

Revisiones Bibliográficas:

EL PAPEL DEL ÓXIDO NÍTRICO EN LA MODULACIÓN DEL PROCESO INFLAMATORIO DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL

Recibido para arbitraje: 22/10/2009

Aceptado para publicación: 19/01/2011

Débora Aline Silva Gomes ¹, Juliana Rico Pires ², Elizangela Partata Zuza ², José Carlos Rivas Gutiérrez ³, Benedicto Egbert Corrêa de Toledo ², Luís Carlos Spolidorio ⁴, Denise Madalena Palomari Spolidorio ⁴

1. Doctoranda del curso de post-graduación en Periodoncia del Departamento de Diagnostico y Cirugía de la Facultad de Odontología de Araraquara - Universidade Estadual Paulista (UNESP).
2. Profesor Pesquisador Doctor del Curso de Mestrado en Ciencias Odontológicas del Centro Universitario de la Fundación Educacional de Barretos (UNIFEB)
3. Doctor y Maestro por el Departamento de Odontología Restauradora de la Facultad de Odontología de Araraquara - Universidade Estadual Paulista (UNESP).
4. Profesor Libre-Docente del Departamento de Fisiología y Patología de la Facultad de Odontología de Araraquara - Universidade Estadual Paulista (UNESP).

Autor responsable de correspondencia:

Débora Aline Silva Gomes

Rua: Anselmo Marques Rodrigues, 801, casa 303. Jardim Manoel Penna. CEP: 14098-322.

Ribeirão Preto-SP. Fone (fax): (+55) (16) 39611400. E-mail: deboraagomes@yahoo.com.br

Resumen

El óxido nítrico (NO) es un radical libre que participa de prácticamente todos los procesos fisiológicos del organismo; sin embargo, en grandes concentraciones puede actuar de forma perjudicial en los tejidos. Su acción inmuno-regulatoria está presente en la inflamación y en los mecanismos de auto inmunidad, siendo intensamente estudiada en el área médica. Recientemente, algunos estudios también han citado al NO como factor etiopatogénico de la enfermedad periodontal, el cual posee naturaleza inflamatoria y multifactorial. La acción del NO depende de su concentración en el organismo, pudiendo ser benéfica o perjudicial y, basada en eso, investigaciones han enfocado el efecto de algunos inhibidores de NO como supuestos agentes terapéuticos en los procesos inflamatorios. A partir de ese contexto, este trabajo tuvo como objetivo relatar el papel del NO y de la inhibición de la óxido nítrico sintasa (NOS) en el proceso de la modulación de la enfermedad periodontal. En conclusión, se puede sugerir que el NO parece ejercer un papel fundamental en la evolución de la enfermedad periodontal inflamatoria y, que la inhibición de la NOS puede ser considerada una terapéutica promisoras en la modulación del proceso inflamatorio.

Palabras clave: óxido nítrico, enfermedad periodontal, terapéutica.

Abstract

Nitric oxide (NO) is a free radical with participation in almost all physiologic host processes; however, in high concentrations it may damage the tissues. Its immunoregulatory action is present in the inflammation and in auto-immune mechanisms, being intensively studied in the medical area. Recently, some studies have also reported that NO could play a role as etiopathogenic factor of the periodontal

disease, which shows inflammatory and multifactorial course. Due to beneficial or damage effects of NO, according to its concentrations, some studies have been focused in the evaluation of inhibitor of NO-Synthase (NOS) as therapeutic agents in inflammatory processes. In this context, the aim of this study was to report the role of NO and NOS inhibition in the periodontal disease modulation process. In conclusion, it could be suggested that NO seems to play an essential role in evolution of inflammatory periodontal disease, and that the NOS inhibition may be considered as a promising therapeutic in modulation of inflammatory process.

Keywords: nitric oxide, periodontal diseases, therapeutics.

