

## EFFECTO DEL ÓXIDO NÍTRICO EN LA PERIODONTITIS. REVISIÓN DE LA LITERATURA

Nuvia M. Sánchez C.\* • Antonio J. Rodríguez-Malaver\*\* • Eduvigis Solórzano\* • Belkís Quiñonez\*\*\*  
\* Departamento de Biopatología. Grupo de Investigaciones Biopatológicas. Facultad de Odontología. \*\* Laboratorio de Bioquímica Adaptativa, Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina. \*\*\* Departamento de Biopatología. Facultad de Odontología. Universidad de Los Andes. Mérida - Venezuela. e-mail: nuviasan@ula.ve.

### RESUMEN

El óxido nítrico (NO) es un radical libre caracterizado por presentar un electrón desapareado en su orbital externo; requiere para su síntesis enzimática del sustrato L-arginina, un átomo de oxígeno y la presencia de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). Tiene un rol importante en procesos fisiológicos como: regulación del tono vascular, modulación de la transmisión de la información sensorial y efectos inmunitarios. Sin embargo, los radicales libres y en especial el óxido nítrico participan en la etiopatogenia de ciertas enfermedades crónicas de la cavidad bucal, y son producidos en cantidades considerables durante la fagocitosis, por macrófagos y neutrófilos. El propósito de este estudio fue revisar en la literatura los aspectos relacionados con los efectos del óxido nítrico (NO) como posible factor interviniente en la naturaleza multifactorial de la periodontitis. Los resultados de estudios *in vitro* e *in vivo* demuestran que los niveles de NO y la expresión de la NOS incrementan en los fibroblastos periodontales, fluido crevicular gingival y saliva, durante la periodontitis. Se concluye que la destrucción periodontal, en la periodontitis, es consecuencia de una respuesta inmunitaria alterada frente a la placa dental, que involucra la liberación prolongada de enzimas y radicales libres con predominio de NO.

**Palabras clave:** óxido nítrico, periodontitis crónica, periodonto, radicales libres.

## EFFECT OF NITRIC OXIDE IN PERIODONTITIS. REVIEW OF THE LITERATURE

### ABSTRACT

Nitric oxide (NO) is a free radical, characterized by an unpaired electron in its outer orbital; required for enzymatic synthesis of the substrate L-arginine, an oxygen atom and the presence of the enzyme nitric oxide synthase (NOS). Has an important role in physiological processes such as regulation of vascular tone, modulation of sensory information transmission and immune effects. However, free radicals and nitric oxide in particular are involved in the pathogenesis of certain chronic diseases of the oral cavity, and are produced in considerable amounts, during phagocytosis by macrophages and neutrophils. The purpose of this study was to review the literature on aspects related to the effects of nitric oxide (NO) as a potential intervening factor in the multifactorial nature of chronic periodontitis. The results of *in vitro* and *in vivo* showed that the levels of NO and the expression of NOS increased in periodontal fibroblasts, gingival crevicular fluid and saliva in periodontitis. It is possible to conclude that the destruction periodontal, during the periodontitis,

is a consequence of a response inmunitaria altered opposite to the dental plaque, which involves the long liberation of enzymes and radical free with predominance of NO.

**Key words:** nitric oxide, chronic periodontitis, periodontal, free radicals.

## Introducción

Los radicales libres son moléculas orgánicas e inorgánicas extremadamente inestables y muy reactivas debido a que poseen un electrón desapareado con capacidad de tomar electrones de otros átomos y moléculas como los lípidos, proteínas y el material genético que las constituyen. También se conocen como especies reactivas que pueden originarse del oxígeno y nitrógeno; son perjudiciales cuando se producen en exceso bajo ciertas condiciones, como en caso de inflamación, isquemia/reperfusión y la presencia catalítica del ión hierro, condiciones en las que los antioxidantes endógenos no pueden evitar su formación (1).

El óxido nítrico (por su nomenclatura química) NO, considerado como una molécula vital en los procesos inflamatorios, 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 sintasas de óxido nítrico (NOS). Está involucrado en la regulación de diversos procesos fisiológicos como: angiogénesis, inmunológicos, tono vascular, señalización celular, neurotransmisión; y mecanismos patológicos (procesos inflamatorios), participando de manera importante en la defensa del huésped. Es producido por muchas células del organismo como las células endoteliales, neuronales, neutrófilos y macrófagos (1,2).

La sobreproducción de NO durante la inflamación es favorecida por la presencia de citoquinas que participan en la defensa contra los microorganismos invasores pero también contribuyen a los daños en los tejidos del huésped (3). Por otro lado, las bajas concentraciones de

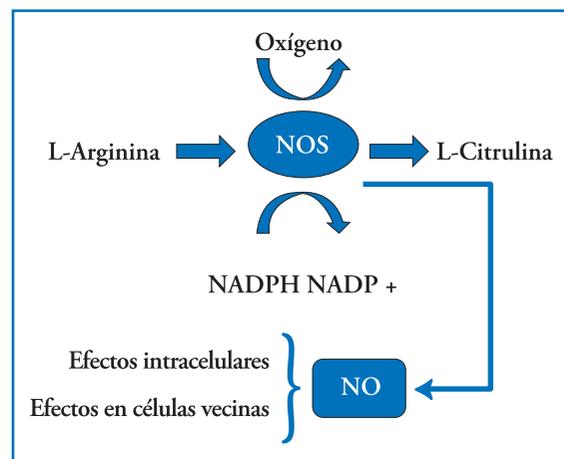
NO se relacionan con la homeostasis en los tejidos cumpliendo funciones importantes (4).

