierro, formando complejos insolubles. Las tinciones por minociclina se forman por depósitos de la misma en dentina secundaria a través de la red vascular dentaria y asimismo por penetración externa desde la saliva.

Se debe advertir de las consecuencias de la ingesta de minociclina y debemos saber que sus efectos pueden ser minimizados mediante la ingestión simultánea de antioxidantes como la vitamina C a altas dosis.²⁶

6.3.2.3 Tinciones por flúor

Las tinciones por fluorosis se producen por un excesivo aporte de flúor superior a 3 ppm que altera el mecanismo enzimático de los ameloblastos en los últimos estadios de formación del esmalte, produciendo la hipomineralización del mismo por aumento de la porosidad, pueden ir desde unas manchas blanquecinas como nubes, que son prácticamente imperceptibles, hasta manchas cafés con alteraciones de la estructura del esmalte.

Presenta una relación dosis–respuesta, existiendo tres grados de fluorosis que son los siguientes.²⁷ (Fig. 24)

- Fluorosis dental leve: se representa con estrías o líneas a través de la superficie del diente.
- Fluorosis dental moderada: se representa cuando los dientes son altamente resistentes a la caries dental pero con la presencia de manchas blancas opacas.
- Fluorosis dental severa: en este caso el esmalte se encuentra quebradizo y presenta manchas marrones.



6.3.2.4 Tinciones Intrínsecas pos eruptivas:

Las tinciones intrínsecas son producidas en dientes adultos ya erupcionados por varios factores como son por traumatismos, caries primaria y secundaria, material restaurativos, envejecimiento, tabaquismo, minociclina, agentes químicos, o algunos alimentos que su ingesta prolongada provocan tinciones intrínsecas mas profundas.²⁷

Otras causas de tinciones intrínsecas pos eruptivas son:

Sangrado interdental de origen traumático como golpes, necrosis pulpar, y efectos derivados de materiales de uso endodóntico como la presencia del cemento de root o la gutapercha, alteraciones dentales como hipoplasia, amelogénesis, caries, como por ejemplo en el síndrome del biberón, herencia, o productos de una Eritroblastosis fetal.²⁷

6.3.2.5 Tinciones por la edad

Estas tinciones se van a presentar por varios factores como envejecimiento dental, ya que a mayor edad los dientes han sufrido mayor exposición a agentes dañinos como alimentos, masticación y hábitos nocivos como fumar con una tendencia a conservar un color mucho más amarillo.²⁷

El tipo y el grado de este cambio dependerá de una mezcla genética, uso y abuso de hábitos nocivos, el principal causante del cambio de color es la pérdida del grosor del esmalte, el aumento del espesor de la dentina y la retracción de la pulpa, debido a la deposición de dentina terciaria; y a mayor grosor de dentina mayor color.²⁷

6.4 Estructura del peróxido de hidrógeno y su acción

El peróxido de hidrógeno es un compuesto químico con características de un líquido polar, con enlaces fuertes entre el Oxígeno y el Hidrógeno similar al agua, pero con una viscosidad mayor (Fig.25), presentando un eje de simetría C_2 , (eje rotado a 180°); es un agente oxidativo que tiene la cualidad de liberar radicales libres, siendo un compuesto ácido, cuando pierde su radical queda solo el peridroxil, dejando actuar al oxígeno sobre el diente; el nivel optimo de pH para que el blanqueamiento ocurra es entre 9.5 y 10.8.²⁶ (Fig. 26)

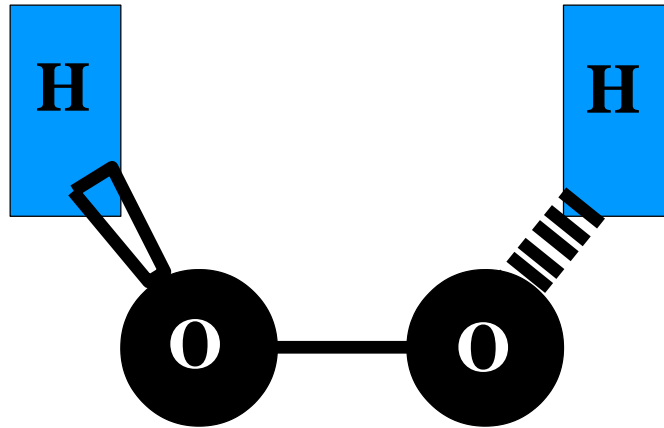


Fig. 25 (Imagen del Autor)
Estructura del peróxido de hidrógeno

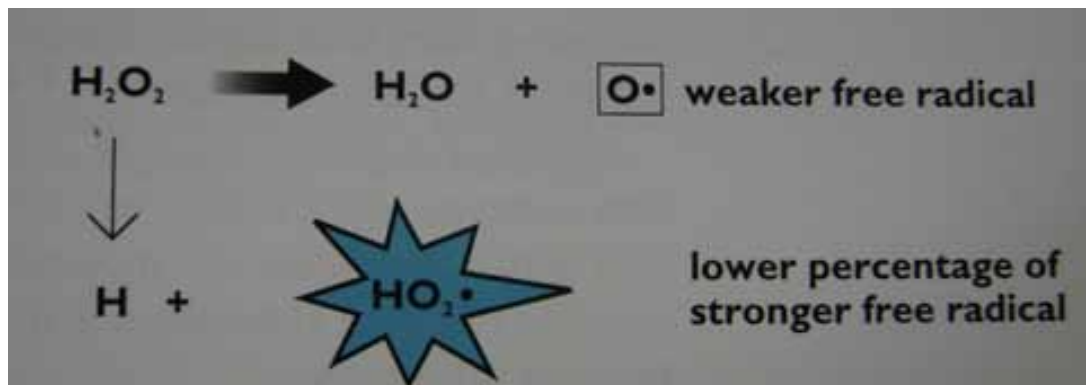


Fig. 26 La imagen nos muestra como el H_2O_2 al entrar en contacto con el medio oral empiezan una serie de reacciones liberando oxígeno e hidrógeno que ayudan a la eliminación de las manchas.²⁶

Cuando se aplica el peróxido de hidrógeno, como primer paso se tiene la liberación de los radicales libres del oxígeno; en segunda instancia la unión del oxígeno con los pigmentos que se encuentran en el diente, los que tienen una estructura de anillo unidos unos con otros, el oxígeno corta las cadenas de los pigmentos hasta convertirlos en compuestos inestables; este procedimiento ocurre varias veces hasta que termina hidrolizando los pigmentos formando dióxido de carbono y agua (Fig.27).²⁶

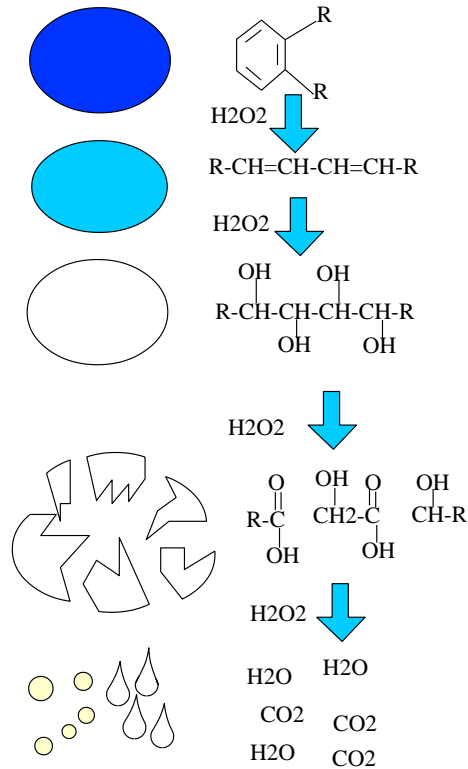


Fig. 27 (Imagen del Autor)

El blanqueamiento se va dando en etapas con la aplicación del peróxido de hidrógeno al pigmento y su intercalación hasta la formación de dióxido de carbón y agua.

6.5 Peróxido de carbamida composición

El peróxido de carbamida ($\text{CH}_6\text{N}_2\text{O}_3$) al 10 % en una solución acuosa se utiliza en la mayoría de los kits de blanqueamiento domiciliario. Su composición es por la unión de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 3,35% y de urea ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$) al 6,65%. El peróxido de carbamida líquido se encuentra en presentaciones del 15-20% para el blanqueamiento domiciliario supervisado por el odontólogo. Una solución al 15% emite peróxido de hidrógeno al 5.4% y la solución al 20% emite una concentración de peróxido de hidrógeno al 7%(Fig. 28).²⁷

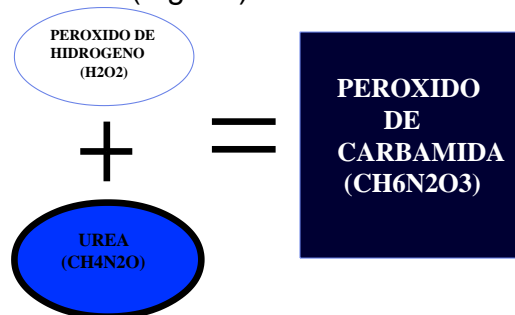


Fig. 28 Composición del peróxido de carbamida.

6.6 Efectos histológicos del blanqueamiento dental

El peróxido de hidrógeno y el calor se ocupan en el tratamiento de blanqueamiento dental, teniendo efectos potencialmente nocivos para la pulpa y el ligamento periodontal.²⁶

Desde 1951 se viene demostrando que estos agentes pueden pasar del esmalte a la dentina y llegar hasta la pulpa. Con otros estudios se demostró que el peróxido de hidrógeno en contacto con la encía tiene un efecto de toxicidad muy alto provocando que las células se mueran. Cohen, demostró en un estudio realizado en 45 premolares extraídos donde aplico una solución isotónica con éter, peróxido de hidrógeno y ácido clorhídrico aplicándose por 2.5 minutos, después de realizar el estudio histológico se demostró que la pulpa empezaba a mostrar cambios significativos con la presencia de células inflamatorias.³⁰

En otros estudios se demostró que al momento de realizar el blanqueamiento dental y transcurriendo una hora, se extrajo el diente donde se aprecio dentro de la dentina una zona donde los núcleos de los odontoblastos fueron aspirados al interior de la dentina por la acción del agente blanqueador.²⁶ (Fig. 29)

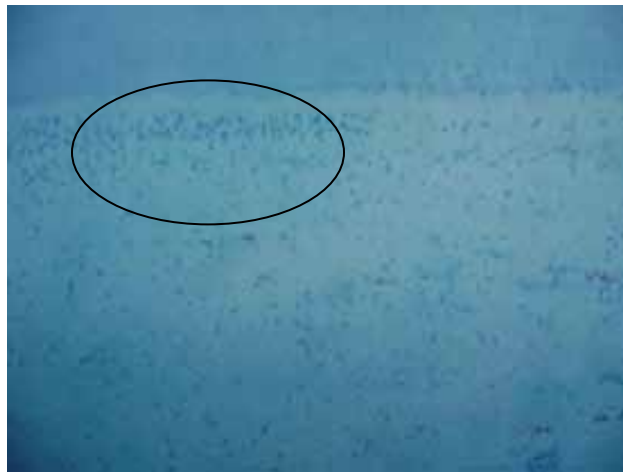


Fig.29 Estudio histológico que muestra la presencia de los odontoblastos que están siendo aspirados al interior de la dentina .²⁶