INTRODUCCIÓN

El óxido nítrico (NO) es un radical libre con múltiples funciones biológicas¹⁻³. En cantidades fisiológicas, el NO regula el tono vascular, inhibe la agregación/adhesión plaquetaria y regula intracelularmente los efectos de aminoácidos excitatorios (4). Algunos estudios relatan que el NO posee efectos importantes en la función ósea celular y, la presencia de inhibidores de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) estaría actuando como regulador de la remodelación ósea en procesos fisiológicos o patológicos^{5,6}. La activación de NO ha demostrado ser relevante en la patogénesis de enfermedades inflamatorias, como por ejemplo, en la enfermedad periodontal. Esta importancia se da por la ocurrencia de la activación de citocinas pro-inflamatorias, que ocasionan un aumento directo en la producción de NO^{7,8}. Además de eso, el NO parece ser un importante regulador del metabolismo óseo, pues tanto los osteoblastos como los osteoclastos no sólo se producen, sino también responden a su presencia^{9,10}.

El NO es considerado el principal mediador citotóxico de células inmunes efectoras activadas, constituyéndose como una de las más importantes moléculas reguladoras del sistema inmune^{11,12} y, siendo encontrado en niveles aumentados en el tejido gingival inflamado cuando es comparado al tejido sano^{13,14}. Algunos autores^{7,15-17} asocian los niveles elevados de NO con la mayor pérdida ósea alveolar; de manera que este aumento de NO puede ser inhibido por el uso de inhibidores de la NOS. Algunos agentes considerados análogos de la L-arginina actúan como inhibidores de la NOS y, resultados alentadores vienen siendo demostrados, a fin de contribuir futuramente como agentes terapéuticos de varias enfermedades inflamatorias, inclusive para las patologías periodontales.

En los últimos veinte años, el NO ha sido blanco de muchos estudios y está constantemente sorprendiendo a la comunidad científica, dada la cantidad de procesos biológicos en que está envuelto. Frente a tales consideraciones, este trabajo tuvo como objetivo relatar el papel del NO y de la inhibición de la NOS en el proceso de la modulación de la enfermedad periodontal.

REVISIÓN DE LA LITERATURA Y DISCUSIÓN

1. Síntesis de Óxido Nítrico (NO) y Actuación de las isoformas de NO-Sintasa (NOS)

El óxido nítrico (NO) es un radical libre, gaseoso, inorgánico e incoloro, que constituye una de las menores y más simples moléculas bio-sintetizadas en el organismo^{18,19}. La síntesis del NO resulta de la oxidación de uno de los dos nitrógenos guanidino del aminoácido L-arginina, que es convertido en L-citrulina, siendo esta reacción catalizada por la enzima NO-sintasa (NOS)^{20,21}.

Una variedad de isoformas de NOS ha sido purificada en diferentes tejidos de mamíferos y muchas ya tuvieron sus genes clonados. Estudios bioquímicos y de análisis secuencial de aminoácidos revelan que estas isoformas representan una familia de proteínas y, aparentemente, son productos de genes distintos. Así, las isoformas de la NOS son agrupadas en dos categorías, la NOS constitutiva (cNOS) y la NOS inducible (iNOS). La cNOS dependiente de iones calcio (Ca⁺⁺) y de calmodulina, que están envueltos en la señalización celular, mientras que la iNOS es

producida por macrófagos y otras células activadas por citocinas ^{21,22}.

La isoforma constitutiva comprende la NOS neuronal (nNOS, tipo I), presente normalmente en las neuronas ^{23,24}, y la NOS endotelial (eNOS, tipo III), presente normalmente en las células endoteliales vasculares ²¹ y en las plaquetas (25). El NO resultante de la eNOS tiene un papel crucial en la protección del vaso sanguíneo y esta acción está asociada al mantenimiento del tono vascular ^{26,27}, regulación de la presión sanguínea ²⁷, prevención de la agregación plaquetaria ²⁸, inhibición de la adhesión de monocitos y neutrófilos al endotelio vascular ², efecto antiproliferativo ^{29,30} y efecto antioxidativo ³¹.

Mientras la eNOS esta expresa fisiológicamente en el organismo, la iNOS no está expresa sobre condiciones normales, siendo inducida por citocinas y/o endotoxinas como IL-1, TNF- α , IFN- α y LPS en una variedad de células, incluyendo macrófagos, linfocitos T, células endoteliales, miocitos, hepatocitos, condrocitos, neutrófilos y plaquetas (4, 21). Esta isoforma requiere algunas horas para ser expresa, por lo tanto, una vez sintetizada, libera cantidades mayores de NO que la cNOS. Así, la producción de iNOS continúa indefinidamente hasta que la L-arginina o los co-factores sintetizantes sean cesados, o hasta que ocurra la muerte celular ³².