Las enfermedades inflamatorias crónicas se corresponden con un aumento en el estrés oxidativo que es la etapa en la que 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 más importantes moléculas (5). Los fagocitos (neutrófilos y macrófagos) exacerbaban este proceso mediante el estallido respiratorio u oxidativo con la generación de NO y otros radicales libres (6). La periodontitis es un proceso inflamatorio iniciado por la biopelícula de placa dental, el cual conduce a la pérdida de la inserción periodontal por destrucción del tejido conectivo y hueso alveolar (7). Actualmente se conoce que la periodontitis no afecta por igual a toda la población humana y que eventos multifactoriales como el tipo de infección bacteriana, la susceptibilidad genética del hospedero y su respuesta metabólica, su condición sistémica y los factores anatómicos locales, hacen que los métodos diagnósticos y tratamiento no sean universales (8). En tal sentido, como los radicales libres y en especial el óxido nítrico influyen en los procesos inflamatorios de la cavidad oral, y son producidos en cantidades considerables por macrófagos y neutrófilos, el propósito de este estudio fue revisar en la literatura los aspectos relacionados con los efectos del óxido nítrico (NO) como posible factor interviniente en la naturaleza multifactorial de la periodontitis crónica.

## Óxido nítrico (NO)

El NO es considerado un gas con propiedades de radical libre (presenta un electrón no apareado), que funciona como una molécula mensajera de gran inestabilidad y vida corta, con vida media de 5-10 s (segundos). El NO circula por cualquier parte de la membrana de la célula productora (endotelial) de manera bidireccional, debido a que es liposoluble con bajo peso molecular y pequeño diámetro, sin requerir ningún transportador de membrana. En el sistema nervioso no cuenta con receptores de membrana, penetrando por afinidad lipofílica en la célula diana, donde regula muchos sistemas enzimáticos, no es metabolizado por enzimas específicas, degradado espontáneamente por oxidación o por compuestos tales como el anión superóxido o la oxihemoglobina. Es sintetizado mediante la conversión de L-arginina a L-citrulina y NO (Figura 1), por acción de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). Se han identificado tres isoenzimas de NOS: la neuronal (NOSn), la endotelial (NOSe), y la inducible (NOSi). Las dos primeras llamadas también sintasas de la vía constitutiva (NOSc), se sintetizan en pequeñas cantidades durante cortos períodos de tiempo, se expresa tanto en la célula endotelial como en las neuronas del sistema nervioso, transformando la L-arginina en citrulina y produciendo equimolarmente el NO, su actividad es dependiente de  $Ca^{2+}$ /calmodulina. En la célula endotelial la actividad de la isoforma NOSe, es dependiente de la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  libre que modula así la síntesis del NO y por lo tanto el tono vascular. Estas tres isoformas son hemo-flavoproteínas que requieren de nicotinamina adenina dinucleótido fosfato (NADPH), dinucleótido de flavina-adenina (FAD) y tetrahidrobiopterina ( $BH_4$ ) como co-factores. La actividad de estas enzimas es controlada mayormente al ser fosforiladas y desfosforiladas. Así, la fosforilación reduce sig-

nificativamente la actividad de NOSn, mientras que incrementa la actividad de NOSe. En el caso de la NOSi, es estrechamente regulada a nivel de expresión por varios factores transcripcionales (1,9-11).



**Figura 1.** Producción de óxido nítrico. Mackenzie IS, Rutherford D, MacDonald TM. Nitric oxide and cardiovascular effects: new insights in the role of nitric oxide for the management of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2008; 10 (2): 1-12.

La NOSi es producida en grandes cantidades como respuesta a estímulos proinflamatorios. La principal fuente de la NOSi son los macrófagos y las células endoteliales (10,12,13). En investigaciones *in vitro* se puede observar la producción de NO en fibroblastos de tejido gingival de humanos en presencia de citoquinas pro-inflamatorias como interleuquina IL-1  $\beta$ , factor de necrosis tumoral alfa (TNF  $\alpha$ ), y el interferón gamma (IFN  $\gamma$ ) que cumplen efectos sinérgicos para la inducción de la NOSi (14). El proceso de síntesis del NO puede estar regulado por acción de la arginasa (15) que resulta en la carencia de arginina para su síntesis y es bloqueado por derivados de la L-arginina tales como: metiléster de la  $N^{\omega}$ -nitro-L-arginina (L-NAME) y la  $N^{\omega}$ -nitro monometil-L-arginina

(L-NNMA), sustancias que inhiben la transformación de L-arginina en el NO (2). Como el NO es inestable con una corta vida media, en presencia de oxígeno, rápidamente se oxida para producir óxidos de nitrógeno lo que hace que resulte difícil su medición de manera directa. En tal sentido, genera como producto de sus reacciones con el oxígeno y biomoléculas: nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ); nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), nitrosioles (RSNO), peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), proteínas nitradas y lípidos nitrados (11,16).

## Funciones del NO

El NO es un importante biorregulador de varios procesos fisiológicos que incluyen: regulación del tono vascular mediante la relajación muscular de los vasos sanguíneos, neuromodulación del sistema nervioso central, formación y resorción de hueso, inhibición de la agregación plaquetaria, acciones inmunocitotóxicas y transducción de señales (10,13,17). Como efecto inmunológico el NO derivado de la NOSi de los macrófagos, inhibe la producción de adenosina trifosfato (ATP) y de DNA, por consiguiente impide la proliferación patógena de bacterias, hongos y parásitos (13,14).

Como mediador intercelular los niveles incrementados del NO están asociados en muchos casos con una citotoxicidad celular no específica mediada por la activación de procesos inmunes y relacionados con ciertas afecciones crónicas, como son los procesos inflamatorios autoinmunes: diabetes insulino-dependiente, artritis reumatoidea, esclerosis múltiple, y ciertos procesos inflamatorios intestinales (18, 19).