7. Apoptosis

La apoptosis es la función que controla la muerte de una unidad biológica de forma programada; esta muerte celular programada, es parte integral del desarrollo de los tejidos tanto de plantas, animales pluricelulares y metazoo. La existencia de la apoptosis en seres unicelulares es discutida debido al escaso sentido biológico que tendría, ya que no provoca una respuesta inflamatoria característica de la necrosis. En otras palabras, la apoptosis no se parece al tipo de reacción resultante del daño a los tejidos, debido a infecciones patogénicas o accidentes, por que no se hincha y no se revienta por lo tanto no derrama su contenido al espacio intercelular que puede ser dañino. Las células en proceso de apoptosis presentan las siguientes características: los núcleos se encogen y con frecuencia se fragmentan, la pared celular tiene cambios morfológicos, vacuolización severa de las mitocondrias, crecimiento de los lisosomas, entrada de calcio y activación de las proteasas y fosfatasas y por último la creación de los cuerpos apoptóticos. De esta manera, puede ser eficazmente englobada y fagocitada, seguidamente los componentes son reutilizados por macrófagos o por células del tejido adyacente.³¹

Todo organismo está preparado para luchar por la vida; la supervivencia es la función que desarrolla una unidad biológica homeostática, dentro de sus relaciones con otras entidades afines y locales, siendo sus procesos metabólicos dependientes de las señales recibidas de otras unidades biológicas, para la permanencia en el medio, dentro de los límites sostenibles marcados por la termodinámica.³¹

7.1 Creación de Radicales Libres

Un radical libre es cualquier molécula que contiene uno o más electrones no apareados. En las células aeróbicas existen diversas vías que conducen a la producción de radicales libres derivados del oxígeno. Las fuentes principales son las enzimas asociadas al metabolismo del ácido araquidónico, como la ciclooxigenasa, lipoxigenasa y citocromo P-450.³²

La presencia y ubicuidad de enzimas (superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasas) que eliminan productos secundarios de la vía univalente en las células aeróbicas, sugieren que los aniones superóxidos y el peróxido de hidrógeno son productos secundarios importantes del metabolismo oxidativo. Las especies de oxígeno reactivo pueden lesionar macromoléculas como el ADN, los hidratos de carbono y las proteínas. Estas especies de oxígeno citotóxico pueden clasificarse en 2 tipos: a) Los radicales libres, como el radical superóxido (O^2) y el radical hidroxilo (OH) y b) las especies de oxígeno no radicales, como el peróxido de hidrógeno (H^2O^2), el oxígeno simple (O^1), que resulta una especie muy tóxica, el peroxinitrito (ONOO) y el ácido hipocloroso (HOCL).³²

Los radicales inestables atacan componentes celulares causando daño sobre los lípidos, proteínas y ADN, los cuales pueden iniciar una cadena de eventos que dan como resultado lesión celular. Estos procesos reductivos son acelerados por la presencia de metales de transición como el Fe, Cu y enzimas específicas como: monoxigenasas y ciertas oxidasas.³³

Los radicales libres se producen continuamente en el organismo por medio de reacciones bioquímicas de oxido reducción (REDOX), que tienen lugar en el metabolismo normal de las células, en los fagocitos se tiene en una reacción inflamatoria controlada, como respuesta a la exposición de radiaciones ionizantes como son: rayos ultravioletas, contaminación ambiental, humo de cigarrillos, hiperoxia, exceso de ejercicio e isquemia.³³

La célula depende de la mitocondria para su metabolismo, en ese proceso, se producen los denominados radicales libres, o elementos moleculares altamente reactivos. En otras palabras, son moléculas que reaccionan con facilidad tendiendo a mezclarse de forma inapropiada con otros elementos necesarios para la producción de energía de la célula, contaminando los procesos metabólicos, dañando capas proteicas y obligando a la mitocondria a un aumento de trabajo para la obtención del aporte energético, calculado para la mitad del trabajo realizado.³³

Una mitocondria dañada retrasa los ciclos metabólicos, desacelera el proceso energético y consume más energía. El exceso de energía consumida para el mismo rendimiento inhibe la capacidad de comunicación con las células vecinas.³³

Todo esto tiene márgenes de tolerancia y cuando la célula no consigue el ATP suficiente para su funcionamiento, el citoplasma y la membrana cambian su configuración, entrando en lo que se denomina senescencia. Las células T detectan las células senescentes y les insertan la información necesaria para que inicien su programa de autodestrucción o apoptosis.³⁴

7.2 Mecanismos apoptóticos

Dado que la apoptosis actúa como oponente a la mitosis, es muy importante su relación con el ciclo celular. En el ciclo celular hay cuatro fases: fase de control celular (G1), síntesis de ADN (S) fase de control (G2) y la fase (M) que conforma la mitosis y la citocinesis. La apoptosis puede iniciarse en el tercio final de G1 para impedir que una célula dañada ingrese a la fase de síntesis de manera que las mutaciones no se reproduzcan durante la replicación del ADN y en la fase G2 para impedir que las células que no hayan llegado a la madurez entren en mitosis.³⁴

Los motores del ciclo celular son complejos proteicos formados por subunidades llamadas ciclinas y kinasas dependientes de ciclinas sintetizadas por genes específicos. La síntesis de estos complejos es constante porque son altamente inestables, de ahí que el nivel de ellos varíe de acuerdo al momento evolutivo de la fase a que están asignados. Así en el avance de la fase G1 a la S

actúa la ciclina D asociada a las cinasas ciclinodependientes 2, 4 y 6. En la segunda mitad del G1 aumenta la presencia de ciclina E con la cinasa ciclinodependiente 2. En la fase de síntesis actúa la ciclina A con cdk 2 y en la fase G2, la ciclina B con cdk 2. En la fase G1 se han podido determinar dos puntos importantes: G0 en la mitad de la fase donde el ciclo puede detenerse y la célula bloquea su crecimiento, pero se mantiene metabólicamente activa y un punto de restricción en unión de los 2/3 con 1/3 final de esta fase en que se puede detener el ciclo para corregir defectos celulares en especial el ADN, lo que no se consigue inducir es al mecanismo de muerte celular.³⁴ En la fase G2 también existen elementos de detección de inmadurez celular que inducen a la apoptosis cuando la célula no está capacitada para entrar en mitosis. De esta manera, durante el ciclo celular se determina si la célula debe entrar en el proceso de autodestrucción o continuar el ciclo y dividirse. Se ejerce así un balance entre mitosis y apoptosis, regulando la población celular de cada tejido.³⁴

El mecanismo molecular que controla la apoptosis está mediada por diversos agentes, como el complejo de Cisteinil aspartato proteasas (caspasas), siendo uno de los más importantes y mejor estudiado. Se han descrito 11 caspasas en células humanas que provocan una degradación proteica bien definida hasta llegar a la formación de cuerpos apoptóticos. Algunas caspasas son "iniciadoras" y otras "efectoras" del proceso catalítico, actuando sobre endonucleasas que son las responsables directas de la fragmentación del ADN. La cadena de degradación proteica tiene sucesivos clivajes dependientes de la ubicación del ácido aspártico que se repite en la estructura de la enzima. La activación de las caspasas, que existen en calidad de pro-caspasas inactivas, se produce por diversas vías en las que participan varios complejos moleculares.³⁴

Ejecución del programa genético

Se caracteriza por hipereosinofilia y retracción citoplasmática con fragmentación nuclear. La ejecución en sí depende de factores externos a la célula generalmente por variaciones en la concentración de factores de crecimiento, estímulos para la permanencia en el tejido o bien estímulos apoptóticos directos desde linfocitos que activan al ligando FAS (factor asociado a dominio de muerte) localizado en la membrana celular, o bien por factores internos que la célula expresa metabólicamente generando su programa de muerte, como consecuencia de un daño celular. Se debe matizar "daño", puesto que en este contexto, daño implica desde oxidación por radicales libres que la célula evalúa como irreparable, hasta el acortamiento de telómeros debido a sucesivos ciclos de división celular, lo cual, en última instancia, produciría daño genético por pérdida de información en caso de nuevas divisiones celulares, pasando esta definición de "daño" por todos los que generan apoptosis, ninguno de los cuales sería suficiente para suspender el programa en su caso hablaríamos de célula tumoral, es decir, aquella que debiendo ejecutar su programa de apoptosis no lo hace y continúa dividiéndose.³⁴

Existen mecanismos pro y anti apoptóticos regulados genéticamente, que actúan de forma activa y equilibrada. Como función necesaria para evitar la sobre

producción celular, siendo un proceso ordenado y "silencioso" que no produce reacción tisular y por ello difícil de captar. En 1972, Kerr y col., estudiando organelos en células neoplásicas, detectaron que muchas células desaparecían en los cultivos. Esto llevó al estudio de imágenes cinemáticas que mostraron mediante microscopía electrónica las alteraciones que sufre la célula en un periodo aproximado de una hora.³⁴

La apoptosis puede estar frenada, en equilibrio o estimulada; por ejemplo, está frenada durante el desarrollo de espermatogonias, en las criptas de las glándulas intestinales y durante la lactancia en su período preparatorio, en que el tejido mamario aumenta su masa celular. Está en equilibrio respecto de la mitosis en los tejidos adultos sanos. Es muy significativo su rol homeostático en la médula ósea, donde debe destruir de manera constante la mitad de una inmensa cantidad de células que sólo en leucocitos significa 5×10 cada veinticuatro horas. Está estimulada cuando existen células envejecidas, mutadas, neoplásicas o no neoplásicas, alteradas por tóxicos y las que están en proceso de metamorfosis o atresia. Se ha estudiado esta condición en neutrófilos envejecidos, en megacariocitos con citoplasma agotado por producción excesiva de plaquetas, en la atresia folicular del ovario, en folículos pilosos en evolución y en la mama durante la involución post-lactancia.³⁴

Apoptosis y necrosis

Las dos formas de muerte celular son habituales en el organismo: necrosis y apoptosis. Las características morfológicas de ambas permiten, en la mayoría de los tejidos, establecer claras diferencias.³⁴