El NO resultante de la activación de la iNOS posee acción citotóxica y citostática, promoviendo la destrucción de microorganismos, parásitos y células tumorales ^{4,5,33}. La citotoxicidad del NO resulta de su acción directa o de su reacción con otros compuestos liberados durante el proceso inflamatorio, pudiendo incluir una acción citotóxica contra los tejidos adyacentes del huésped, como por ejemplo, al hueso alveolar ³⁴. En procesos infecciosos, las células activadas como macrófagos, neutrófilos y células endoteliales secretan, simultáneamente, NO e intermediarios reactivos del oxígeno, siendo que la acción citotóxica indirecta del NO consiste, principalmente, en su reacción con esos intermediarios del oxígeno.

Estudios relatan que el NO es capaz de modular la actividad de osteoblastos y osteoclastos ⁶. Así, el NO parece ejercer un efecto bifásico sobre las células formadoras de hueso, pues en bajas concentraciones promueve la formación ósea, mientras que en altas concentraciones ejerce un efecto inhibitorio sobre los osteoblastos. Investigaciones in vitro ⁶ han demostrado que el NO aumenta la síntesis de osteocalcina y la formación de matriz mineralizada por los osteoblastos, mientras que la inhibición de la NO sintasa lleva a un efecto antiproliferativo de los osteoblastos. Por otro lado, la liberación de grandes cantidades de NO por células estimuladas por citocinas inflamatorias puede llevar a un efecto antiproliferativo sobre los osteoblastos. De manera similar, estos efectos estimuladores e inhibitorios han sido descritos en osteoclastos ⁶.

Evidencias han sugerido que el NO puede contribuir significativamente para algunas condiciones patológicas como asma ³⁵, artritis reumatoide (36), lesiones ateroscleróticas ³⁷, tuberculosis ³⁸, esclerosis múltiple ³⁹, Alzheimer ⁴⁰, gastritis inducida por *Helicobacter pylori* ⁴¹, diabetes ⁸ y enfermedad periodontal ⁴². En la evolución de la enfermedad periodontal inflamatoria, el NO parece ser de fundamental importancia pues, su alta producción local ha sido encontrada en varios modelos experimentales y en muestras de tejidos gingivales de humanos ^{13,14,34,43}. De esa forma, algunos estudios relacionan directamente la presencia del NO con el aumento de la reabsorción ósea alveolar ^{7,34}.

2. NO en la Enfermedad Periodontal

La enfermedad periodontal es caracterizada como un proceso inflamatorio de origen bacteriano primario, pero que presenta etiología multifactorial ⁴⁴. La gingivitis y periodontitis son tradicionalmente las dos principales categorías de enfermedad periodontal, por ello, la gingivitis es una enfermedad reversible que acomete al periodonto de protección de los dientes ⁴⁵, mientras que la periodontitis envuelve al periodonto de soporte de los dientes, tales como cemento radicular, ligamento periodontal y hueso alveolar ⁴⁶. Esas enfermedades se presentan de forma muy variada, pudiendo tener períodos de actividad intensa y de estancamiento o remisión,

siendo que su evolución está directamente relacionada a los tipos de agresores microbianos envueltos y a la respuesta inmunológica del individuo^{47,48}.

La inflamación es un mecanismo de protección del huésped a desafíos externos, pero puede ocasionar desde una lesión periodontal hasta la pérdida de la función dental en caso de no ser controlada. Por otro lado, muchas respuestas inflamatorias son limitadas o resueltas por sí solas, sugiriendo la existencia de mediadores antiinflamatorios endógenos como IL-1 β , TNF- α , IFN- α , PGE2 durante el curso de la inflamación^{14,49}. Estudios demostraron que el óxido nítrico (NO), en cantidades fisiológicas, puede ser considerado un importante mediador del proceso inflamatorio, regulando el tono vascular, inhibiendo la agregación y adhesión plaquetaria, o mediando los efectos de aminoácidos excitatorios intracelularmente^{6,50}.

En varios modelos experimentales y en muestras humanas de enfermedad periodontal ha sido encontrada una alta producción local de NO^{13,14,34,43,44}. Estudios experimentales mostraron que el óxido nítrico proveniente de la iNOS induce pérdida ósea por medio de diferenciación osteoclástica durante el desarrollo óseo y, también después de la infección bacteriana en periodontitis inducida por *Porphyromonas gingivalis* en ratones^{51,52}. Otros autores también relacionan la presencia del NO con el aumento de la reabsorción ósea alveolar^{7,14,34,53}.

