

INFLUENCIAS DEL ÓXIDO NÍTRICO EN PATOLOGÍAS BUCALES

Nuvia Sánchez¹; Reynaldo Ortiz²; Eduvigis Solórzano¹; Leonidas Urdaneta¹.

1. Departamento de Biopatología. Grupo de Investigaciones Biopatológicas. Laboratorio Integrado de Biología Celular y Molecular. Facultad de Odontología. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.

2. Laboratorio del Departamento de Química. Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes .Mérida, Venezuela.

nuviasan@ula.ve

RESUMEN

Los radicales libres se forman principalmente en condiciones fisiológicas, en el metabolismo oxidativo, durante la reducción incompleta del oxígeno molecular,; son considerados átomos o moléculas orgánicas e inorgánicas que poseen electrones impares en su orbital externo, lo que los hace inestables y reactivos con alta capacidad oxidante hacia las biomoléculas (lípidos, carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos). Dentro de los radicales libres tenemos el óxido nítrico (NO) que requiere para su síntesis enzimática del sustrato L-arginina, un átomo de oxígeno y la presencia de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). Cumple funciones importantes en procesos fisiológicos como: regulación del tono vascular, modulación de la transmisión de la información sensorial y efectos inmunitarios pero, también participa en la etiopatogenia de algunas enfermedades de la cavidad bucal. El propósito de esta investigación fue indagar sobre la influencia del óxido nítrico en las siguientes enfermedades de la cavidad bucal: estomatitis aftosa recurrente (EAR), patologías pulpares, cáncer bucal, periodontitis crónica y alteraciones de la articulación temporomandibular (ATM) y se encontró aumento en los niveles de óxido nítrico y en la expresión de la óxido nítrico sintasa en estas enfermedades bucales.

Palabras Claves: oxido nítrico, patologías bucales, radicales libres.

NITRIC OXIDE INFLUENCES IN ORAL PATHOLOGY

ABSTRACT

Free radicals are mainly formed under physiological conditions, for the incomplete reduction of molecular oxygen in oxidative metabolism, they are considered atoms or organic and inorganic molecules that have unpaired electron in their outer orbital, making them unstable and reactive with high capacity oxidant to biomolecules (lipids, carbohydrates, proteins and nucleic acids). Among the free radicals have nitric oxide (NO) required for enzymatic synthesis of L-arginine substrate, an oxygen atom and the presence of nitric oxide synthase (NOS). They play important roles in physiological processes such as regulation of vascular tone, modulation of sensory information transmission and immune effects but also participates in the pathogenesis of some chronic diseases of the oral cavity. The purpose of this study was to review which aims

Recibido: 25-02-2011

Aceptado 13-04-2011

to investigate the influence of NO on the following diseases of the oral cavity, recurrent aphthous, pulpal pathology, oral cancer, chronic periodontitis and temporomandibular joint disorders, and found increased NO levels and NOS expression in these oral diseases.

Keywords: nitric oxide, oral pathology, free radicals.

Introducción

El oxígeno es esencial para la vida, cumple una función importante como aceptor terminal de electrones durante la respiración celular, pero puede sufrir una reducción parcial con la formación de radicales libres (RL) que no son más que átomos o moléculas orgánicas e inorgánicas que poseen electrones impares en su orbital externo que los hace inestables y reactivos (1). El electrón desapareado hace que los RL presenten alta inestabilidad, que les confiere una alta reactividad oxidante hacia otras biomoléculas, que reaccionan rápidamente con estas especies químicas. Por lo tanto las células reciben diariamente unos 10.000 impactos oxidativos que dañan moléculas tan importantes como los lípidos de las membranas, las proteínas enzimáticas y el material genético que las constituyen. El óxido nítrico (NO), es un radical libre con una corta vida media, requiere para su síntesis del aminoácido L-arginina y de una molécula de oxígeno, en presencia de las isoenzimas sintetas de óxido nítrico (NOS), es producido por muchas células del organismo como las células neuronales, endoteliales y polimorfonucleares (1,2). Participa en la regulación de los siguientes procesos fisiológicos: señalización celular, neurotransmisión, inmunológicos, tono vascular, entre otros. Sin embargo durante la fagocitosis se exagera la

producción de NO por parte de los neutrófilos y macrófagos durante el estallido respiratorio u oxidativo.

La sobre-producción de RL se corresponde con el estrés oxidativo y nitrosativo que es la etapa en donde la producción de radicales libres y los daños que éstos pueden generar, sobrepasan la capacidad de las células para eliminar las especies reactivas y promover una eficiente reparación de sus moléculas (3,4).