A diferencia de la apoptosis, la necrosis es una forma de muerte celular que resulta de un proceso pasivo, accidental y que es consecuencia de la destrucción progresiva de la estructura con alteración definitiva de la función normal en un daño irreversible. Este daño está desencadenado por cambios ambientales como la isquemia, temperaturas extremas y traumatismos mecánicos.³⁴ En la apoptosis el proceso afecta a determinadas células, no necesariamente contiguas, y no a todas en un área tisular. La membrana celular no se destruye, lo que impide el escape al espacio extracelular de su contenido resultando un proceso "silencioso" sin inflamación. En el citoplasma se produce una granulación fina, conservando algunos organelos, en especial las mitocondrias que tienen un rol interactivo importante. A nivel nuclear la cromatina se condensa agrupada en varios sectores formando cuerpos apoptóticos. La membrana celular se recoge sobre las eminencias globuliformes que forman los elementos deteriorados del citoplasma y núcleo. Finalmente, fagocitos captan la célula en su totalidad impidiendo que se produzca alarma en el resto del tejido. Se ha demostrado, al menos en tejidos epiteliales, que si algo de material apoptótico escapa a la acción de los fagocitos es captado por células vecinas. La participación de células vecinas en este proceso se manifiesta además por la capacidad de éstas de enviar señales moleculares a la célula que debe morir como mecanismo complementario al que desarrolla la célula misma, cuando se determina molecularmente su

autodestrucción. El proceso de apoptosis dura entre 30 y 60 minutos en células en cultivo. Uno de los más lentos se produce en células hepáticas empleando como promedio 3 horas. El estudio e identificación específico de cuerpos apoptóticos se ha logrado con tinciones derivadas de la uridina. Sin embargo, en algunas células como las neuronas, la uridina tiñe también tejidos necróticos perdiendo la especificidad. En tales casos se recurre a anticuerpos monoclonales capaces de reconocer fragmentos de ADN integrados en los cuerpos apoptóticos. La imagen que da la apoptosis al microscopio electrónico se caracteriza por la presencia de fragmentos de cromatina agrupados en conglomerados globuliformes, la granulación fina del contenido citoplasmático, la persistencia de algunos orgánulos hasta el final del proceso, como las mitocondrias, y la integridad de la membrana celular.³⁴

Mitosis y Apoptosis

Los genes que desencadenan la reproducción también entran en juego en el final de la misma. Es una cuestión de combinaciones de familias de genes. Unas cancelan a las otras, y cuando no son cancelables, entonces buscan la compensación de la carga en otro tipo de familia de genes, teniendo en consecuencia la ejecución del programa de apoptosis.³⁴

En los ciclos metabólicos, las células reciben y emiten moléculas. A estos procesos, se les denomina señales de supervivencia, siendo las responsables de mantener a la unidad biológica en un estado óptimo. En las comunicaciones celulares, estas señales están encaminadas a informar a la población celular cuando el medio es propicio y cuando no lo es.³⁴

Para que se lleve a cabo la apoptosis en la célula se puede presentar 2 vías por la que la célula llega a la muerte, una mediada por factores internos (vía intrínseca) y otra por factores externos (vía extrínseca). Aunque estas 2 vías son independientes, se encuentran en un punto intermedio donde las 2 vías se unen para llegar a la apoptosis.³⁴

7.2.1 Vía extrínseca

La vía extrínseca o de los "receptores de muerte" establece conexiones con el espacio extracelular, recibiendo señales proapoptóticas desde el exterior y de las células vecinas. Dos familias de receptores se han identificado con estas características: la proteína Fas y el factor de necrosis tumoral TNF.³⁴

La proteína transmembrana Fas en su porción intracelular enlaza con un factor intermedio denominado FADD (factor asociado a dominio de muerte), nombre que sólo señala que está comprometido con la zona de la molécula Fas

que participa en la muerte celular, activando las Caspasa 8 y 10. En cambio, si la parte interna de la molécula se asocia a otro factor llamado DaXX, se activan proteína-quinasas que conducen al efecto contrario, es decir, estimulan el ciclo celular y la mitosis. Esta vía Fas permanece inactiva hasta que se produce en su parte externa el enlace con un cofactor llamado ligando Fas, proteína que actúa como detonador, que enciende una vía en que sólo las caspasas están inactivas y el resto de la cadena está preparada para recibir el enlace exterior. Esta característica permite actuar con gran rapidez sin necesidad de sintetizar otros factores.³⁴

Algo similar sucede con el otro receptor de membrana TNF. Su porción intracelular conecta con complejos intermedios como el Tradd y Raidd que activan caspasas "iniciadoras" de la apoptosis. Pero si se asocian a otro complejo llamado Traf activan proteína-quinasas y estimulan la proliferación celular, es decir, el efecto contrario.³⁵

Las alternativas de una misma vía de actuar en pro o en contra de la apoptosis se repiten en otros mecanismos.³⁵

7.2.2 Vía intrínseca o mitocondrial

Otra vía de inducción de apoptosis es la vía llamada mitocondrial. Las proteínas de la familia de Bcl-2 regulan la apoptosis ejerciendo su acción sobre la mitocondria. La activación de proteínas pro-apoptóticas de la familia de Bcl-2 produce un poro en la membrana externa de las mitocondrias que permite la liberación de numerosas proteínas del espacio intermembranal; entre ellas, el citocromo c³⁶ (Fig. 30).

El citocromo c, una vez en el citosol, activa un complejo proteico llamado "apoptosoma", que activa directamente a la caspasa-9.³⁷ Una vez que la caspasa-9 está activada, ésta activa a las caspasas efectoras como la caspasa-3, lo que desencadena las últimas fases de la apoptosis.³⁸

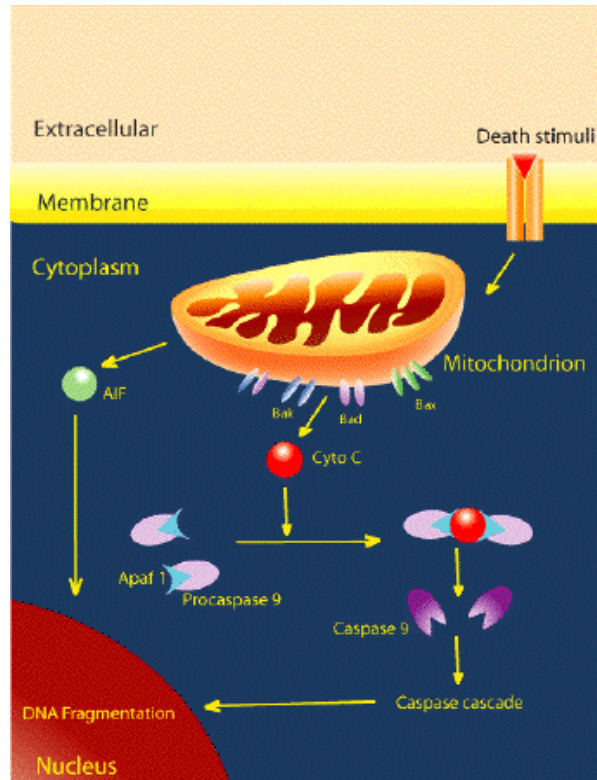


Fig. 30 Vía intrínseca de la apoptosis se da con el intermediario de la mitocondria y tiene acción al momento que el citocromo C se libera.³⁹

Las proteínas de la familia de Bcl-2 se agrupan a la vez en tres familias: la familia de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, la familia de proteínas proapoptóticas de tipo "multidominio" Bax, y las proteínas proapoptóticas de tipo "BH3-only" Bid, Bim, Bad.³⁶ Las proteínas tipo multidominio pueden producir poros por sí solas en liposomas, lo que indica que probablemente son suficientes para formar el poro mitocondrial que permite la liberación del citocromo c. Las proteínas tipo *BH3-only* activan a estas proteínas, y las antiapoptóticas inhiben la formación del poro. Estas proteínas son los reguladores más importantes del proceso de apoptosis. Una vez activado el apoptosoma, ocurre este cliva a la procaspasa 3, activándola a Caspasa 3 la que es realmente la Caspasa efectora. Por otro lado, a la salida de citocromo c desde la mitocondria, otra proteína llamada SMAC/DIABLO la cual es inhibidor de los inhibidores de caspasas sale de la misma. Así se tiene una vía en la que la Caspasa efectora está libre de actuar dado que sus inhibidores fueron evitados por SMAC/DIABLO y la apoptosis continua de forma natural.⁴⁰ (Fig. 31)

La vía mitocondrial puede conectarse también con la vía de receptores de muerte, ya que una vez activada la caspasa-8 por dichos receptores, esta Caspasa activa a la proteína Bid, lo que provoca la apertura del poro mitocondrial y la activación de la caspasa-9.⁴¹

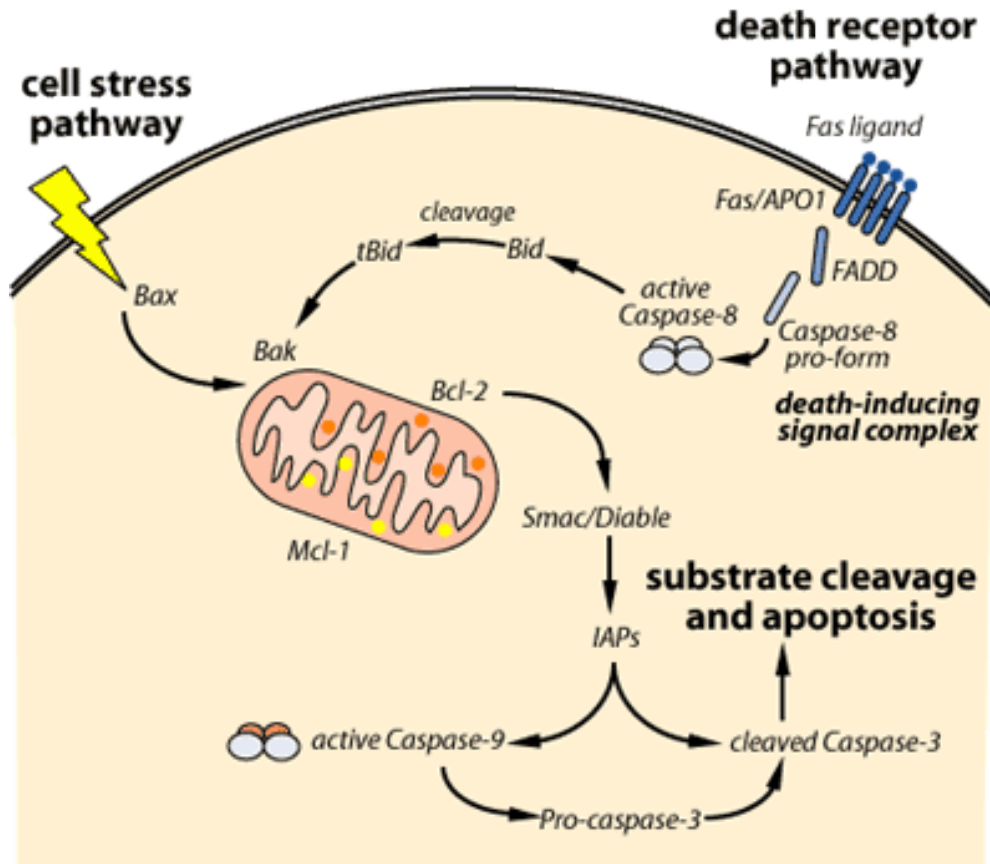


Fig. 31 Vía intrínseca de la apoptosis nos muestra como también puede existir una vía alterna que nos puede mandar a la célula a muerte.⁴²

7.3 Funciones de la apoptosis

Una de las principales funciones de la apoptosis es la eliminación de tejidos dañados o infectados.