En la regulación del tono vascular, la actividad fisiológica del NO depende de su interacción con la enzima guanilato ciclasa, con su activación y generación de segundos mensajeros de guanosina monofosfato cíclico (GMPc), participa de esta forma, como potente factor vascular endotelial (11,18). Una deficiencia en

la formación de NO se ha implicado en la patogénesis de ciertas enfermedades, tales como: la hipertensión arterial, la aterosclerosis, la angina y el vasoespasma (10). Sin embargo, las cantidades picomolares de NO producida por la vía de la NOSc son suficientes para las señalizaciones intracelulares. Mientras la concentración micromolar de NO producida por la NOSi tiene efectos antibacterial, proinflamatorias y dañan células y tejidos (14,20).

El NO ha sido considerado un mensajero neuronal con características particulares, no se acumula en vesículas pre-sinápticas y no se libera por exocitosis, además no presenta receptores específicos post-sinápticos (21). Estudios realizados por Jaramillo (22) sugieren que el NO participa de alguna manera en el proceso de nocicepción, con la posibilidad de que manipulaciones en la vía L-arginina-NO-GMPc pueden ser útiles en el tratamiento de diferentes tipos de dolor. Por otra parte, Bogdanov y col. (23) mencionan que la sensibilización central es regulada parcialmente por activación de los receptores del ácido N-metil-D-aspartato (NMDA), que se relaciona con la producción de NO neuronal, a través de la liberación pre-sináptica de glutamato, el cual produce flujo transmembranal de calcio y activación de NOSn, de esta forma puede modular la hiperexcitabilidad de neuronas dorsales y participar como pronociceptivo en estados de dolor.

## Periodontitis y NO

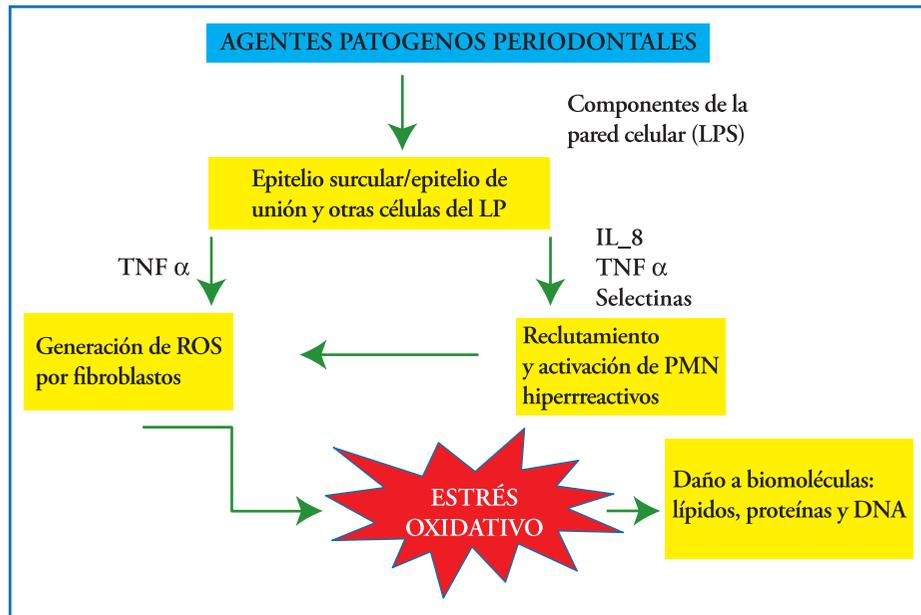
El periodonto es un sistema compuesto de dos tejidos duros (cemento y hueso alveolar) y dos tejidos blandos (ligamento periodontal y encía), (24). Una de las funciones importantes del periodonto es amortiguar las fuerzas oclusales enviadas al diente y ajustar la estructura morfológica del mismo periodonto contra las fuerzas mecánicas. El papel de los fibroblastos entre otras células, del ligamento periodontal es producir

varias citoquinas y factores de crecimiento ante cualquier agente nocivo (25). Estos factores controlan funciones celulares y moleculares dentro del periodonto, como la protección y remodelado de los tejidos periodontales. Las células del ligamento periodontal responden a estímulos mecánicos con la activación de la IL-1 $\beta$  y la síntesis de prostaglandina E (PGE), reclutamiento y migración de leucocitos polimorfonucleares (PMNs) hacia el sitio de la infección periodontal, donde los neutrófilos son los pilares en la defensa (26). Las células de defensa son capaces de contener y eliminar las endotoxinas bacterianas, derivadas de patógenos en una primera etapa, cuando esto ocurre la enfermedad periodontal se limita a gingivitis; de lo contrario si estos mecanismos fallan, y los patógenos o sus productos continúan penetrando los tejidos del hospedero, la enfermedad se convierte en periodontitis (8,27-29). La periodontitis es una inflamación crónica multifactorial que afecta el aparato de inserción del diente y como consecuencia de las reacciones huésped-patógeno (30), produce pérdida excesiva de hueso alveolar y en algunos casos de los dientes, por migración del epitelio de unión con la formación de bolsas periodontales (28,30, 31).

Existen factores que pueden influir directamente en la susceptibilidad de la periodontitis tales como: genéticos, ambientales, inmunitarios, entre otros; siendo la infección un requisito necesario para su aparición (32). Sin embargo, no todos los individuos responden de la misma manera a tal infección, en este sentido existen influencias genéticas que determinan su evolución. Como genotipos específicos que están en el cromosoma 2q y los polimorfismos de los genotipos de IL-1, IL-1 $\beta$  y IL-1RN identificados como factores de riesgo para la destrucción periodontal (33-37).