Cuando se rompe el equilibrio entre la formación y eliminación de RL donde destaca el óxido nítrico es un ambiente propicio para el establecimiento de patologías. Es así como, actualmente se relacionan muchas enfermedades crónicas con sobre-producción de radicales libres. En tal sentido, el propósito de este estudio fue revisar en la literatura sobre la influencia del NO en las siguientes enfermedades de la cavidad bucal: estomatitis aftosa recurrente, patologías pulpares, cáncer bucal, periodontitis crónica y alteraciones de la articulación temporomandibular, patologías que pueden ser observadas en la atención odontológica (5-8), lo cual conduciría a implementar nuevos protocolos para diagnóstico, pronóstico y tratamiento de las mismas.

Estomatitis aftosa recurrente (EAR)

Se caracteriza por presencia de lesiones únicas o múltiples, pequeñas (menores

Recibido: 25-02-2011

Aceptado 13-04-2011

de 0.5 cm) poco profundas, erosivas, dolorosas, inicialmente necróticas y recidivantes, con pérdida de sustancia de la mucosa bucal, donde el 25% de la población puede ser afectada por esta condición (9). La etiología es desconocida, sin embargo, factores genéticos, inmunológicos, alimentarios, infecciosos, alérgicos y traumáticos juegan un rol importante en esta patología.

Algunos estudios realizados por Esparza y col. 1998 (10); Porter y col. 1998 (11) mencionan que la ulceración es consecuencia de una producción anormal de citoquinas en la mucosa bucal, lo que favorece una respuesta inmune en la mucosa. Puede asociarse a otras enfermedades como la enfermedad de Behet's; en donde la disminución del NO puede ser responsable en el desarrollo de anomalías endoteliales como la tendencia trombótica que presentan los pacientes con esta afección (12).

Existen además, polimorfismos de un solo nucleótido +894G-T (GLU298Asp) en la NOS_e observado en sujetos con la enfermedad de Behet's que presentan manifestaciones de estomatitis aftosa. Los altos niveles de NO en estas enfermedades inflamatorias ocurren por la NOS_i en comparación con la inducción ejercida por la NOS_e; sin embargo, estos estudios realizados no encontraron asociación entre polimorfismos en NOS_e y estomatitis aftosa recurrente, pero demostraron que existe relación significativa entre polimorfismos de NOS_e y la enfermedad de Behet's (13).

En un estudio realizado por Çağlayan y col. 2008 (14) no se encontró evidencia significativa entre pacientes con EAR y el grupo control, evaluando los niveles de mieloperoxidasa, capacidad antioxidante total con lo cual, sugieren que las especies reactivas de oxígeno pueden no jugar un rol en la etiología de la EAR.

Dentro de las sustancias químicas que actúan como mediadores de la inflamación se incluyen las citoquinas (interleucinas IL), que son proteínas con funciones inmunomoduladoras (IL-2, IL-4, IL-10, interferón γ) y proinflamatorias (IL-1, IL-6, IL-8, interferón γ , factor de necrosis tumoral α y β). Se considera que en la EAR, es donde los niveles de citoquinas proinflamatorias especialmente IL-1, IL-6 y factor de necrosis tumoral, se encuentran elevados, por lo cual se les considera como fuertes marcadores del proceso inflamatorio. Además, se señala que los niveles de IL-10 (citoquina moduladora) están disminuidos, lo cual explica que en la EAR existe un desequilibrio de la producción de citoquinas inmunomoduladoras y proinflamatorias, con predominio de las últimas, lo cual favorecen que se desencadene el estallido respiratorio en los neutrófilos y macrófagos con la liberación de RL entre otras sustancias (15,16).

Patologías pulpares

La pulpa que es un tejido conectivo, rodeada casi totalmente por un tejido duro (dentina), responde a los estímulos mediante el proceso inflamatorio (17). Donde especies reactivas de oxígeno

Recibido: 25-02-2011

Aceptado 13-04-2011

(ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN) son encontradas en sitios de inflamación aguda y crónica en respuesta a estos procesos (18). En tal sentido, Takeichi y cols. 1998 (19) en estudios inmunohistoquímicos observaron la expresión NOSi que induce la producción de NO en células de quistes radiculares periapicales y en vasos sanguíneos cercanos a estos.

Durante las patologías pulpares ocurre la producción de mediadores inflamatorios dentro del conducto radicular y en el área periapical como reacción del sistema inmunológico (20,21). Así mismo, en las reacciones inflamatorias locales, los polimorfonucleares participan generando bactericidas derivados del oxígeno como el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno; con incremento en su producción por parte de los neutrófilos en granulomas periapicales crónicos, y después del tratamiento quirúrgico con la eliminación del foco inflamatorio reduce la producción del anión superóxido y el peróxido de hidrógeno (22,23). La persistencia y excesiva acumulación de los polimorfonucleares con producción de radicales libres en el sitio de la inflamación, conduce a daños en los tejidos (24).