Autores sugieren que el aumento en la producción de NO observado en el tejido gingival de humanos estaría relacionado a la elevación en las concentraciones de los aminoácidos L-arginina y L-citrulina, paralelo a un aumento de prostaciclina⁵⁴. Además, Hesse et al.⁵⁵ considera otras vías metabólicas en las cuales la L-arginina y la L-citrulina estarían envueltas, como la vía del ciclo de la urea, en la cual la expresión de la enzima arginasa se encuentra aumentada en procesos inflamatorios. Otros autores también verificaron que el aumento de NO en la periodontitis ocasiona una elevación en la concentración de iNOS en sitios con la enfermedad^{44,56-58}). Hirose et al.¹⁴ evaluaron la expresión de la isoforma iNOS por medio de RT-PCR, en muestras de tejido gingival de pacientes con periodontitis y sanos y, observaron que los niveles de iNOS estaban aumentados en muestras de tejido gingival inflamado. De esa forma, se sugiere que la iNOS puede estar envuelta en el proceso de inflamación periodontal. Por otro lado, autores como Skaleric et al. (8) no encontraron expresión de iNOS en tejido gingival no inflamado, de pacientes sanos o diabéticos.

Además, niveles aumentados de NO también fueron verificados en la saliva de pacientes con periodontitis crónica severa, en comparación a los pacientes con periodontitis moderada o no portadores de enfermedad periodontal⁵⁹. Por el contrario, Auer et al.⁴² relataron que las concentraciones de NO en la saliva de pacientes con periodontitis crónica o agresiva fueron menores en comparación a los individuos sanos.

3. Inhibidores de NOS en la enfermedad periodontal

Todas las isoformas de NOS pueden ser inhibidas por análogos de la arginina N-sustituídos, como la NG-monometil-L-arginina (L-NMMA), N-imino-etil-L-ornitina (L-NIO), NG-amino-L-arginina (L-NAA), NG-nitro-L-arginina (L-NA) y el metil-éster correspondiente, y el NG-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME). Estos análogos compiten con la L-arginina y reaccionan como inhibidores estereoespecíficos de la NOS^{21,60}. Además de estos inhibidores, la aminoguanidina es también capaz de inhibir la NOS y presenta una relativa selectividad para iNOS¹⁵. Otros inhibidores considerados selectivos para nNOS e iNOS son denominados análogos de 7-nitroindazol y mercaptoetilguanidina, respectivamente^{34,61}.

El uso de inhibidores de la NOS han mostrado un efecto benéfico en varias patologías. En la artritis experimentalmente inducida en animales, ocurre una atenuación de los signos clínicos e histológicos de la enfermedad⁶². En la glomerulonefritis, hay una disminución de la deposición de complejos inmunes en los riñones, llevando a una considerable mejoría clínica⁶². En la diabetes dependiente tipo 1, inducida inmunológicamente, estudios demostraron que la destrucción de las

células β pancreáticas es mediada por el NO y las primeras tentativas de inhibir la iNOS fueron animadoras³³. En el trasplante renal, fue obtenida una mejoría substancial de los signos clínicos de rechazo después de la inhibición selectiva de la iNOS⁶³. En el choque séptico, la inhibición de la iNOS también fue benéfica¹⁵.

En relación al uso de inhibidores de NOS en la enfermedad periodontal, la literatura es escasa, por otro lado, la inhibición de la NOS ha sido estudiada para reducir la reabsorción ósea en animales y para controlar el proceso inflamatorio^{16,17}. Los resultados encontrados demostraron una disminución de los niveles de pérdida ósea en animales con periodontitis inducida,^{7,34}. Esos relatos sugieren que los inhibidores específicos de la NOS pueden ser utilizados como tratamiento y/o prevención de enfermedades sistémicas⁶⁴, además de participar como agentes terapéuticos en la inflamación periodontal, reduciendo la pérdida ósea alveolar⁷. Frente a tales consideraciones, otros estudios experimentales y ensayos clínicos son necesarios para evidenciar claramente los beneficios y posibles efectos colaterales del uso de inhibidores selectivos de la NOS en la enfermedad periodontal.