La apoptosis puede ocurrir, por ejemplo, cuando una célula se encuentra dañada y no tiene posibilidades de ser reparada, o cuando ha sido infectada por un virus. La "decisión" de iniciar la apoptosis puede provenir de la célula misma, del tejido circundante o de una reacción proveniente del sistema inmune. Cuando la capacidad de una célula para realizar la apoptosis se encuentra dañada como se da en la mutación, o si el inicio de la apoptosis ha sido bloqueado por un virus, la célula dañada puede continuar dividiéndose sin mayor restricción, resultando en un tumor que puede ser de carácter canceroso. Por ejemplo, como parte del "secuestro" del sistema genético de la célula llevado a cabo por los virus del papiloma humano, un gen denominado E6 se expresa originando un producto que degrada la proteína p53, vital para la ruta apoptótica.³⁶

También producen condiciones de stress como la falta de alimentos, así como el daño del ADN provocado por tóxicos o radiación, pueden inducir a la

célula a comenzar un proceso apoptótico. Un ejemplo sería la apoptosis mediada por la enzima nuclear, poli-ADP-ribosa polimerasa-1 crucial en el mantenimiento de la integridad genómica. Una activación masiva de dicha enzima puede depletar la célula de nucleótidos ricos en energía, provocando una cadena de transducción de señales del núcleo a la mitocondria que iniciaría la apoptosis.³⁶

7.3.1 Procesos apoptóticos en el desarrollo

Durante el desarrollo embrionario la apoptosis regula el crecimiento celular y tisular, desde la desaparición de las membranas interdigitales para el desarrollo normal de los dedos hasta la apoptosis en el ojo para la correcta formación del cristalino y los párpados pasando por multitud de procesos en estudio.³⁶

En los animales que pasan por distintos estadios la apoptosis regula el desarrollo controlado además el paso de un estadio de crecimiento al siguiente (larva, ninfa, juvenil, adulto, etc.). En el caso de las ranas la apoptosis controla, durante la metamorfosis, la desaparición de la aleta caudal de los renacuajos.³⁶

7.3.2 Homeostasis

En un organismo adulto, la cantidad de células que componen un órgano o tejido debe permanecer constante, dentro de ciertos límites. Las células de la sangre y de piel, por ejemplo, son constantemente renovadas por sus respectivas células progenitoras. Por lo tanto, esta proliferación de nuevas células tiene que ser compensada por la muerte de otras células. A este proceso se le conoce como homeostasis, aunque algunos autores e investigadores han sugerido homeocinesis como un término más preciso y elocuente.³⁶

La homeostasis se logra cuando la relación entre la mitosis y la muerte celular se encuentra en equilibrio. Si este equilibrio se rompe, pueden ocurrir dos cosas:

1. Las células se dividen más rápido de lo que mueren, y desarrollan un tumor.
2. Las células se dividen más lentamente de lo que mueren, produciéndose un grave trastorno de pérdida celular.

Ambos estados pueden ser fatales o potencialmente dañinos.⁴³

7.3.3 Regulación del sistema inmunitario

Ciertas células del sistema inmunitario como: los linfocitos B y linfocitos T, son sofisticados agentes de la respuesta defensiva del organismo frente a infecciones, así como células propias que hayan adquirido o desarrollado algún tipo de malignidad. Para llevar a cabo su trabajo, las células B y T deben tener la habilidad de diferenciar entre lo propio de lo extraño y lo sano de lo enfermo, gracias a la especialidad de sus receptores. De hecho, los linfocitos T citotóxico pueden ser activados por fragmentos de proteínas expresadas inapropiadamente o por antígenos extraños producidos como consecuencia de una infección intracelular. Después de activarse tienen la capacidad de migrar, proliferar y reconocer las células afectadas, induciendo una respuesta de muerte celular programada.⁴⁴

Los receptores de las células B y T inmaduras no se generan por procesos de una elevada precisión, sino por procesos aleatorios de elevada capacidad para generar variabilidad. Esto significa que muchas de estas células inmaduras pueden no ser efectivas o ser peligrosas para el propio organismo porque sus receptores son capaces de reconocer con elevada afinidad antígenos propios. Si estas células fuesen liberadas sin otros procesamientos, muchas podrían volverse autor reactivas y atacar células sanas. El mecanismo por el que el sistema inmune regula este proceso es la eliminación tanto de los no efectivos como los potencialmente auto reactivos mediante apoptosis.⁴⁴

Como se ha descrito en los anteriores apartados, todos los tejidos dependen de una continua recepción de señales de supervivencia. En el caso de las células T, mientras se desarrollan y maduran en el timo, las señales de supervivencia dependen de su capacidad para reconocer antígenos extraños. Aquellas que no superan esta prueba, alrededor de un 97 % de las células T producidas, son eliminadas por apoptosis. Las supervivientes son testadas a su vez frente a antígenos propios, y aquellas que reconocen estos antígenos con elevada afinidad son eliminadas de la misma manera.⁴⁴

Por lo tanto, el desarrollo de un sistema inmune maduro y efectivo depende de una serie de reguladores positivos y negativos de las vías de apoptosis.³⁶

7.4 Patologías vinculadas con la apoptosis

La apoptosis es una función biológica de gran relevancia en la patogenia de varias enfermedades estudiadas hasta el momento, entre los que se destaca el cáncer, malformaciones, trastornos metabólicos, neuropatías, lesiones miocárdicas y trastornos del sistema inmunitario.⁴⁵

7.4.1 Patologías asociadas a inhibición de apoptosis

Entre las enfermedades que se asocian a la inhibición de la apoptosis se encuentran:

Cáncer: linfoma no Hodgkin folicular con un aumento en Bcl-2, carcinoma con un aumento de p53, tumores hormono-dependientes.

Enfermedades auto inmunitario: lupus eritematoso sistémico, glomerulonefritis.

Infecciones virales: Herpes virus, Poxvirus, Adenovirus.³⁶

7.4.2 Patologías asociadas a aumento de apoptosis

Entre las enfermedades que se asocian al aumento de la apoptosis se encuentran:
Sida

Enfermedades neurodegenerativas: enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, retinitis pigmentosa, degeneración cerebelosa.

Síndromes mielodisplásicos (MDS): anemia aplástica.

Daño isquémico: infarto de miocardio, apoplejía, daño por repercusión, daño hepático por alcoholismo.⁴⁶

8. Objetivo General

Caracterizar el efecto de peróxido de hidrógeno sobre la activación de la apoptosis dependiente de la mitocondria en fibroblastos gingivales humanos.

9. Objetivo Específico

Estudiar el efecto del peróxido de hidrógeno sobre la activación de la vía intrínseca de la apoptosis.

1. Se caracterizará el efecto del peróxido de hidrógeno sobre la expresión de Bcl-2, Bax, Bid, Caspasa 8 y 9.
2. Se estudiará el efecto del peróxido hidrógeno sobre la viabilidad celular.

10. Hipótesis verdadera

Sí el peróxido de hidrógeno produce estrés oxidativo en los fibroblastos gingivales, entonces, cuando el peróxido de hidrógeno cambia el medio de las células se ocasionaría la muerte de ellas.

11. Hipótesis falsa

Sí el peróxido de hidrógeno no produce estrés oxidativo en los fibroblastos gingivales entonces, cuando el peróxido de hidrógeno se coloque con la célula esta no tendrá la muerte.

12. Tipo de Estudio

El estudio va a ser experimental, comparativo y prospectivo.

13. Material y Métodos

13.1. Métodos

Dentro de los métodos utilizados para el análisis de los experimentos se encuentran el ensayo de western Blot y el ensayo de viabilidad celular, que se explicarán a continuación.

13.1.1 Ensayo de Western-Blot

Los fibroblastos gingivales humanos (1×10^6 células/pozo) se crecieron en cajas de 6 pozos. Una vez que se tiene una confluencia de 80% se inició el ayuno de las células para después aplicar el tratamiento de peróxido de hidrógeno a diferentes concentraciones y tiempos, después del estímulo el medio se aspiró y las células se desprendieron ayudados de un gendarme en buffer de fosfatos salino (PBS) + 1 mM ortovanadato de sodio, la muestra se centrifugó a 5,000 rpm durante 10' y la pastilla se colocó con 50 μ l de buffer de lisis (0.05 M Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5 M PMSF, 10 μ g/ml leupeptina, 0.4 mM ortovanadato de sodio, 10 mM de fluoruro de sodio y 10 mM de pirofosfato de sodio), todos estos reactivos se obtienen de Sigma Chemical Co. La muestra se sonicó por treinta segundos en un baño con hielo. Para el ensayo de Western se utilizaron 150 μ g de proteína que se mezcla 1:1 con buffer de muestra 2x (20% glicerol, 4% SDS, 10% 2-mercaptoetanol, 0.05% azul de bromofenol y 1.25 M Tris-HCl pH 6.8; todos los reactivos se obtienen de Sigma Chemical Co. la muestra se cargó en un gel al 10% SDS-PAGE y se corrió a 40V por 2 hrs. Las proteínas celulares se transfirieron a una membrana de PVDF (Amersham) una hora a 0.3 amperes y 5 volts. Para verificar que se colocó igual concentración de proteína, las membranas se tiñen con rojo de Ponceau (Sigma Chemicals Co.). Posteriormente la membrana se bloqueó con 150 mM NaCl, 100mM Tris- HCl pH 7.8 (TBST) y 5% de suero albúmina de bovino por una hora, se lavó y se incubó con el anticuerpo primario se utilizando los siguientes anticuerpos: Bcl2, Bax, Bid, Caspasa 8 y 9 anti-conejo policlonal (1:1000) de (Santa Cruz Biotechnology). Las membranas se incuban durante toda la noche a 4°C y posteriormente se lavaran durante 3 ocasiones con TBST y se incubaron durante 2 hrs con el anticuerpo secundario, HPR-conjugado anti-ratón IgG (1:1000) ó anti- conejo IgG (1:1000) ó anti-cabra IgG (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology). Las bandas inmunoreactivas se revelaron utilizando el sustrato de quimio-luminiscencia (Santa Cruz Biotechnology) y la autoradiografía se obtiene después de exponer la película durante 7 min. Los experimentos se realizaron en 3 ocasiones por separado. Las muestras se analizaron con el sistema digital Lab-Works

13.1.2 Ensayo de Viabilidad Celular

La viabilidad celular se determinó usando el ensayo de MTT. Las sales de tetrazólium como el MTT son metabolizadas por las deshidrogenadas mitocondriales para formar el colorante azul de formazan. HGF (20,000 células) se sembraron toda la noche en DMEM + 10% SBF al siguiente día se trataran con peróxido de hidrógeno a las dosis y tiempos indicados según el protocolo. Posteriormente las células se incubaron por dos horas a 37°C con medio de cultivo que contenía 0.5 mg/ml de MTT. Al término se removió el sobrenadante y los cristales de formazan formados se solubilizaron con 100 µl de dimetil sulfóxido. Una alícuota de 100 µl se transfirió a cajas de 96 pozos y se leyeron la absorbencia a 550 mM en el lector de placas de ELISA (BioTek EL 808). Los experimentos se realizaron en tres diferentes ocasiones por triplicado.