Además de las citoquinas, la presencia de NO en lesiones periapicales permiten la remodelación del hueso, con activación de los osteoblastos y diferenciación de osteoclastos (25). Sin embargo, los efectos del NO sobre la remodelación ósea son controversiales algunos estudios *in vitro* sugieren que el

NO inhibe la resorción de hueso por inhibir la actividad y formación de los osteoclasto; y fomentar la activación de los osteoblastos (26); mientras que otros reportes muestran que el NO puede promover la maduración de los osteoclastos y aumentar la resorción inducida por las citoquinas (27). En tal sentido, Fukada y col. 2008 (28) y Lin y col. 2007(29) reportaron que el tratamiento con nitro-L-arginina-metil-ester (L-NAME) un inhibidor de la NOS, inhibe la resorción de hueso apical. Por otra parte, la inhibición de la NOS disminuye la producción de IL-8 en sangre humana, y en exudado periapical ocurre lo mismo; esto se debe a que al inhibirse la NOS disminuye la producción de NO, que incrementa el ARNm de IL-8 en neutrófilos por vía de GMPc independiente (30). Así mismo, productos de la glicación avanzada en granulomas periapicales causa elevada generación de especies reactivas de oxígeno por parte de macrófagos, linfocitos, neutrófilos y células endoteliales que expresan sus receptores; estas especies reactivas reaccionan con el NO para formar peroxinitrito, que es altamente tóxico y causa daño de los tejidos (31,32). En la patogénesis de la infección periapical y la inflamación, se induce la expresión de NOSi para producir NO, por tal motivo, en el tratamiento de dichas patologías se puede introducir dentro del conducto radicular del diente, drogas que inhiben la NOS (33).

Cuando existen deleciones genéticas en la NOSi *in vivo* (ratas), se agrava e incrementa la extensión de lesiones apicales, incluyendo la resorción ósea; porque existe menos control de la infección bacteriana, y se exagera la

Recibido: 25-02-2011

Aceptado 13-04-2011

respuesta inflamatoria local con la consecuente formación de abscesos (28).

Cáncer Bucal

La transición de células somáticas normales a células cancerígenas es el resultado de múltiples cambios genéticos y modificaciones que escapan de los mecanismos de control normal como la proliferación celular, migración y diferenciación. El desarrollo de cáncer es multifactorial y depende de los extensos daños en el ADN que es proporcional a la magnitud del estrés oxidativo y nitrativo, al deficiente sistema antioxidante y a alteraciones en el sistema de reparación del ADN. Recientes estudios demostraron que el estrés oxidativo y estrés nitrosativo, entre otros efectos perjudiciales, que implica la formación de las ERN en la forma de nitrosaminas (NO_3 y NO_2) y ERO tales como radical superóxido, radical hidroxilo y peróxido de hidrógeno; contribuyen para el desarrollo de carcinogénesis bucal por daños en el ADN ya sea por alteraciones en sus bases nitrogenadas o por ruptura de la doble hebra, que conduce a variaciones en los genes supresores de tumores y aumento en la expresión de prooncogénos (34). Por otra parte, cuando los nitratos se reducen a nitritos, estos reaccionan con sustancias de los alimentos, como amidas y aminas para formar compuestos N-nitrosos y nitrosamidas que son cancerígenos directos (35).

Los altos niveles de estrés oxidativo resultan en peroxidación de las membranas lipídicas con la generación de peróxidos que pueden

descomponerse en múltiples productos carbonil mutagénicos. Tal es el caso, de los niveles de malondialdehído que aumentan en pacientes con cáncer oral y puede ser atribuido al incremento de los radicales libres y a un inadecuado sistema celular antioxidante (36).

El carcinoma de células escamosas, es el sexto más común del cáncer humano (37,38). Bahar y col. en el 2007 (39) reportaron acerca de la composición de la saliva de pacientes con carcinoma de células escamosas bucal, encontrando oxidación de las proteínas y del ADN, con aumento de nitrito y nitrato; y disminución de la capacidad antioxidante. Se ha demostrado que las altas concentraciones de NO causan mutaciones genéticas y puede promover la carcinogénesis por inactivar el gen supresor de tumores p53 (40-42).