En vista de la naturaleza multifactorial de la enfermedad periodontal su etiopatogenia ha cambiado de ser un proceso infeccioso como consecuencia de malos hábitos de higiene, a un

proceso mucho más profundo con implicaciones genéticas y moleculares que pueden determinarse mediante la presencia de ciertos marcadores bioquímicos e inmunológicos presentes en la saliva y fluido gingival (15,38-40). Durante la inflamación e infección de los tejidos periodontales, los neutrófilos que migran por quimiotaxis, en su proceso de fagocitosis contra las bacterias patógenas, liberan sustancias como: citoquinas, especies reactivas de oxígeno, especies reactivas de nitrógeno, mieloperoxidasas y lactoferrina que actúan contra las bacterias pero también contra los tejidos (33,40-42). En respuesta a procesos inflamatorios crónicos, como en la periodontitis crónica, los tejidos reaccionan con sobre-producción de radicales libres (Figura 2), por parte de los neutrófilos, en las bolsas periodontales donde predominan ciertas condiciones como: una presión mínima de oxígeno de 1% y un pH de 7,0-7,5 (43). La elevada producción de radicales libres lleva a un desbalance entre estos y la capacidad antioxidante con mayor predisposición para el desarrollo y persistencia de enfermedades producto del estrés oxidativo (5,33,42,43). Las enzimas antioxidantes: glutatión peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa aumentan considerablemente en muestras de tejido gingival de pacientes con periodontitis, comparado con sujetos sanos (44). Según Borges y col. (45), el aumento de la glutatión peroxidasa y glutatión transferasa puede representar una compensación en reacciones de detoxificación de peróxidos orgánicos producidos durante el estrés oxidativo que permiten neutralizar los hidroperóxidos liberados durante los procesos de peroxidación lipídica. En otros estudios, se ha observado disminución de la actividad de las catalasas, que puede deberse a los diferentes estadios de la enfermedad (46). Sin embargo, los antioxidantes exógenos como la vitamina C y vitamina E disminuyen en plasma de sujetos con periodontitis en respuesta al daño oxidativo, reduciendo más sus valores con una nutrición deficiente (47,48).



**Figura 2.** Producción de radicales libres por los tejidos periodontales. LP (ligamento periodontal), LPS (lipopolisacáridos), ROS (especies reactivas de oxígeno), PMN (polimorfonucleares). Chapple I, Matthews J. El papel de las especies reactivas de oxígeno y antioxidantes en la destrucción del tejido periodontal. *Periodontol* 2000 2008; 18:100-149

En condiciones de hipofunción del ligamento periodontal por insuficiente estimulación oclusal disminuye la expresión de NOSi y NOSe, esta última, relacionada con disminución del flujo sanguíneo, y aumenta con recuperación de la función oclusal (49), en estas condiciones el NO puede incrementarse por estimulación mecánica. Hallazgos reportados, realizados por Kikuri y col (25), señalaron la capacidad de los fibroblastos del ligamento periodontal en humanos para producir NO e investigaron, si las fuerzas tensiles cíclicas pueden promover la producción de éste, hallando que estas células producen NO, en condiciones normales y que el estímulo mecánico refuerza fuertemente la producción de este radical, medidos mediante la expresión de la enzima NOSe.

En los tejidos periodontales y en fluidos como la saliva, el NO a bajas concentraciones, funciona como parte de los mecanismos de defensa inespecífica. No obstante, en altas concentraciones puede producir daños y destrucción

de los tejidos periodontales. Existe una relación directa entre los niveles de NO, medido mediante concentraciones de nitrato en saliva, con la profundidad de la bolsa periodontal de  $\geq 4$  mm - 7 mm, es decir, aquellos pacientes con periodontitis crónica moderada con profundidad de bolsa de 4-6 mm las concentraciones de nitratos son de  $7,78 \mu\text{M}$  y en pacientes con periodontitis crónica avanzada con profundidad de bolsa  $\geq 6$  mm los valores son de  $15,79 \mu\text{M}$  a diferencia de los pacientes sanos cuyas concentraciones de nitrato son de  $5,86 \mu\text{M}$  (50). Al igual que la expresión de la NOS en muestras de biopsia de tejido gingival de pacientes con enfermedad periodontal. Los fibroblastos son células que prevalecen en los tejidos periodontales, y en medios de cultivo que contienen calcio liberan radicales libres (51).

La síntesis de NO incrementa en la enfermedad periodontal como resultado de la infiltración de polimorfonucleares en el tejido periodontal (20). Según Choi y col. (52), existe la posibilidad de que la placa bacteriana sea responsable de la activación de la NOSi a través de los microorganismos presentes que favorecen altas expresiones de esta enzima, en fibroblastos gingivales de sujetos con periodontitis crónica comparada con fibroblastos gingivales de sujetos sanos. Algunos hallazgos han demostrado que los liposacáridos de microorganismos como: *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* y *P. gingivalis*, flora patógena que predomina en la periodontitis, inducen significativamente la producción de NOS en macrófagos (53,54).

Como biomarcadores del daño oxidativo, producto de los efectos de los radicales libres, especies reactivas de oxígeno (ROS), y especies reactivas de nitrógeno (RNS) sobre las biomoléculas del organismo, han sido determinados los daños en la molécula de DNA, de los tejidos periodontales de pacientes con periodontitis. En tal sentido, Ozmeric (33) encontró niveles aumentados de 8-hidroxi-deoxiguanosina (8-OHdG) en comparación con sujetos sanos; que indicaron el ataque a las bases nitrogenadas con las consiguientes modificaciones en la información genética. Por otra parte, existen delecciones en el 5 kilo base pairs (kbp) del mtDNA (DNA mitocondrial) en muestras de tejido gingival de sujetos con periodontitis que conducen a la disminución en la capacidad bioenergética de la célula (37) y polimorfismos en los alelos 298Asp de la NOSe pueden predisponer a una periodontitis crónica en una población de Turquía (55). En los lípidos, los niveles de malondialdehído producto de la peroxidación lipídica, se encontraron elevados en saliva y líquido crevicular gingival de pacientes con periodontitis (56,57) con tendencia a incrementarse en pacientes fumadores (58). Se ha sugerido que el malondialdehído puede producir modificacio-

nes en el colágeno que conducen a alteraciones en funciones de los fibroblastos, como la adhesión y la proliferación (59).