13.2 Materiales

EQUIPO Y MARCA

Agitador magnético. (Nuova)
Balanza GA200. (Ohaus)
Baño de agitación. (Precision Scientific)
Cajas de cultivo celular de 6 pozos. (Costar)
Cámara de electroforesis vertical. (Hoeffer)
Cámara de transferencia. (Hoeffer)
Campana de flujo laminar (Nuair)
Centrífuga (Sorvall)
Espectrofotómetro (Perkin Elmer)
Gendarme (Costar)
Gradillas (Nalgene)
Incubadora (Nuair)
Megatoscopio
Microscopio de objetos invertidos C22 (Olympus)
Orbit Shaker (Labline)
Pipetas de 10ml y 5 ml (Finnipipette)
Potenciómetro (Equipar)
Probetas graduadas
Propipeta (Pepet-aid)
Sonicador (Lab-Line instruments)
Timer
Tubos clínicos
Tubos de ensayo
Tubos Eppendorf
Vasos de precipitado
Vortex (Scientific industries)

13.2.1 Selección y Tamaño de la Muestra

Se obtuvo una muestra de encía de un paciente femenino de 18 años sano, después de realizar la extracción del tercer molar superior que se realizó en la clínica de cirugía de la facultad de odontología. La encía se localizaba unida a la pared distal del tercer molar, dicha encía se separó del diente y se fraccionó en segmentos de 2 mm.

Dentro de los criterios de inclusión, exclusión y eliminación. La encía donadora obtenida estaba libre de inflamación, sangrado y cualquier otra patología identificable.

13.2.2 Cultivo de Células de la Encía Dental de Humanos.

Se obtuvo la muestra de encía del paciente que acudió a la clínica de cirugía, se seccionaron en fragmentos de 2 mm y se lavaron en solución de Hanks suplementada con 1% penicilina, estreptomocina y fungizona. Los cultivos se mantuvieron en un medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de dióxido de carbono, 95% aire. El medio de cultivo se cambió cada 2 días. Una vez que los cultivos se encontraban confluentes fueron recuperados por tripsinización (0.2% Tripsina y 0.02% EDTA) para su resiembra hasta el pase 9.

14. Reactivos:

Acrilamida (Sigma)

Antibiótico-Antimicótico 1% penicilina G sódica, estreptomicina, anfotericina B (GIBCO BRL).

Anticuerpos mouse monoclonal, Caspasa 8, rabbit polyclonal Caspasa 9, bcl-2, Bax (Santa Cruz Biotechnology)

Glicina (Baker)

Kit de quimioluminiscencia (Santa cruz Biotechnology)

Marcador de peso molecular (Bio-rad)

Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (GIBCO BRL)

Medio de cultivo de Hanks (GIBCO BRL)

Membrana de nitrocelulosa (Bio-rad)

NaCl (Baker)

PBS (SIGMA)

Persulfato de amonio

Suero bovino fetal (GIBCO BRL)

Trisma (Sigma)

Tripsina

Tween (Sigma)

Vanadato de sodio

15. Análisis de Datos

Los resultados se realizaron por 3 ocasiones por separado. Se analizaron con el software Labworks el cual obtiene la densidad óptica. Obtenido el promedio de los experimentos y comparados con el control de cada caso, el cual se toma como el 100% del basal. Sobre estos datos se obtuvieron los gráficos. Se muestra en los resultados un experimento representativo y el análisis gráfico del total de los casos. Se representaran como la media \pm Error Standard.

16. Resultados

Efecto del peróxido de hidrógeno sobre la viabilidad celular.

Se examinó el efecto del H_2O_2 sobre la viabilidad celular en fibroblastos gingivales humanos a diferentes dosis como se indica en la Fig. 32 A. Encontrando que el peróxido de hidrógeno promueve una disminución en la viabilidad de una manera dependiente de la dosis. El efecto máximo se obtuvo a una dosis de $300 \mu M$. Posteriormente con el propósito de estudiar el tiempo al cual produce un decremento en la viabilidad. Los fibroblastos gingivales humanos se trataron con $200 \mu M$ de H_2O_2 por varios periodos (0, 3, 6, 12, 24, 48 hrs) (Fig. 32 B). Nuestros resultados muestran una significativa disminución en la viabilidad. La máxima disminución se detectó después de las 12 horas de haber expuesto a los fibroblastos gingivales con H_2O_2 . El efecto máximo se detectó a las 48 hrs de tratamiento con H_2O_2 (Fig. 1-B).

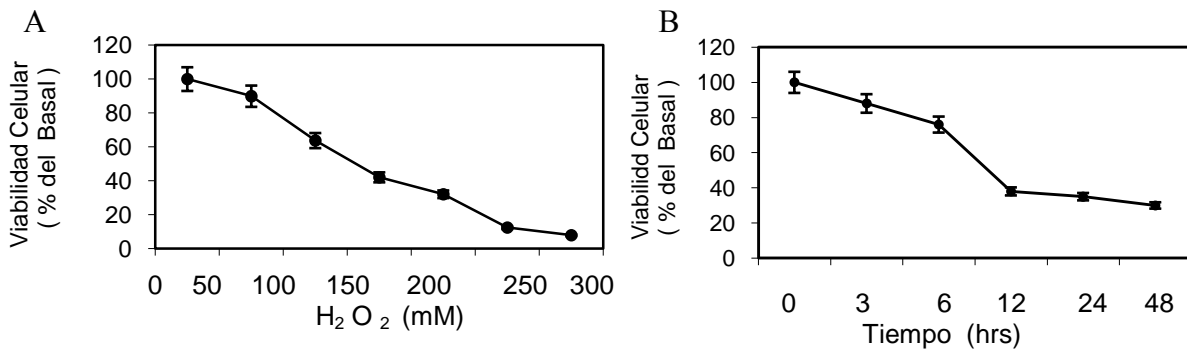


Fig. 32 Dosis dependiente y curso temporal del efecto del H_2O_2 sobre la viabilidad celular.

A) Las células (1×10^4) se expusieron a diferente concentración de H_2O_2 por 24 horas. B) Las células se expusieron a H_2O_2 ($200 \mu M$) por varios periodos. La viabilidad celular se detectó por el ensayo MTT. Los resultados corresponden a la media \pm SE de cinco diferentes experimentos realizados por triplicado.

Los resultados muestran que el H_2O_2 induce la muerte celular de una manera dependiente del tiempo y dosis, por lo que se decidió evaluar el efecto del peróxido sobre la expresión de Bax, Bid, Bcl-2, Caspasa 8, Caspasa 9.

Efecto del H₂O₂ sobre la expresión de Bax

Bax es una proteína pro-apoptótica miembro de la familia Bcl-2, con múltiples dominios como BH1, BH2, BH3 pero no en BH4 que es el dominio de Bcl-2 que parece ser la porción con la que se tiene su efecto antiapoptótico.

Bax se transloca a la membrana mitocondrial durante la apoptosis donde ocasiona MOMP (permeabilización de la membrana externa de la mitocondria). MOMP libera factores pro-apoptóticos como citocromo c y SMAC (caspasas activadores secundarios mitocondriales) La activación de Bax ocurre como un paso sencillo, cambio conformacional en la proteína, translocación y oligomerización en los poros de la membrana interna mitocondrial.

Se examinó el papel del peróxido de hidrógeno sobre la expresión de Bax. Los fibroblastos gingivales humanos se trataron con peróxido de hidrógeno (200 μ M) durante diferentes periodos. Los resultados muestran que el tratamiento con peróxido de hidrógeno induce una sobre expresión de Bax de manera dependiente del tiempo encontrando una máxima expresión de Bax a los 15 minutos y decreciendo a los 30 minutos (Fig. 33)

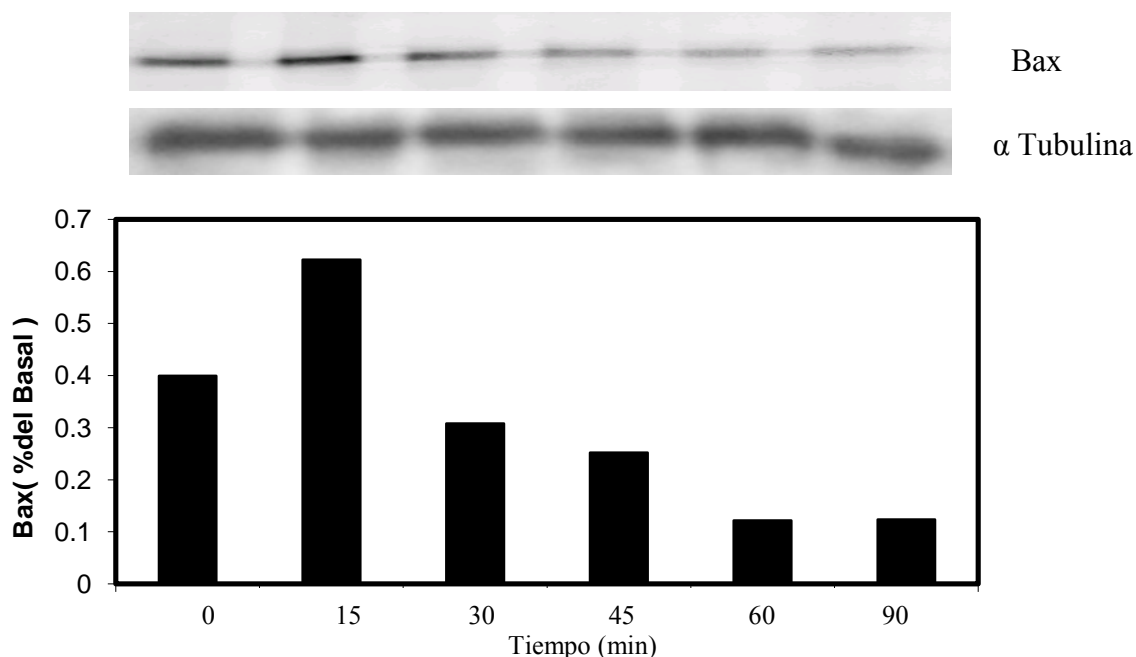


Fig. 33 Efecto del peróxido de hidrógeno sobre la expresión de Bax.

Las células (1×10^6) crecieron en cajas de 6 pozos durante toda la noche, posteriormente se ayunaron (suero bovino fetal 2%) al término se trataron con peróxido de hidrógeno (200 μ M) a los tiempos indicados en la figura. Se obtuvieron los extractos celulares y 50 μ g de proteína se procesaron por la técnica de Western-Blot. La imagen es una representativa de 3 experimentos que se realizaron por separado. El gráfico es el análisis densitométrico de la media \pm SE.

Los resultados del experimento muestran que el H₂O₂ induce a la sobre expresión de Bax de una manera dependiente del tiempo, por lo que se evaluó la expresión de Bid que es un agente proapoptótico que solo no tiene acción apoptótica

Efecto del H₂O₂ sobre la expresión de Bid.