Existen expresiones inmunohistoquímicas de la enzima NOSi en carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (43). Es posible que el NO facilite la angiogénesis durante la transformación compleja de displasias a cáncer, es decir los efectos del NO son amplios, estos pueden estar involucrado tanto en la transformación celular como en la formación de lesiones neoplásicas, demostrado mediante los altos niveles de NO en suero de pacientes con cáncer en la cavidad oral (44). Así mismo el uso de medicamentos específicos para inhibir la NOSi reduce la metástasis (45,46). En tal sentido, se puede aseverar que los radicales libres son mediadores de la iniciación y promoción del cáncer.

Recibido: 25-02-2011

Aceptado 13-04-2011

Periodontitis crónica

La periodontitis es una inflamación crónica multifactorial que altera el aparato de inserción del diente y como resultado del conjunto de reacciones hospedador-patógeno (47), produce pérdida de hueso alveolar y en algunos casos de los dientes, por migración del epitelio de unión (48,49).

Cuando ocurre un aumento en las concentraciones de varias citoquinas y quimiocinas, producidas por las células inflamatorias (incluidos los neutrófilos) y la población celular normal de los tejidos periodontales; estas citoquinas proinflamatorias: interleuquinas (IL-8, IL-1, IL-6), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factores de crecimiento, así como el lipopolisacárido tienen un efecto de preactivación sobre el estallido respiratorio de los neutrófilos humanos, que favorece la producción de radicales libres y especies reactivas (50-52). Tal es el caso, de el TNF- α que puede favorecer la generación de ERO por parte de los neutrófilos, de pacientes con periodontitis crónica y agresiva, así como de individuos con periodonto sano (53-55).

La presencia de biomarcadores originados de la reacción de los RL con las biomoléculas del organismo en pacientes que presentan enfermedad periodontal afirman que los RL y sus especies forman parte de la etiopatogenia de tal enfermedad (56); en este sentido, la presencia de dos marcadores principales de peroxidación de lípidos comunes (sustancias reactivas

del ácido tiobarbitúrico y malondialdehído) se han detectado en la periodontitis crónica (57,58). Además, los estudios con el modelo de "periodontitis" inducida por ligadura en ratas, que utilizaron la prueba del malondialdehído, respaldan estos estudios; junto con la determinación del malondialdehído en suero de seres humanos (59) y en los homogenizados de tejido gingival (60,61) de las ratas experimentales. En la inflamación inducida por la ligadura, el aumento del malondialdehído podría reducirse de forma significativa empleando un inhibidor de la sintasa inducible de óxido nítrico (aminoguanidina) o un imitador de la superóxido- dismutasa que elimine los aniones superóxido (60,62). También se han evaluado los compuestos orgánicos volátiles de la cavidad bucal, con respecto a la halitosis e indica que las sustancias orgánicas volátiles que predominan son alcanos metilados, que podrían representar los productos finales de la peroxidación de lípidos (63).

Las investigaciones sobre marcadores, originados de la reacción de los RL con el ADN en la periodontitis, es restringida. Los estudios sobre daño oxidativo del ADN se han fundado en las concentraciones de 8-hidroxidesoxiguanosina (8-OHdG) en muestras de saliva de individuos con periodontitis crónica, que indican el ataque a las bases nitrogenadas con las consecuentes modificaciones en la información genética (64,65). Por otra parte, otros estudios (66,67) han reportado deleciones de 5 kbp y 7.4 kpb en el ADNmt (ADN mitocondrial) de muestras de tejido gingival de sujetos con periodontitis, en poblaciones de

Recibido: 25-02-2011

Aceptado 13-04-2011

Turquía y Tokio, lo cual puede conducir a la disminución en la capacidad bioenergética de la célula. Otros hallazgos, encontraron polimorfismos en los alelos 298Asp de NOSe, en una población de Turquía que pueden predisponer a una periodontitis crónica (68).

Alteraciones de la articulación temporomandibular (ATM)

Las patologías de la ATM, pueden ser anomalías congénitas y del desarrollo, traumatismos, artritis y neoplasias, que afectan al 25-50% de la población. Pueden encontrarse patologías relacionadas con el disco articular, como el síndrome de disfunción temporomandibular (SDTM), perforaciones y bloqueos meniscales (69).

En casos de desordenes de la ATM se pueden determinar mediadores inflamatorios, citoquinas, componentes de glicosaminglicanos, proteinasas, antioxidantes, neuropéptidos, radicales libres derivados del oxígeno y radicales libres derivados de nitrógeno (NO) en el fluido sinovial (70,71). Recientes estudios proponen que la reactividad de los radicales libres es inducida por el estrés mecánico, que puede generarse por la hipereactividad de los músculos masticatorios en maloclusiones y hábitos bucales y son responsables de la iniciación de eventos moleculares sobre las biomoléculas (72).