La acumulación de hidroperóxidos lipídicos altera la función de las membranas celulares con pérdida de permeabilidad selectiva y cambios electrolíticos dentro de la célula. Además, compuestos orgánicos volátiles como los alcanos metilados que pueden ser producto de la peroxidación de lípidos, se encuentran en el aire tomado de la cavidad bucal de pacientes con periodontitis y han sido relacionados con halitosis (60). En cuanto al efecto de los radicales libres o sus especies reactivas sobre las proteínas, este radica en la localización de nitrotirosina en los tejidos dentarios obtenidos de ratas sometidas a la inducción de periodontitis mediante ligadura (61). El daño de las proteínas conduce a un plegamiento defectuoso y deficiencias en sus estructuras primarias y cuaternarias que disminuyen su función y son más sensibles a la degradación por las proteasas (62).

Durante la periodontitis el eje monocitario-linfocitario del hospedero se estimula y localmente libera mediadores inflamatorios, como los metabolitos del ácido araquidónico (PGE<sub>2</sub>, leucotrienos y lipoxinas) y citoquinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ ) que activan la enzima NOSi para la producción de NO (63,64,65). De tal forma, estos mediadores inflamatorios a largo plazo causan destrucción tisular local, con la formación de la bolsa periodontal y la pérdida de hueso alveolar (66,67). Así mismo, las condiciones ambientales locales secundarias de la inflamación, como la baja tensión de oxígeno, favorecen el crecimiento de bacterias anaerobias que soportan la microbiota patogénica y perpetúan el ciclo patogénico (14, 43,53). En tal sentido, Roger (8) manifiesta que las técnicas diagnósticas convencionales como el sondeo periodontal para determinar la profundidad de la bolsa, la reacción de los tejidos al sondeo periodontal (sangrado) y las

radiografías periapicales aportan información fundamentadas en las características presentes en el paciente y hallazgos del clínico pero no proporcionan informan temprana de los procesos reguladores del periodonto. Por tal motivo, la investigación se ha encaminado a descubrir elementos metabólicos del hospedero que estén involucrados con el inicio y la actividad de la enfermedad, que puedan ser desencadenantes del proceso inflamatorio y causar pérdida de la matriz extracelular y reabsorción ósea (68,69).

Los cambios ocurridos durante el proceso salud-enfermedad del periodonto pueden ser monitoreados a través del fluido gingival o crevicular, que es un transudado (en condiciones basales o de normalidad) o exudado (en el proceso inflamatorio) y contiene una gran cantidad de factores bioquímicos (69-71). Por el hecho de ser un fluido obtenido del flujo de la filtración capilar de los vasos sanguíneos, vasos linfáticos y los epitelios de unión y surcular puede coleccionar productos metabólicos, tales como: mediadores inflamatorios, enzimas bacterianas, proteínas plasmáticas y productos de la degradación de la matriz extracelular; que logran funcionar como biomarcadores para el diagnóstico o pronóstico del estado biológico del periodonto en salud y enfermedad (69,72, 73).

Con relación a la pérdida ósea, algunos estudios *in vitro* sugieren que el NO disminuye la reabsorción ósea por inhibir la formación y actividad de los osteoclastos, guía hacia apoptosis a las células precursoras de osteoclastos y aumenta la función de los osteoblastos (68), pero otros hallazgos indican que el NO promueve la maduración de los osteoclastos y aumenta la reabsorción ósea causada por citoquinas (73).

Lohinai y col. (74) evaluaron la actividad de la NOSi en periodontitis inducida por ligadura en rata y demostraron su presencia en células inflamatorias y células epiteliales. Otros estudios similares reportaron altas expresiones de NOSi en tejido gingival de pacientes con

periodontitis crónica comparado con pacientes sanos (75). Además, de una alta expresión de NOSi en queratinocitos de células epiteliales de tejido periodontal inflamado (76). De igual manera, la estimulación por un receptor de adenosina activa la producción de NO por macrófagos y leucocitos polimorfonucleares guiado por la NOSi en células epiteliales gingivales que favorece la progresión de la enfermedad (77). Por otra parte la expresión de NOSi disminuye después de la terapia periodontal (78).

Mediante el uso de mercaptoetilguanidina, inhibidor selectivo de la NOSi que también inhibe las citoquinas que inducen la producción de esta enzima, puede prevenirse la destrucción de hueso alveolar en periodontitis inducida por ligadura en ratas (74). Adicionalmente, algunos estudios mencionan que sólo esta isoforma es involucrada en la enfermedad periodontal inflamatoria y no las otras isoformas constitutivas (12). Así mismo, mediante el uso de inhibidores de NOS como la aminoguanidina en un modelo experimental de periodontitis en ratas, se observó una disminución en los niveles de malondialdehído (61); que es un marcador biológico de la peroxidación lipídica.

Estudios realizados por Chen y Sun (79), evidencian la relación entre el aumento de los niveles de NO (como nitritos) en saliva y la severidad de la enfermedad periodontal, en pacientes con periodontitis cotejados con pacientes sanos. Hallazgos similares, revelan que el NO medido mediante concentraciones de nitrito en la saliva de pacientes con periodontitis crónica fue significativamente mayor que en saliva de los sujetos sin periodontitis (50), a diferencia de lo encontrado por Aurer y col. (80) quienes observaron una disminución de nitritos en saliva de pacientes con periodontitis.