Bid es una proteína que esta comprendida dentro de la clasificación de solo BH3 y miembro de la gran familia de Bcl-2

Esta proteína al igual que las de su familia (solo BH3) son proteínas proapoptoticas pero no ejercen su acción sin la presencia de Bax y Bak, de tal modo que actúan como sensores celulares de proceso de apoptosis

Su acción está relacionada en la inactivación de de las proteínas anti- apoptóticas como Bcl-2.

Una vez que los dominios de muerte son activados Bid es proteolizado por Caspasa 8 originado una forma truncada de Bid (tBid) que sufre una miristilacion en su extremo N terminal, previa a su inserción en la membrana externa mitocondrial

Otra acción de tBid es el cambio estructural e inserción de Bax en la membrana mitocondrial interaccionando la vía extrínseca y la intrínseca

Nosotros examinamos el papel del peróxido de hidrógeno sobre la expresión de Bid. Tratando a los fibroblastos gingivales humanos con peróxido de hidrógeno una concentración de (200 μM) durante diferentes periodos. Nuestros resultados muestran que el tratamiento con peróxido de hidrógeno induce una sobre expresión de Bid de manera dependiente del tiempo encontrando una máxima expresión de Bid a los 30 minutos y decreciendo importante a los 45 minutos ya que esta proteína se proteoliza en tBid (Fig. 34)

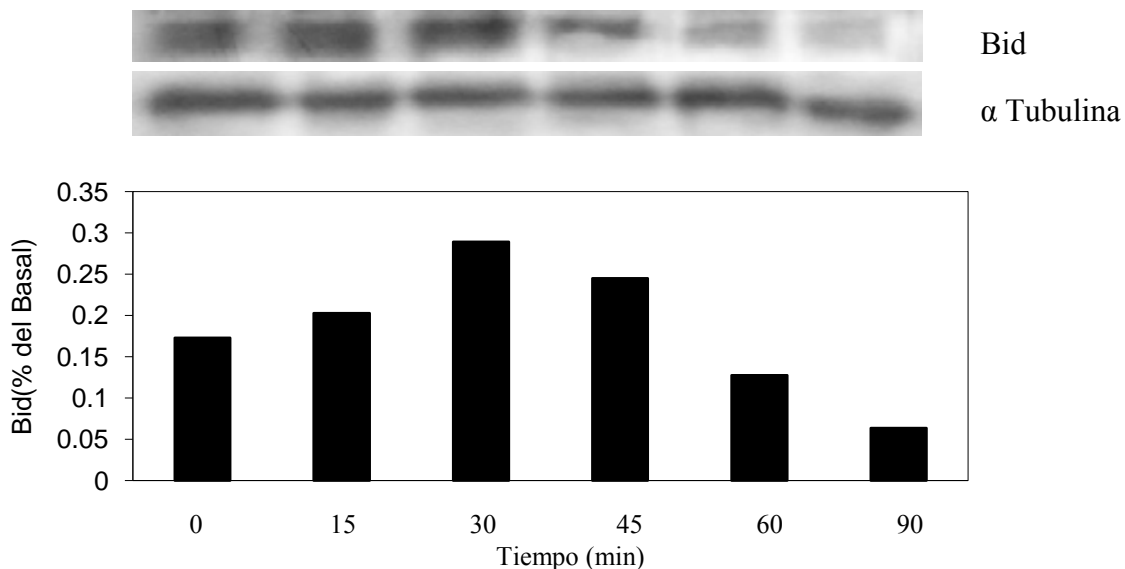


Fig. 34 Efecto del peróxido de hidrógeno sobre la expresión de Bid.

Las células (1×10^6) se crecieron en cajas de 6 pozos durante toda la noche, posteriormente se ayunaron (suero bovino fetal 2%) al término se trataron con peróxido de hidrógeno (200 μM) a los tiempos indicados en la figura. Se obtuvieron los extractos celulares y 50 μg de proteína se procesaron por la técnica de Western-Blot. La imagen es una representativa de 3 experimentos que se realizaron por separado. El gráfico es el análisis densitométrico de la media \pm SE.

Nuestro resultado muestra que el H₂O₂ induce a una sobre expresión de Bid y ya que este actúa como inhibidor de Bcl-2 decidimos evaluar el comportamiento de este agente anti apoptótico

Efecto del H₂O₂ sobre la expresión de BCL-2.

Bcl-2 es un grupo de proteasas, está relacionada muy íntimamente con 3 membranas intracelulares: membrana mitocondrial, envoltura nuclear y el retículo endoplasmático gracias a su extremo carboxilo terminal que es sumamente hidrofóbico

La membrana mitocondrial se encuentra constituida por esta proteína y puede activar o inactivar de la [transición de la permeabilidad mitocondrial de los poro](#), sus homólogos Bcl-xl y Bcl-w, solo se insertan en la membrana mitocondrial una vez que son activados por una señal apoptótica.

Nosotros evaluamos el efecto del peróxido de hidrógeno sobre la expresión de Bcl-2. Encontrando que el tratamiento con peróxido de hidrógeno en fibroblastos gingivales humanos degrada la presencia de Bcl2 de una manera dependiente del tiempo. (Fig. 35)

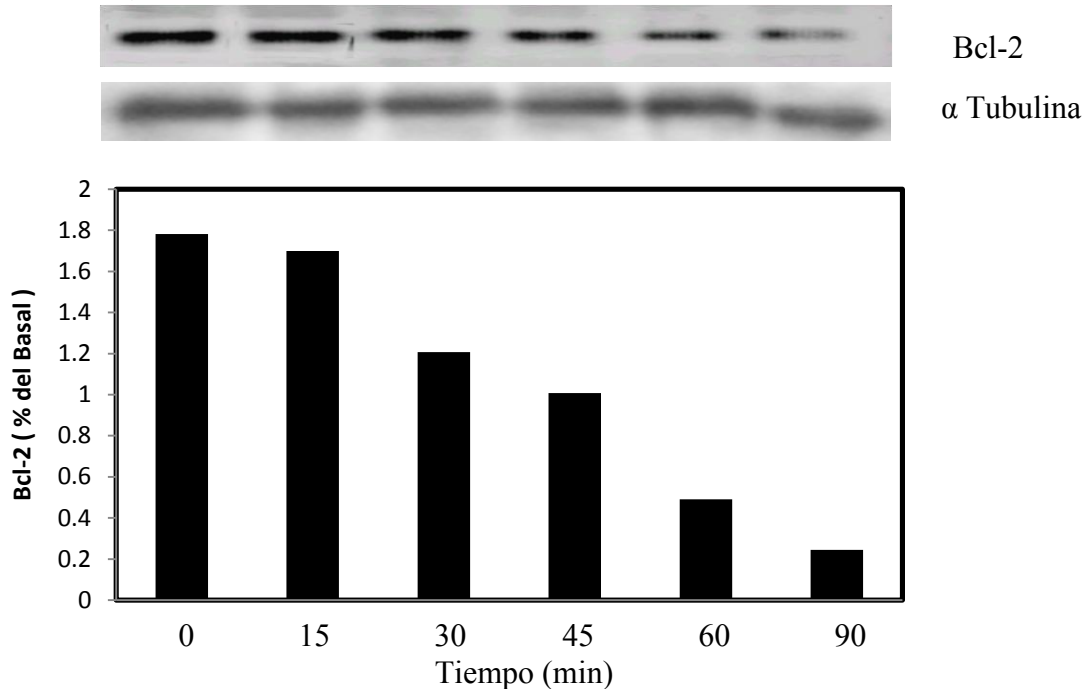


Fig. 35 Efecto del peróxido de hidrógeno sobre la expresión de Bcl-2.

Las células (1×10^6) se crecieron en cajas de 6 pozos, posteriormente se ayunaron (suero bovino fetal 2%) al término se trataron con peróxido de hidrógeno ($200 \mu\text{M}$) a los tiempos indicados en la figura. Se obtuvieron los extractos celulares y $50 \mu\text{g}$ de proteína se procesaron por la técnica de Western-Blot. La imagen es una representativa de 3 experimentos que se realizaron por separado.

El gráfico es el análisis densitométrico de la media \pm SE.

Al evaluar el efecto de Bcl-2 ante el efecto del peróxido comprobamos que este agente decrece de una manera dependiente del tiempo ya que esta proteína al encontrarse en un proceso de apoptosis deja de expresarse para que la célula entre en apoptosis por lo que decidimos evaluar la relación con Caspasa 8 siendo esta la que proteoliza a Bid en tBid

Efecto del peróxido de hidrógeno sobre la activación de Caspasa 8.

Las caspasas pertenecen a la familia de cisteina-aspartil proteasas, a la fecha se han identificado 14. Entre las caspasas que participan en la apoptosis se encuentran 2, 3, 6, 8, 9, 10. Las caspasas contienen grandes predominios y se presentan como monómeros inactivos. La activación de las caspasas se produce cuando se asocian con diversos complejos la caspasa-9 se activa en el apoptosoma, la 8 en el complejo de señalización inductor de muerte. Nosotros evaluamos el papel del peróxido sobre la activación de caspasas 8 y 9. Nuestros resultados muestran que el peróxido produce un aumento en la activación de las Caspasa (Fig. 36)

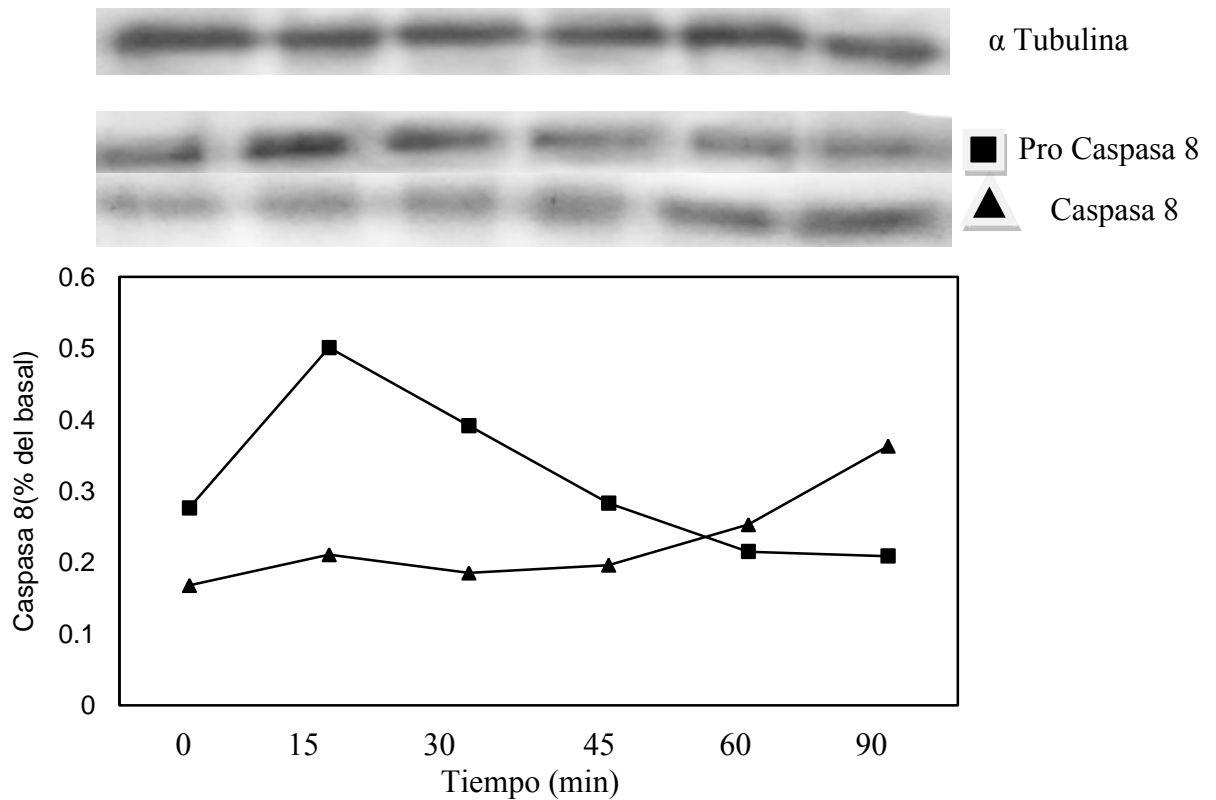


Fig. 36 Efecto del peróxido de hidrógeno sobre la expresión de Caspasa 8.