De acuerdo a la anatomía y función, la ATM, constantemente se encuentra expuesta a cambios extremos de

compresión y descompresión por las magnitudes de fuerzas proporcionadas, de manera cíclica por los músculos masticatorios, que puede producir hipoxia-reoxigenación en el endotelio vascular del tejido retro-discal y en el espacio intra-articular y favorece la formación de anión superóxido, que es dismutado para formar peróxido de hidrógeno y este mediante la reacción de Fenton genera el radical hidroxilo, que participan en la oxidación del fluido sinovial de la ATM, con pérdida en cantidad y calidad de este líquido (73). Las concentraciones de NO son asociadas con cambios inflamatorios y dolor en la ATM (74). Por otra parte, la sobre-producción de radicales libre conduce a oxidación en las proteínas que pueden favorecer la osteoartritis de la ATM con predominio de la expresión de NOSi en los condrocitos (75).

Conclusion

Los radicales libres son el resultado de nuestro sistema de producción de energía normal, y por lo tanto es irremediable su generación. En condiciones fisiológicas, no ocurren daños a las biomoléculas del organismo. Esto se debe a la presencia de un complejo sistema antioxidante dentro de las células que los eliminan y evitan su actividad deletérea. Sin embargo, los antecedentes sugieren claramente que el incremento en la generación de radicales libres, la deficiencia del sistema antioxidante, así como la disminución en la eficiencia de los mecanismos de reparación del ADN, la proteólisis, la peroxidación lipídica así como la pérdida de regulación del sistema inmune, son procesos que favorecen al aumento de estrés

Recibido: 25-02-2011

Aceptado 13-04-2011

oxidativo y nitrosativo. En tal sentido, está previamente comprobado que existe una estrecha relación entre el aumento de los niveles de radicales libres específicamente el NO, con algunas enfermedades de la cavidad bucal entre las que destacan la estomatitis aftosa recurrente, las patologías pulpares, el cáncer bucal, la periodontitis crónica y las alteraciones de la articulación temporomandibular.

Referencias

- Halliwell B. y Gutteridge J. 1989. Free Radicals in Biology and Medicine. OXFORD. 2da. Ed.
- Hernández D, McCord J. 2007. Evolución y radicales libres. Importancia del estrés oxidativo en la patología humana. Rev Med Inst Mex Seguro Soc.; 45 (5): 477-484.
- Díaz J, Juárez M. 2007. Bioquímica. Un enfoque básico aplicado a ciencias de la vida. Mc Graw Hill. 1ra.ed;.
- Ballester M. 1996. Antioxidantes, radicales libres y salud. Un enfoque químico- orgánico- físico. Med Clin (Barc); 107: 509-515.
- Sunitha M, Shanmugan S. 2006. Evaluation of salivary nitric oxide levels in oral mucosa disease: a controlled clinical trial. Ind J Dent Res; 17(3): 117-120.
- Reher V, Zenobio E, Costa F, Reher P, Soare R. 2007. Nitric oxide levels in saliva increase with severity of chronic periodontitis. J Oral Sci; 49: 271-276.
- Rivarola de Gutiérrez, V. 2008. Stress oxidativo en las patologías inflamatorias orales. Rev Méd Universitaria; 4 (1):1-8.
- Guarda N, Oliviero F, Ramonda R, Ferronato G. 2004. Influence of intra-articular injections of sodium hyaluronate on clinical features and synovial fluid nitric oxide levels of temporomandibular osteoarthritis. Reumatismo ;56(4):272-277.
- Scully C, Porter S. 2008. Oral mucosal disease: recurrent aphthous stomatitis. Br J Oral Maxillofac Surg; 46:198-206.
- Esparza G, López-Argüello C, García J, Moreno L. 1998. Estomatitis aftosa recidivante. Revisión y puesta al día. Medicina Oral 3:18-35.
- Porter S, Scully C, Pedersen A. 1998. Recurrent aphthous stomatitis. Crit Rev Oral Biol Med; 9: 306-321.
- Karasneh J, Hajeer AH, Silman A, Worthington J, Ollier WE, Gul A. 2005. Polymorphisms in the endothelial nitric oxide synthase gene are associated with Behcet's disease. Rheumatology; 44: 614-617.
- Karasneh J, Baszrafshani R, Thornhill M, Ollier W. 2009. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms are not associated with recurrent aphthous stomatitis. Arch Oral Biol; 54 (6):583-587.
- Çağlayan F, Miloglu Ö, Altun O, Erel Ö, Yılmaz A. 2008. Oxidative stress and myeloperoxidase levels in saliva of patients with recurrent aphthous stomatitis. Oral Dis; 14 (8) 700-704.
- Bazrafshani M, Hajeer A, Ollier W, Thornhill M. 2002. IL-1B and IL-6 gene polymorphisms encode significant risk for the development of recurrent aphthous stomatitis (RAS). Genes Immun; 3(5):302-305.
- Buno I, Huff J, Weslon W, Cook D, Brice S. 1998. Elevated levels of interferon gamma, tumor necrosis factor alpha, interleukin 2, 4 and 5 but not interleukin 10, are present in recurrent aphthous stomatitis. Arch Dermatol; 14(7):827-31.