También se han evaluado las concentraciones de L arginina y L citrulina en tejido periodontal inflamado de pacientes con periodontitis crónica moderada, como indicadores

de la actividad de la NOSi para producir NO (81). En este sentido, otro hallazgo importante fue el encontrado por Téllez y col. (82) quienes determinaron los niveles de arginina (precursor del NO) y glutamato, en el fluido gingival de pacientes con periodontitis crónica y observaron un incremento significativo, en los niveles de arginina con disminución en glutamato en pacientes con periodontitis crónica comparados con sujetos sanos.

## Conclusiones

El óxido nítrico es un radical libre que cumple funciones fisiológicas en la regulación del tono vascular, modulación de la transmisión de la información sensorial y efectos inmunitarios. Cuando existe un aumento en la producción de NO ocurre el estrés oxidativo que se relaciona con la patogenia de una serie de enfermedades inflamatorias incluyendo a la periodontitis y desempeña un papel directo o indirecto en el deterioro de los tejidos. De su interacción con las biomoléculas se obtienen metabolitos que son reconocidos como biomarcadores en una amplia variedad de enfermedades. Los niveles de NO se incrementan en la periodontitis debido a la infiltración de neutrófilos y macrófagos en el tejido periodontal. Por otra parte, se considera que la destrucción periodontal, durante la periodontitis, es consecuencia de una respuesta inmunitaria alterada frente a la placa dental, que involucra la liberación prolongada de enzimas y radicales libres con predominio de NO. En tal sentido, las concentraciones de NO, de sus inhibidores o de ambos pueden ser usadas como elementos de diagnóstico y tratamiento de la periodontitis. Sin embargo, existen aspectos fisiológicos y patológicos del NO sobre la periodontitis que ameritan mayor investigación, y que pueden proponer futuros tratamientos que permitan evaluar el desarrollo y progresión de esta enfermedad.

## Referencias

1. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radical and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 39 (1): 44-84.
2. Díaz J, Juárez M. *Bioquímica. Un enfoque básico aplicado a ciencias de la vida*. México: McGraw-Hill; 2007.
3. Lohinai Z, Stachlewitz R, Virág , Székely AD, Haskó G, Szabó C. Evidence for reactive nitrogen species formation in the gingivomucosal tissue *J Dent Res* 2001; 80 (2): 470-475.
4. Southan GJ, Szabó C. Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. *Biochem Pharmacol* 1996; 51 (4): 383-394.
5. Ogino K, Wang DH. Biomarkers of oxidative/nitrosative stress: an approach to disease prevention. *Acta Med. Okayama* 2007; 61 (4): 181-189.
6. Sawamoto Y, Sugano N, Tanaka H, Ito K. Detection of periodontopathic bacteria and an oxidative stress marker in saliva from periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol* 2005; 20 (4): 216-220.
7. Lindhe J, Nyman S. Clinical trials in periodontal therapy. *J Periodontol Res* 1987; 22 (3): 217-221.
8. Roger M. Terapia periodontal del futuro. *Rev Colomb Méd* 2004; 35 (1): 40-47
9. Viant D, Fonseca C, Rodríguez R, Anglada P. Óxido Nítrico. Importancia biológica y participación en algunas funciones cardiovasculares y hematológicas. *MEDISAN* 1998; 2 (3): 45-53.
10. Dejam A, Hunter CJ, Schelchter AN, Gladwin MT. Emerging role of nitrite in human biology. *Blood Cells Mol Dis* 2004; 32 (3): 423-429.
11. Mote J, López R, Meza S, Rojas G, Castro V, Chávez J, Garfias J. Óxido nítrico: metabolismo e implicaciones clínicas. *Med Int Mex* 2008; 24(6): 397-406.
12. Sato EF, Choudhury T, Nishikawa T, Inoue M. Dynamic aspect of reactive oxygen and nitric oxide in oral cavity. *J Clin Biochem Nutr* 2008; 42: 8-13.
13. Ugar-Cankal D, Ozmeric N. A multifaceted molecule, nitric oxide in oral and periodontal diseases. *Clin Chem Acta* 2006; 366 (1-2): 90-100.
14. Daghigh F, Borghaei RC, Thornton RD, Bee JH. Human Gingival fibroblasts produce nitric oxide in response to proinflammatory cytokines. *J Periodontol* 2002; 73 (4): 392-400.
15. Ozmeric N, Elgün S, Uraz A. Salivary arginase in patients with adult periodontitis. *Clin Oral Investig* 2000; 4 (1): 21- 24.
16. Nagababu E, Rifkind JM. Measurement of plasma nitrite by chemiluminescence without interference of S-, N-nitroso and nitrated species. *Free Rad Biol Med* 2007; 42 (8): 1146-1154.
17. Blaise GA, Gauvin D, Gangal M, Authier S. Nitric oxide, cell signaling and cell death. *Toxicology* 2005; 208 (2): 177-192.
18. Rodrigo J, Alonso D, Fernández A, Serrano J, López J, Encinas J, Vizarra P, Castro S, Peinado M, Pedrosa J, Richard A, Martínez, Santacana M, Bentura M, Uttenthal L. El óxido nítrico: síntesis, neuroprotección y neurotoxicidad *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* 2002; 23 (2):195-236.
19. Mackenzie IS, Rutherford D, MacDonald TM. Nitric oxide and cardiovascular effects: new insights in the role of nitric oxide for the management of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2008; 10 (2): 1-12.
20. Brennan PA, Thomas GJ, Langdon JD. The role of nitric oxide in oral diseases. *Arch Oral Biol* 2003; 48 (2): 93-100.