Las células (1×10^6) se crecieron en cajas de 6 pozos, una noche anterior se ayunaron (suero bovino fetal 2%) al término se trataron con peróxido de hidrógeno ($200 \mu\text{M}$) a los tiempos indicados en la figura. Se obtuvieron los extractos celulares y $50 \mu\text{g}$ de proteína se procesaron por la técnica de Western-Blot. La imagen es una representativa de 3 experimentos que se realizaron por separado. El gráfico es el análisis densitométrico de la media \pm SE.

Una vez analizado el resultado de caspasa 8 comprobamos que esta proteína relacionada con la vía extrínseca es activada por el efecto del peróxido de hidrógeno, comprobando que caspasa 8 tiene una sobre expresión dependiente del tiempo, con este resultado decidimos evaluar la expresión de caspasa 9 formando parte de la vía intrínseca y determinar si la célula entra en apoptosis

Efecto del peróxido de hidrógeno sobre la activación de Caspasa 9.

La Caspasa 9 está considerada como una Caspasa iniciadora de la apoptosis ante la presencia de alguna señal de muerte celular. La Caspasa 9, se encuentra de forma fisiológica en su forma inactiva en el citosol, se activa tras la salida de citocromo c desde la mitocondria. Ante un determinado daño que produzca una alteración en la membrana mitocondrial que desencadena la salida de citocromo c al citosol.

La Caspasa 9 al unirse con el citocromo c y Apaf-1 forman el apoptosoma. Una vez activado el apoptosoma Caspasa 9 activa a otras caspasas, para llevar a la célula a la muerte. Nosotros evaluamos el papel del peróxido sobre la activación de caspasas 9, demostrando que el peróxido de hidrógeno produce un aumento en la activación de las Caspasa 9 (Fig. 37)

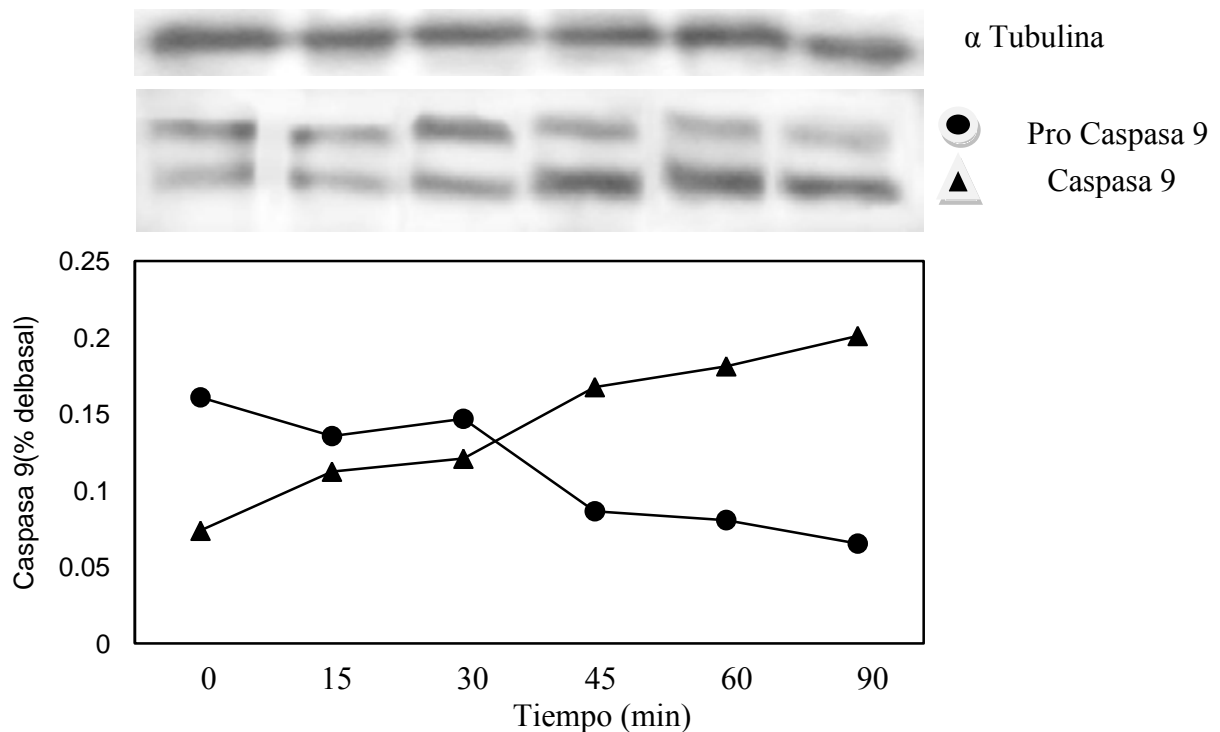


Fig. 37 Efecto del peróxido de hidrógeno sobre la expresión de Caspasa 9.

Las células (1×10^6) se crecieron en cajas de 6 pozos, una noche anterior se ayunaron (suero bovino fetal 2%) al término se trataron con peróxido de hidrógeno ($200 \mu\text{M}$) a los tiempos indicados en la figura. Se obtuvieron los extractos celulares y $50 \mu\text{g}$ de proteína se procesaron por la técnica de Western-Blot. La imagen es una representativa de 3 experimentos que se realizaron por separado. El gráfico es el análisis densitométrico de la media \pm SE.

Con este último resultado comprobamos la sobre activación de la Caspasa 9 determinando que el efecto del peróxido de hidrógeno estimula la liberación del citocromo c y por consiguiente la muerte celular

17. Discusión

El peróxido de hidrógeno es un agente ampliamente utilizado en la odontología ya que se utiliza en el tratamiento de blanqueamiento dental, en la desinfección de tejidos y eliminación de tejido necrótico, las concentraciones más utilizadas son de en la mayoría de los tratamientos odontológicos son de 2.5 a 3 % (7.4×10^2 a 1×10^3 mM).⁴⁷

En este estudio, encontramos que la LD50 (dosis letal de la mitad de la población) en fibroblastos gingivales humanos fue a una concentración de 200 μ M durante 24 horas y la LD100 (dosis letal del toda la población) es a una concentración de 300 μ M. Esto implica que el peróxido de hidrógeno afecta la transferencia de electrones en las mitocondrias.⁴⁷

Tras el estudio del efecto de peróxido de hidrógeno sobre los fibroblastos gingivales humanos, encontramos que su efecto citotóxico no solo se relacionan con la apoptosis sino que también está asociado con la lisis celular, ya que encontramos la ruptura de la membrana, condensación y fragmentación tanto del citoplasma como del núcleo. Sin embargo, diversos estudios señalan que la exposición de las células a un agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno inducen a la apoptosis.⁴⁸

También se ha caracterizado que durante las fases tempranas de la apoptosis, se produce una pérdida en la asimetría de fosfolípidos formadores de la membrana citoplasmática de la célula provocando la translocación de aminofosfolípidos cargados negativamente y de fosfatidilserina de la porción interna de la membrana a la parte exterior.⁴⁹

Por otra parte la apoptosis, es un proceso fisiológico involucrado en la delección celular durante la organogénesis y controla la proliferación celular, ya que toda célula tiene un momento para vivir y un momento para morir por que lo más importante es el organismo en conjunto y no la individualidad celular, por lo cual se tiene la muerte programada y la diferenciación en tejidos adultos.⁵⁰

La falta en la regulación de la apoptosis se ha implicado en una gran variedad de enfermedades. La manifestación excesiva de la apoptosis se ha relacionado con el choque séptico, enfermedades de corazón, infarto y enfermedades neurodegenerativas, mientras que la deficiencia funcional en la activación de la apoptosis puede facilitar el desarrollo de enfermedades autoinmunes o de cáncer.⁵¹

A pesar de que diversos reportes señalan que el peróxido de hidrógeno induce apoptosis en células obtenidas de cáncer gástrico o leucemia, el mecanismo molecular no ha sido esclarecido del todo. Existen como ya he mencionado en líneas anteriores al menos dos vías asociadas a la apoptosis entre las que se

encuentran la vía extrínseca (receptores de muerte) y la vía intrínseca (mitocondria) que son iniciadas por Caspasa 8 y Caspasa 9 respectivamente.

En este estudio encontramos que el tratamiento con peróxido de hidrógeno promueve la activación de Caspasa 9, lo que sugiere que la vía apoptótica es mediada por la mitocondria. Con estos resultados se sugiere que la apoptosis inducida por peróxido de hidrógeno en fibroblastos gingivales es mediada por la vía intrínseca. En otra serie de experimentos mostramos que el peróxido de hidrógeno induce la expresión de Bax, proteína que se considera como pro-apoptótica, que induce la apoptosis mediante la permeabilización de la membrana mitocondrial lo que conduce a la liberación del citocromo c. Por otra parte la expresión de Bcl-2 disminuye gradualmente, proteína anti-apoptótica ya que esta proteína no puede mantener por completo la vitalidad de la célula ante los estímulos externos y/o internos

Así mismo se ha reportado que caspasa-8 promueve la proteólisis de Bid en la porción del carboxilo terminal para formar tBid. Fragmento que se une a la mitocondria en la membrana mitocondrial, en donde promueve la despolarización del potencial de esta creando poros y la liberación del citocromo.

Estos resultados muestran que el peróxido de hidrógeno conduce a la activación de la vía dependiente de caspasas regulando el funcionamiento de la mitocondria.

Finalmente nuestras investigaciones estarán encaminadas a evaluar el efecto del peróxido de hidrógeno sobre la liberación del citocromo c y sobre la integridad del DNA. De igual forma nuestro experimentos muestran por primera ocasión que el peróxido de hidrógeno induce apoptosis en un evento a través de la vía Caspasa dependiente de la mitocondria.