Recibido: 25-02-2011

Aceptado 13-04-2011

17. Mount G, Hume W. Conservación y restauración de la estructura dental. Mosby. 1ra ed. España; 1999.
18. Ingle J, Bakland L. 1996. Endodoncia. MacGraw-Hill Interamericana. 3ra ed. México;
19. Takeichi O, Saito I, Hayashi M, Tsurumachi T, Saito T. 1998. Production of human-inducible nitric oxide synthase in radicular cysts. *J Endodon*; 24: 157-160.
20. Anil S, Shanavas KR, Beena VT, Remani P, Vijayakumar T. 1993. Quantification of circulating immune complexes in patients with chronic periapical lesions. *J Nihon Univ Sch Dent*; 35 (3): 175-178.
21. Baumgardner KR, Sulfaro MA. 2001. The anti-inflammatory effects of human recombinant copper-zinc superoxide dismutase on pulp inflammation *J Endod* 27(3):190-195.
22. Minczykowski A, Woszczyk M, Szczepanik A, Lewandowski L, Wysocki H. 2001. Hydrogen peroxide and superoxide anion production by polymorphonuclear neutrophils in patients with chronic periapical granuloma, before and after surgical treatment. *Clin Oral Invest*; 5: 6-10.
23. Marton I, Kiss C. 1992. Influence of surgical treatment of periapical lesions on serum and blood levels of inflammatory mediators. *Int Endodont J*; 25:229-233.
24. Dallegrì F, Patrone E, Frumento G, Banchi L, Sacchetti C. 1984. Phagocytosis-dependent neutrophil-mediated extracellular cytotoxicity against different target cells. *Acta Haematol*; 71:371-375.
25. Van't Hof R, Ralston SH. 2001. Nitric oxide and bone. *Immunology*; 103: 255-261
26. Fan X, Roy E, Zhu L, Murphy TC, Ackert-Bicknell C, Hart CM et al. 2004. Nitric oxide regulates receptor activator of nuclear factor Kappa B ligand and osteoprotegerin expression in bone marrow stromal cells. *Endocrinology*; 145 (2): 751-759.
27. Brandi M, Hukkanen M, Umeda T, Moradi-Bidhendi N, Bianchi S, Gross SS et al. 1995. Bidirectional regulation of osteoclast function by nitric oxide synthase isoforms. *Proc Natl Acad Sci USA*; 92 (7):2954-2958.
28. Fukada S, Silva T, Saconato I, Garlet G, Ávila-Campos M, Silva J et al. 2008. iNOS-derived nitric oxide modulates infection-stimulated bone loss. *J Dent Res*; 87 (12):1155-1159.
29. Lin S, Kok S, Lin L, Wang CC, Kuo M, Lin CT et al. 2007. Nitric oxide promotes the progression of periapical lesion via inducing macrophage and osteoblast apoptosis. *Oral Microbiol Immunol*; 22(1): 24 -29.
30. Shimauchi H, Tacayama S, Naikawa-Kiji M, Shimabukuro Y, Okada H. 2001. Production of interleukin-8 and nitric oxide in human periapical lesions. *J Endod*; 27 (12): 749-752.
31. Hama S, Takeichi O, Saito I. 2007. Involvement of inducible nitric oxide synthase and receptor for advanced glycation end products in periapical granulomas. *J Endod*; 33 (2): 137-141.
32. Borda E, Frulan C, Orman B, Reina S, Sterin-Borda L. 2007. Nitric oxide synthase and PGE2 reciprocal interactions in rat dent pulp: cholinergic modulation. *J of Endodon*; 33 (2): 142-147.
33. Takeichi O, Hayashi M, Tsurumachi T, Tomita T, Ogihara H, Ogosio B et al. Inducible nitric oxide synthase activity 1999. by interferon γ -producing cells