21. Rubio-Donnadieu, F. Efectos del óxido nítrico en el sistema nervioso central. *Gac. Med. Mex* 2007; 143 (5): 409-411.
22. Jaramillo P. Óxido nítrico y dolor. *MEDUNAB* 2001; 4 (10): 1-7.
23. Bogdanov MB, Wurtman RJ. Possible involvement of nitric oxide in NMDA-induced glutamate release in the rat striatum: an in vivo microdialysis study. *Neurosci Lett* 1997; 221(2-3):197-201.
24. Bartold P, Narayanan A. Biología molecular y celular de los tejidos periodontales sanos y enfermos. *Periodontol* 2000; 2007 16: 29-49.
25. Kikuri T, Hasegawa T, Yoshimura Y, Shirakawa T, Oguchi H. Cyclic tension force activates nitric oxide production in cultured human periodontal ligaments cells. *J Periodontal Res* 2000; 71 (4): 533-539.
26. Silva TA, Garlet GP, Fukada SY, Silva JS, Cunha FQ. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *J Dent Res* 2007; 86 (4): 306-319.
27. Miller C, King C, Langub M, Kryscio R, Thomas M. Los biomarcadores salivares de la enfermedad periodontal preexistente. *JADA* 2006; 1 (1): 26-34.
28. Kinane DF, Demuth DR, Gorr SU, Hajishengallis GN, Martin MH. Human variability in innate immunity. *Periodontol* 2000 2007; 45: 14-34.
29. Azuma M. Fundamental mechanisms of host immune responses to infection. *J Periodontal Res* 2006; 41 (5): 361-373.
30. Genco RJ. Current view of risk factors for periodontal diseases. *J Periodontol* 1996; 67 (10S): 1041-1049.
31. Merchant AT, Pitiphat W. Researching periodontitis: challenges and opportunities. *J Clin Periodontol* 2007; 34 (12): 1007-1015.
32. Zerón A. Odontología genómica. La medicina oral del siglo XXI. *ADM*.2006; LXIII(2): 52-61.
33. Ozmeric N. Advances in periodontal disease markers. *Clin Chem Acta* 2004; 343 (1-2): 1-16.
34. Orozco A, Gemmell E, Bickel M, Seymour GJ. Interleukin 18 and periodontal disease. *J Dent Res* 2007; 86(7): 586-593.
35. Kinane DF, Shiba H, Hart TC. The genetic basis of periodontitis. *Periodontol* 2000, 2005; 39: 91-117.
36. Nares S. Relación de la genética con la enfermedad periodontal. *Periodontol* 2000 2003; 32: 36-49.
37. Çanakiç CF, Tatar A, Çanakiç V, Cicek Y, Oztas S, Orbak R. New evidence of premature oxidative DNA damage: mitochondrial DNA deletion in gingival tissue of patients with periodontitis. *J Periodontol* 2006; 77 (11): 1894-1900.
38. Sahingur S, Cohen R. Análisis de las respuestas del huésped y riesgo de progresión de la enfermedad. *Periodontol* 2000 2005; 9: 57-83.
39. Çanakiç CF, Çiçek Y, Canakçi V. Reactive oxygen species and human inflammatory periodontal disease. *Biochemistry (Mosc)* 2005; 70 (6): 619-628.
40. Król K. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in the pathogenesis of periodontitis. *Ann Acad Med Stetin* 2004; 50 (2): 135-148.
41. Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology* 2003; 189 (1-2):41-54.
42. Castro CE, Koss MA, López ME. Biochemical markers of the periodontal ligament. *Med Oral* 2003; 8 (5): 322-328.

43. Eggert FM, Drewell L, Bigelow JA, Speck JE, Goldner M. The pH gingival crevices and periodontal pockets in children, teenagers and adults. *Arch oral Biol* 1991; 36 (3): 233-238.
44. Panjamurthy K, Manoharan S, Ramachandran CR. Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with periodontitis. *Cell Mol Biol Lett* 2005; 10 (2): 255-264.
45. Borges I, Moreira EA, Filho DW, Oliveira TB, da Silva MB, Fröde TS. Proinflammatory and oxidative stress markers in patients with periodontal disease. *Mediators of inflamm* 2007; (2007): 45794.
46. Chapple IL, Milward MR, Dietrich T. The prevalence of inflammatory periodontitis is negatively associated with serum antioxidant concentrations. *J Nutr* 2007; 137 (3): 657-664.
47. Moynihan P. Nutrition & Oral Health: update on nutrition and periodontal disease. *Quintessence Int* 2008; 39 (4): 326-330.
48. Tsai CC, Chen HS, Chen SL, Ho YP, Ho KY, Wu YM, Hung CC. Lipid peroxidation: a posible role in the induction and progression of chronis periodontitis. *J Periodontal Res* 2005; 40 (5): 378-384.
49. Watarai H, Warita H, Soma K. Effect of nitric oxide on the recovery of the hypofunctional periodontal ligament. *J Dent Res* 2004; 83 (4): 338-342.
50. Reher VG, Zenóbio EG, Costa FO, Reher P, Soares RV. Nitric oxide levels in saliva increase with severity of chronic periodontitis. *J Oral Sc* 2007; 49 (4): 271-276.
51. Silver IA, Murrills RJ, Etherington DJ. Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts. *Exp Cell Res*.1988; 175 (2): 266-276.
52. Choi EY, Hwang YM, Lee JY, Choi JI, Choi IS, Jin JY, Ko JS, Kim SJ. Lipid A- associated proteins from *Porphyromonas gingivalis* stimulate release of nitric oxide by inducing expression of inducible nitric oxide synthase. *J Periodontal Res* 2007; 42 (4): 350-360.
53. Sosroseno W, Barid I, Herminajeng E, Susilowati H. Nitric oxide production by a murine macrophage cell line (RAW264.7) stimulated with lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Microbiol Immunol* 2002; 17 (2): 72-78.
54. Kim SJ, Ha MS, Choi EY, Choi JI, Choi IS. Prevotella intermedia lipopolysaccharide stimulates release of nitric oxide by inducing expression of inducible nitric oxide synthase. *J Periodontal Res* 2004; 39 (6): 424-431.
55. Berdeli A, Gürkan A, Emingil G, Atilla G, Köse T. Endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp gene polymorphism in periodontal disease. *J Periodontol* 2006; 77 (8):1348-1354.
56. Guentsch A., Preshaw P, Bremer-Streck S, Klinger G, Glockmann E, Sigusch BW. Lipid peroxidation and antioxidant activity in saliva of periodontitis patients: effect of smoking and periodontal treatment. *Clin Oral Investig* 2008; 12 (4): 345-352.
57. Garg N, Singh R, Dixit J, Jain A, Tewari V. Levels of lipid peroxides and antioxidants in smokers and nonsmokers. *J Periodontal Res* 2006; 41 (5): 405-410.
58. Zambon JJ, Grossi SG, Machtei EE, Ho AW, Dunford R, Genco RJ. Cigarette smoking increases the risk for subgingival infection with periodontal pathogens. *J Periodontol* 1996; 67 (10S):1050-1054.
59. Rittié L, Monbiosse JC, Girisse MC, Gillery P. Malondialdehyde binding to proteins dramatically alters fibroblast functions. *J Cell Physiol* 2002; 191 (2):227-236.
60. Phillips M, Cataneo RN, Greenberg J, Munawar M, Nachnani S, Samtani S. Pilot study of a breath test for volatile organic compounds associated with oral malodor: evidence for the role of oxidative stress. *Oral Dis.* 2005; 11 (1): 32-34.