Bibliografía

1. Lindhe Jan. Periodontología Clínica e Implantología Odontológica. Editorial Blackwell Munksgaard 5° Edición .2008
2. -Carranza Fermín A. Newman Michael G. Periodontología Clínica. Editorial Elsevier 10° Edición 2006
3. -Cho Mi, Garant Pr. Development And General Structure Of The Periodontium. Periodontol 2000. 2000 Oct;24:9-27
4. Robert J. Genco. Periodoncia Editorial Interamericana 2° Edición En Español 2000
5. Finn Geneser Histología Editorial Panamericana 3° Edición 2002.
6. Lee M, Wu Bm, Stelzner M, Reichardt Hm, Dunn Jc. Intestinal Smooth Muscle Cell Maintenance By Basic Fibroblast Growth Factor. Tissue Eng Part A. 2008 Aug;14(8):1395-402pmid: 18680389
7. Imagen Obtenida En El Laboratorio De Bioquímica. Facultad De Odontología, División De Estudios De Posgrado e Investigación. U.N.A.M.
8. Welker P, Kramer S, Groneberg Da, Neumayer Hh, Bachmann S, Amann K, Peters H. Increased Mast Cell Number In Human Hypertensive Nephropathy. Am J Physiol Renal Physiol. 2008 Aug 6 Pmid: 18684889
9. www.Ecursos.Cnice.Mec.Es/Biosfera/Alumno/2bachillerato/Inmune/Ampliab asofilo
10. Kroemer A, Edtinger K, Li Xc. The Innate Natural Killer Cells In Transplant Rejection And Tolerance Induction. Curr Opin Organ Transplant. 2008 Aug;13(4):339-43. Pmid: 18685327
11. www.Chiled2k.Net/Lofiversion/Index.Php?T5651.Html
12. www.Encarta.Msn.Com
13. www.Soko.Com.Ar/Biología/Sida/Img_Linf_B_1.Htm
14. Che Zq, Gao Pj, Shen Wl, Fan Cl, Liu Jj, Zhu Dl. Angiotensin Ii-Stimulated Collagen Synthesis In Aortic Adventitial Fibroblasts Is Mediated By Connective Tissue Growth Factor. Hypertens Res. 2008 Jun;31(6):1233-40. Pmid: 18716373
15. www.Efisioterapia.Net/Articulos/Graficos/Certamen2007/34_002.Jpg
16. www.Fcv.Unlp.Edu.Ar/Sitios-Catedras/90/Material/10d.Jpg
17. Bressan Gm, Daga-Gordini D, Colombatti A, Castellani I, Marigo V, Volpin D. Emilin, A Component Of Elastic Fibers Preferentially Located At The Elastin-Microfibrils Interface. J Cell Biol. 1993 Apr;121(1):201-12. Pmid: 8458869
18. Er K, Polat Za, Ozan F, Tasdemir T, Sezer U, Siso Sh. Cytotoxicity Analysis Of Strontium Ranelate On Cultured Human Periodontal Ligament Fibroblasts: A Preliminary Report. J Formos Med Assoc. 2008 Aug;107(8):609-15. Pmid: 18678544
19. Ai H, Xu Qf, Lu Hf, Mai Zh, An Aq, Liu Gp. Rapid Tooth Movement Through Distraction Osteogenesis Of The Periodontal Ligament In Human. Chin Med J (Engl). 2008 Mar 5;121(5):455-62. Pmid: 18364121
20. www.Anatomy.Uq.Edu.Au
21. Gómez De Ferraris. A. Campos Muñoz. Histología Y Embriología Bucodental. 2ª Ed. Editorial Medica Panamericana 2002.

22. Goren Ad, Dunn Sm, Wolff M, Van Der Stelt Pf, Colosi Dc, Golub Lm. Pilot Study: Digital Subtraction Radiography As A Tool To Assess Alveolar Bone Changes In Periodontitis Patients Under Treatment With Subantimicrobial Doses Of Doxycycline. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008 Aug 19.
23. www.Conganat.Org
24. Xie R, Kuijpers-Jagtman Am, Maltha Jc. Osteoclast Differentiation During Experimental Tooth Movement By A Short-Term Force Application: An Immunohistochemical Study In Rats. *Acta Odontol Scand.* 2008 Aug 18:1-7.
25. Cadosch D, Chan E, Gautschi Op, Meagher J, Zellweger R, Filgueira L. Titanium Iv Ions Induced Human Osteoclast Differentiation And Enhanced Bone Resorption In Vitro. *J Biomed Mater Res A.* 2008 Aug 5. Pmid: 18683234
26. Goldstein Ronald *Blanqueamiento Dental Completo Edit Quintessence 1995*
27. Linda Greenwall. *Técnicas De Blanqueamiento En Odontología Restauradora Guía Ilustrada. Editorial Arsmedica 2005*
28. Moses Diamond *Anatomia Dental Editorial Limusa Grupo Noriega Editores*
29. Quelante Dícese Del Producto Químico Que Tiene La Propiedad De Combinarse Con Los Iones Positivos Bivalentes Y Trivalentes, Formando Compuestos Estables *El Pequeño Larousse 1999*
30. Shougang Zhuang, Gilbert R. Kinsey, Yan Yan, Jiahuai Han , Rick G. Schnellmann *Erk Activation Mediates Mitochondrial Dysfunction And Necrosis Induced By Hydrogen Peroxide In Renal Proximal Tubular Cells Jpet Fast Forward. Published On March 13, 2008 As Oi:10.1124/Jpet.108.136358*
31. Xiuli Lu¹, Fukushi Kambe, Xia Cao, Yasuko Kozaki, Takahide Kaji, Takehisa Ishii , Hisao Seo *Dhcr24 Is A Hydrogen Peroxide Scavenger, Protecting Cells From Oxidative-Stress-Induced Apoptosis Endocrinology. First Published Ahead Of Print March 13, 2008 14(27): 4309-4318*
32. -Aldershvile J, Ambrosio G, Bayés De Luna A, Badimon L, Bertrand Me, Cleand J, Et Al (1998) *Estrés Oxidativo (Especies De Oxígeno Reactivo), Patología Cardiovascular (Parte I) Eur Cardiol J 1998*
33. Rybczynska M. *Biochemical Aspects Of Free Radical Mediated Tissue Injury. Postepy Hig Med Dows 1994;48(4):419-41.*
34. Yu Xiao, Feng-Qing Yang, Shao-Ping Li, Guang Hu, Simon Ming-Yuen Lee, Yi-Tao Wang *World Essential Oil Of Curcuma Wenyujin Induces Apoptosis In Human Hepatoma Cells J Gastroenterol 2008 July 21; 14(27): 4309-4318*
35. Fumarola C, Guidotti Gg. *Stress-Induced Apoptosis: Toward A Symmetry With Receptor-Mediated Cell Death. Apoptosis. 2004 Jan;9(1):77-82. Review. Pmid: 14739601*
36. Nicole Doudican Adrianna Rodriguez, Iman Osman, Seth J. Orlow, *Mebendazole Induces Apoptosis Via Bcl-2 Inactivation In Chemoresistant Melanoma Cells Published Online First On July 30, 20089(1):77-82*
37. Heike Wanka , Nicole Keßler , Janett Ellmer , Nicole Endlich , Barbara S. Peters , Susanne Clausmeyer , Jörg Peters *Institute Of Physiology, University Of Greifswald Cytosolic Renin Is Targeted To Mitochondria And Induces Apoptosis In H9c2 Rat Cardiomyoblasts 2006 15;181*
38. Yang Y, Jian W, Pozio E. *Analysis Of Cytochrome C-Oxidase (Coi) Gene Of Mitochondrial Dna From The Trichinella Spp. In China. Parasitol Res. 2008 Aug 7 18;182*

39. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>
40. Nagarsekar A, Greenberg Rs, Shah Ng, Singh Is, Hasday Jd. Febrile-Range Hyperthermia Accelerates Caspase-Dependent Apoptosis In Human Neutrophils. *J Immunol.* 2008 Aug 15;181
41. Yin Rx, Lu Jy, Lu Bx, Chen Q, Yu J, Cui Dh. [Roles Of Bcl-2/Bax Expression And Oligodendrocyte Apoptosis In The Pathogenesis Of Heroin-Induced Spongiform Leucoencephalopathy] *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2008 Mar 18;88(11):749-53. Chinese.
42. www.biomedcentral.com/1471-2202/9/74
43. Andrew Joiner *Journal Of Dentistry* 35 2007 Review Of The Effects Of Peroxide On Enamel And Dentine Properties 88 9 – 89
44. Wack A, Gallorini S. Bacterial Polysaccharides With Zwitterionic Charge Motifs: Toll-Like Receptor 2 Agonists, T Cell Antigens, Or Both Immunopharmacol Immunotoxicol. 2008 Aug 5:1-10. Pmid: 18686103
45. He Q, Pang R, Song X, Chen J, Chen H, Chen B, Hu P, Chen M. Rosiglitazone Suppresses The Growth And Invasiveness Of Sgc-7901 Gastric Cancer Cells And Angiogenesis In Vitro Via Pargamma Dependent And Independent Mechanisms. 2007 15;181
46. Julia` Blanco,^{1*} Jordi Barretina,¹ Geoffrey Henson,² Gary Bridger,² Erik De Clercq,³ Bonaventura Clotet,¹ And Jose´ A. Este´¹ The Cxcr4 Antagonist Amd3100 Efficiently Inhibits Cell-Surface Expressed Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope-Induced Apoptosis Institut De Recerca De La Sida-Caixa, Laboratori De Retrovirologia, Hospital Universitari Germans 08916 Badalona, Catalonia, Spain¹; Anormed Inc.,²⁰ July 1999/Accepted 18 October 1999
47. I. Hori, Y. Higo, M. Ohno, T.W. Tsutsui And T. Tsutsui, Assessment Using Human Dental Pulp Cells Of Clastogenicity Of Antiseptics Used In Dental Practice And Agents For Root Canal Enlargement And Cleaning, *Odontology/The Society Of The Nippon Dental University* 95 (2007), Pp. 30–37.
48. H.Y. Chen, C.Y. Zheng, G.L. Zou, D.X. Xie And J.P. Gong, Peplomycin Induces G1-Phase Specific Apoptosis In Liver Carcinoma Cell Line Bel-7402 Involving G2-Phase Arrest, *Acta Pharmacologica Sinica* 25 (2004), Pp. 1698–1704
49. N. Maulik, V.E. Kagan, V.A. Tyurin And D.K. Das, Redistribution Of Phosphatidylethanolamine And Phosphatidylserine Precedes Reperfusion-Induced Apoptosis, *The American Journal Of Physiology* 274 (1998), Pp. H242–H248.
50. J. Yuan, G.A. Murrell, A. Trickett And M.X. Wang, Involvement Of Cytochrome C Release And Caspase-3 Activation In The Oxidative Stress-Induced Apoptosis In Human Tendon Fibroblasts, *Biochimica Et Biophysica Acta* 1641 (2003), Pp. 35–41.
51. Formichi, E. Radi, C. Battisti, E. Tarquini, A. Leonini And A. Di Stefano Et Al., Human Fibroblasts Undergo Oxidative Stress-Induced Apoptosis Without Internucleosomal Dna Fragmentation, *Journal Of Cellular Physiology* 208 (2006), Pp. 289–297.