Recibido: 25-02-2011

Aceptado 13-04-2011

- in human radicular cysts. *Int Endod J*;32(2):124-130.
34. Patel RP, McAndrew J, Sellak H. 1999. Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochim Biophys Acta*; 1411: 385-400.
35. Xia D, Deng D, Wang SL. 2003. Destruction of parotid glands affects nitrate and nitrite metabolism. *J Dent Res*; 82 (2): 101-105.
36. Gupta A, Batts B, Kwei KA, Dvorakova K, Stratton S, Briehl MM. 2001. Attenuation of catalase activity in the malignant phenotype plays a functional role in an in vitro model for tumor progression. *Cancer Lett*; 73:115-125.
37. Kantola S, Parikka M, Jokinen K, Hyryn Kangas K, Soini Y, Alho OP y Salo T. 2000. Prognostic factors in tongue cancer—relative importance of demographic, clinical and histopathological factors. *Br J Cancer*; 83 (5): 614-619.
38. Hinerman R, Mendenhall W, Morris C, Amdur R, Werning J, Villaret DB. 2004. Postoperative irradiation for squamous cell carcinoma of the oral cavity: 35 years the experience. *Head Neck*; 26 (11):984-994.
39. Bahar G, Feinmesser R, Shpitzer T, Popovtzer A, Nagler RM. 2007. Salivary analysis in oral cancer patients: DNA and protein oxidation, reactive nitrogen species, and antioxidant profile. *Cancer*; 109 (1):54-59.
40. Lala P, Orucevic A. 1998. Role of nitric oxide in tumor progression: lessons from experimental tumors. *Cancer Metastasis Rev*; 17(1): 91-106.
41. Liu R, Hotchkiss JH. Potential genotoxicity of chronically elevated nitric oxide: a review. *Mutat Res* 1995; 339 (2):73-89.
42. Zhao SF, Tong XY, Zhu FD. 2005. Nitric oxide induces oral squamous cell carcinoma cells apoptosis with p53 accumulation. *Oral Oncology* 41: 785-790.
43. Rosbe KW, Prazma J, Petrusz P, Mims W, Ball SS, Weissler MC. 1995. Immunohistochemical characterization of nitric oxide synthase activity in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Otolaryngol Head Neck Surg*; 113 (5): 541-549.
44. Beevi S, Rasheed AM, Geetha A. 2004. Evaluation of oxidative stress and nitric oxide levels in patients with oral cavity cancer. *Jpn J Clin Oncol*; 34 (7): 379-385.
45. Thomsen LL, Scott JM, Topley P, Knowles RG, Keerie A, Friend AJ. 1997. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase inhibits tumour growth in vivo. Studies with 1400W a novel inhibitor. *Cancer Res*; 57 (15):3300-3304.
46. Campo-Trapero J, Cano-Sánchez J, López-Durán M, Palacios-Sánchez B, Sánchez-Gutiérrez J, Bascones-Martínez A. 2008. Marcadores de senescencia celular en cáncer y precáncer oral. *Avances en Odontología*; 24(1):69-80.
47. Genco R. 1996. Current view of risk factors for periodontal diseases. *J Periodontol*; 67: 1041-1049.
48. Kinane D, Demuth D, Gorr S, Hajishengallis G, Martin M. 2007. Human variability in innate immunity. *Periodontol* 45: 14-34.
49. Merchant A, Pitiphat W. Researching periodontitis: challenges and opportunities. *Clin Periodontol* 2007; 34: 1007-1015.
50. Chapple I, Matthews J. 2000. El papel de las especies reactivas de oxígeno y antioxidantes en la