61. Di Paola R, Marzocco S, Mazzon E, Dattola F, Rotondo F, Britti D, De Majo M, Genovese T, Cuzzocrea S. Effects of aminoguanidine in ligature-induced periodontitis in rat. *J Dent Res* 2004; 83 (4): 343-348.
62. Chapple I, Matthews J. El papel de las especies reactivas de oxígeno y antioxidantes en la destrucción del tejido periodontal. *Periodontol 2000* 2008; 18:100-149.
63. Kendall HK, Marshall RI, Bartold PM. Nitric oxide and tissue destruction. *Oral Dis* 2001; 7 (1): 2-10.
64. Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontol 2000* 1997; 14:112-143.
65. Baker PJ. The role of immune responses in bone loss during periodontal disease. *Microbes Infect* 2000; 2 (10): 1181-1192.
66. Rivarola de Gutiérrez V. Stress oxidativo en las patologías inflamatorias orales. *Rev Méd Universitaria* 2008; 4 (1):1-8.
67. Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Korma KS. Advances in the pathogenesis of periodontal summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol 2000* 1997; 14: 216-248.
68. Fan X, Roy E, Zhu L, Murphy TC, Ackert-Bicknell C, Hart CM, Rosen C, Nanes MS, Rubin J. Nitric oxide regulates receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin expression in bone marrow stromal cells. *Endocrinology* 2004; 145 (2):751-759.
69. Lamster I, Ahlo J. Analysis of Gingival Crevicular Fluid as Applied to the Diagnosis of Oral and Systemic Diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1098: 216-219.
70. Griffiths G. Formación, acumulación importancia del líquido crevicular gingival *Periodontol 2000* 2004; 6:32-42.
71. Bartold P, Narayanan A. Biología molecular y celular de los tejidos periodontales sanos y enfermos. *Periodontol 2000* 2007; 16:29-49.
72. Delima A, Van Dyke T. Origen y función de los componentes celulares del líquido crevicular gingival. *Periodontol 2000* 2004; 6:55-76.
73. Brandi ML, Hukkanen M, Umeda T, Moradi-Bidhendi N, Bianchi S, Gross SS, Polak J, MacIntyre I. Bidirectional regulation of osteoclast function by nitric oxide synthase isoforms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92 (7):2954-2958.
74. Lohinai Z, Benedek P, Feher E, Györfi A, Rosivall L, FASEKAS A, Salzman AL, Szabó C. Protective effects of mercaptoethylguanidine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, in ligature-induced periodontitis in the rat. *Br. J. Pharmacol* 1998; 123 (3):353-360.
75. Hirose M, Ishihara K, Saito A, Nakagawa T, Yamada S, Okuda K. Expression of cytokines and inducible nitric oxide synthase in inflamed gingival tissue. *J Periodontol* 2001; 72 (5): 590-597.
76. Kendall HK, Haase HR, Li H, Xiao Y, Bartold PM. Nitric oxide synthase type-II is synthesized by human gingival tissue and cultured human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res* 2000; 35 (4):194-200.
77. Murakami S, Yoshimura N, Koide H, Watanabe J, Takedachi M, Terakura M, Yanagita M, Hashikawa T, Saho T, Shimabukuro Y, Okada H. Activation of adenosine receptor-enhanced iNOS mRNA expression by gingival epithelial cells *J Dent Res* 2002; 81(4):236-240.

78. Güllu C, Ozmeric G, Tokman B, Elgün S, Balos K. Effectiveness of scaling and root planning versus modified widman flap on nitric oxide synthase and arginase activity in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol* 2005; 40 (2): 168-175.
79. Chen G, Sun W. The investigation on nitric oxide levels in saliva and their relationship with the severity of periodontitis. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 1999; 17 (2): 140-142 (abstract).
80. Aurer A, Aleksic J, Ivic-kardum M, Aurer J, Čulo F. Nitric oxide synthesis is decreased in periodontitis. *J. Clin Periodontol* 2001; 28 (6): 565-568.
81. Matejka M, Partyka L, Ulm C, Olar P, Sinzinger H. Nitric oxide synthesis is increased in periodontal diseases. *J Periodontol* 1998; 33 (8): 517-518.
82. Téllez, N, Aguilera N, Quiñónez, B, Silva, E, González LE, Hernández L. Arginine and glutamate levels in the gingival crevicular fluid from patients with chronic periodontitis. *Braz Dent J* 2008; 19 (4): 318-322.