Recibido: 25-02-2011

Aceptado 13-04-2011

- destrucción del tejido periodontal. *Periodontol.* 2008; 18:100-149.
- 51.Segal AW. How Neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol* 2005; 23:197-223.
- 52.Elhim C, Bailly S, Chollet-Martin S, Hakim J, Gougerout- Pocidalo M. 1994. Differential priming of proinflammatory cytokines on human neutrophil oxidative burst in response to bacterial N-formyl peptides. *Infect Immun*; 62: 2195-2201.
- 53.Gustafsson A, Åsman B, Bergstrom K. 1997. Priming response to inflammatory mediators in hyperreactive peripheral neutrophils from adult periodontitis. *Oral Dis*; 3: 167-171.
- 54.Allen DB, Maguire J, Mahdavian M, Wicke C, Marcocci L, Scheuenstuhl H, et al. 1997. Wound hypoxia and acidosis limit neutrophil bacterial killing mechanisms. *Arch Surg*; 132; 991-996.
55. Fredriksson M, Gustafsson A, Bergstrom K, Åsman B. 1998. Hyperreactive peripheral neutrophils in adult periodontitis: generation of and FccR-stimulation. *J Clin Periodontol*; 25: 395-398.
- 56.Panjamurthy K, Manoharan S, Ramachandran CR. 2005. Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with periodontitis. *Cell Mol Biol Lett*; 10: 255-264.
- 57.Tsai CC, Chen HS, Chen SL, Ho YP, Ho KY, Wu YM et al. 2005. Lipid peroxidation: a possible role in the induction and progression of chronic periodontitis. *J Periodontal Res*; 40 (5): 378-384.
- 58.Tüter G, Kurtis B, Serdar M. 2001. Interleukin-1b and thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) levels after phase I periodontal therapy in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol*; 72(7): 883-888.
- 59.Sobaniec H, Sobaniec-Lotowska ME. 2000. Morphological examinations of hard tissues of periodontium and evaluation of selected processes of lipid peroxidation in blood serum of rat in the course of experimental periodontitis. *Me Sci Mont*; 6(5):875-881.
60. Di Paola R, Marzocco S, Mazzon E, Dattola F, Rotondo F, Britti D et al. 2004. Effect of aminoguanidine in ligature-induced periodontitis in rats. *J Dent Res*; 83 (4): 343-348.
- 61.Silver I, Murrills R, Etherington D. 1988; Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts. *Exp Cell Res* 175: 266-276.
- 62.Sawamoto Y, Sugano N, Tanaka H, Ito K. 2005. Detection of periodontopathic bacteria and an oxidative stress marker in saliva from periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol*; 20 (4): 216-220.
- 63.Phillips M, Cataneo RN, Greenberg J, Munawar MI, Nachnani S, Samtani S. 2005. Pilot study of a breath test for volatile organic compounds associated with oral malodor: evidence for the role of oxidative stress. *Oral Dis*; 11 (Suppl. 1): 32-34.
- 64.Takane M, Sugano N, Iwasaki H, Iwano Y, Shimizu N. 2002. New biomarker evidence of oxidative DNA damage in whole saliva from clinically healthy and periodontally diseased individuals. *J Periodontol*; 73: 551-554.
65. Çanakçı C, Çanakçı V, Tatar A, Itas A, Sezer U, Çiçek Y, Oztas S. 2009. Increased salivary level of 8-hydroxydeoxyguanosine is a marker of premature oxidative mitochondrial DNA damage in gingival tissue of patients with periodontitis. *Arch.*

Recibido: 25-02-2011

Aceptado 13-04-2011

Immunol. Ther. Exp; 57: 205-211.

66.Sugano N, Kawamoto K, Numazaki H, Murai S, Ito K. 2000. Detection of mitochondrial DNA mutations in human gingival tissues. *J Oral Sci*; 42 (4):221-223.

67. Çanakiç C, Tatar A, Çanakiç V, Cicek Y, Oztas S, Orbak R. 2006. New evidence of premature oxidative DNA damage: mitochondrial DNA deletion in gingival tissue of patients with periodontitis. *J Periodontol*; 77(11): 1894-1900

68.Berdeli A, Gürkan A, Emingil G, Atilla G, Köse T. 2006. Endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp gene polymorphism in periodontal disease. *J Periodontol*; 77(8):1348-1354.

69.Rámirez L, Sandoval G. 2004. Desordenes temporomandibulares, síndromes odontológicos y dolor craneofacial. *Acta de Otorrinolaringología & Cirugía de cabeza y cuello*; 32 (2): 60-75.

70.Tomida M, Ishimura J, Hayashi T, Nakamura K, Murayama K y Era S. 2003. The redox states of serum and synovial fluid of patients with temporomandibular joint disorders. *Japan J of physiol.*; 53:351-355.

71. Cai HX, Luo JM, Li XD, Cheng Y. 2006. Free- radical oxidation and superoxide dismutase activity fluid of patients with temporomandibular disorders. *J Orofac Pain.*; 20 (1):53-58.

72.Milan SB, Zardeneta G, Schmitz JP. 1998. Oxidative stress and degenerative temporomandibular joint disease: a proposed hypothesis. *J Oral Maxillofac Surg.*; 56 (2): 214-223

73.Li C, Jackson RM. 2002. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol*; 282 (2):227-24.

74.Suenaga S, Abeyama K, Hamasaki A, Mimura T, Noikura T. 2001. Temporomandibular disorders: relationship between joint pain and effusion and nitric oxide concentration in the joint fluid *Dentomaxillofac Radiol.*; 30 (4): 214-218.

75.Dijkgraaf LC, Zardeneta G, Cordewener FW, Liem RS, Schmitz JP, de Bont LG et al. 2003. Crosslinking of fibrinogen and fibronectin by free radicals: a possible initial step in adhesion formation in osteoarthritis of the temporomandibular joint.; *J Oral Maxillofac Surg* 61(1):101-111.

Recibido: 25-02-2011

Aceptado 13-04-2011