CONCLUSIÓN

Conociendo la enfermedad periodontal como una enfermedad multifactorial y de carácter inflamatorio, se puede concluir que el NO está relacionado al mecanismo inmunológico de la respuesta del huésped, pudiendo participar directamente en el proceso de reabsorción ósea alveolar. Resultados alentadores con la utilización de inhibidores de la NOS vienen siendo estudiados, a fin de contribuir futuramente como agentes terapéuticos de varias enfermedades inflamatorias, inclusive para las patologías periodontales.

REFERENCIAS

1. Kaplan SS, Billiar T, Curran RD, Zdziarski UE, Simmons RL, Basford RE. Inhibition of chemotaxis Ng-monomethyl-L-arginine: a role for cyclic GMP. *Blood* 1989; 74 (6):1885-7.
2. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991; 88(11):4651-5.
3. Van Dervort AL, Yan L, Madara PJ, Cobb JP, Wesley RA, Corriveau CC, Tropea MM and Danner RL. Nitric oxide regulates endotoxin-induced TNF-alpha production by human neutrophils. *J Immunol*. 1994; 152 (8): 4102-9.
4. Kendall HK, Marshall RI, Bartold PM. Nitric oxide and tissue destruction. *Oral Dis*. 2001; 7 (1): 2-10.
5. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*. 1993; 329 (27): 2002-12.
6. Van't Hof RJ, Ralston SH. Nitric oxide and bone. *Immunology* 2001; 103 (3): 255-61.
7. Leitão RF, Ribeiro RA, Chaves HV, Rocha FAC, Lima V, Brito GAC. Nitric oxide synthase inhibition prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* 2005; 76 (6): 956-63.
8. Skaleric U, Gaspirc B, McCartney-Francis N, Masera A, Wahl SM. Proinflammatory and antimicrobial nitric oxide in gingival fluid of diabetic patients with periodontal disease. *Infect*

- Immun. 2006; 74 (12): 7010-13.
9. Helfrich MH, Evans DE, Grabowski PS, Pollock JS, Ohshima H, Ralston SH. Expression of nitric oxide synthase isoforms in bone and bone cell cultures. *J Bone Miner Res.* 1997; 12 (7): 1108-15.
 10. Ung JY, Lin AC, Ramos LM, Faddis BT, Chole RA. Nitric oxide synthase mediates osteoclast activity in vitro and in vivo. *J Cell Biochem.* 2003; 89 (3): 613-21.
 11. Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988; 157 (1):87-94. Erratum in: *Biochem Biophys Res Commun* 1989 Jan 31; 158(2):624.
 12. Marletta MA, Yoon PS, Iyengar R, Leaf CD, Wishnok JS. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry.* 1988; 27 (24):8706-11.
 13. Kendall HK, Haase HR, Li H, Xiao Y, Bartold PM. Nitric oxide synthase type-II is synthesized by human gingival tissue and cultured human fibroblasts. *J Periodontol Res.* 2000; 35 (4):194-200.
 14. 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): 590-7.
 15. Szabó C. Alterations in the production of nitric oxide in various forms of circulatory shock. *New Horiz.* 1995; 3 (1): 2-32.
 16. Broulík PD, Haluzík M, Skrha J. The influence of nitric oxide synthase inhibitor L-NAME on bones of male rats with streptozotocin-induced diabetes. *Physiol Res.* 2003; 52(6):729-34.
 17. 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- κ B ligand and osteoprotegerin expression in bone marrow stromal cells. *Endocrinology.* 2004; 145(2): 751-9.
 18. Morris SM, Billiar TR. New insights into regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am J Physiol.* 1994; 266 (6 Pt 1): E829-39.
 19. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol.* 1996; 271(5 Pt 1):C1424-37.
 20. Marletta MA. Nitric oxide synthase: structure and mechanism. *J Biol Chem.* 1993; 268(17): 12231-4.
 21. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991; 43 (2): 109-42.
 22. Marletta MA. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell.* 1994; 78 (6): 927-30.
 23. Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989; 86 (22): 9030-3.
 24. Knowles RG, Palacios M, Palmer RM, Moncada S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate

- cyclase. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989; 86 (13): 5159-62.
25. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. An L-arginine/ nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990; 87 (13): 5193-7.
 26. Wennmalm A. Endothelial nitric oxide and cardiovascular disease. J Int Med. 1994; 235 (4): 317-27.
 27. Nava E, Luscher TF. Endothelium-derived vasoactive factors in hypertension: nitric oxide and endothelin. J Hypert. 1995; 13 (suppl 2): S39-48.
 28. Vasta V, Meacci E, Farnararo M, Bruni P. Identification of a specific transport system for L-arginine in human platelets. Biochem Biophys Res Commun. 1995 Jan 26; 206(3):878-84.
 29. Gewaltig MT, Kojda G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanism and therapeutic potential. Cardiovasc Res. 2002; 55 (2): 250- 60.
 30. Scott-Burden T, Vanhoutte PM. The endothelium as a regulator of vascular smooth muscle proliferation. Circulation. 1993; 87 (suppl.5): 51-5.
 31. Wolin MS. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000; 20 (6):1430-42.
 32. Dusting GJ, Macdonald PS. Endogenous nitric oxide in cardiovascular disease and transplantation. Ann Med. 1995; 27 (3):395-406.
 33. Kröncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide: Cytotoxicity versus cytoprotection. - How, why, when and where? Nitric Oxide. 1997; 1(2):107-20.
 34. Lohinai Z, Szabo C. Role of nitric oxide in physiology and pathophysiology of periodontal tissues. Med Sc Monit 1998; 4 (6): 1089-1095.
 35. Hamid Q, Springall DR, Riveros-Moreno V, Chanez P, Howarth P, Redington A, Bousquet J, Godard P, Holgate S, Polak JM. Induction of nitric oxide synthase in asthma. Lancet. 1993; 342 (8886-8887): 1510-3.
 36. Sakurai H, Kohsaka H, Liu MF, Higashiyama H, Hirata Y, Kanno K, Saito I, Miyasaka N. Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in inflammatory arthritides. J Clin Invest. 1995; 96 (5): 2357-63.
 37. Battered LD, Springall DR, Chester AH, Evans TJ, Standfield EN, Parums DV, Yacoub MH, Polak JM. Inducible nitric oxide synthase is present within human atherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxynitrite. Lab Invest. 1996; 75(1): 77-85.
 38. Nicholson S, Bonecini-Almeida Mda G, Lapa e Silva JR, Nathan C, Xie QW, Mumford R, Weidner JR, Calaycay J, Geng J, Boechat N, Linhares C, Rom W, Ho JL. Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. J Exp Med. 1996; 183 (5): 2293-302.
 39. Bagasra O, Michaels FH, Zheng YM, Bobroski LE, Spitsin SV, Fu ZF, Tawadros R, Koprowski H. Activation of inducible form of inducible nitric oxide synthase in the brains of patients with

- multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92 (26): 12041-5.
40. Vodovotz Y, Lucia MS, Flanders KC, Chesler L, Xie QW, Smith TW, Weidner J, Mumford R, Webber R, Nathan C, Roberts AB, Lippa CF, Sporn MB. Inducible nitric oxide synthase in tangle-bearing neurons of patients with Alzheimer's disease. *J Exp Med*. 1996; 184 (4): 1425-33.
 41. Mannick EE, Bravo LE, Zarama G, Realpe JL, Zhang XJ, Ruiz B, Fontham ET, Mera R, Miller MJ, Correa P. Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine and apoptosis in *Helicobacter pylori* gastritis effects of antibiotics. *Cancer Res*. 1996; 56 (14): 3238-43.
 42. Auer A, Aleksic J, Ivić-Kardum M, Aurer J, Culo F. Nitric oxide synthesis is decreased in periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2001; 28 (6): 565-8.
 43. Allaker RP, Silva Mendez LS, Hardie JM, Benjamin N. Antimicrobial effect of acidified nitrite on periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol*. 2001; 16 (4): 253-6.
 44. Offenbacher S. Periodontal diseases: pathogenesis. *Ann Periodontol*. 1996; 1 (1): 821-78.
 45. Loe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol*. 1965; 36 (1): 177-87.
 46. Nagata T. Diabetes and bone health. Relation between diabetes and periodontal disease. *Clin Calcium*. 2009; 19 (9): 1291-8.
 47. Carranza FA, Newman MG. *Em: Periodontia Clínica*. 8. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997.
 48. Figueiredo CMS. Gengivite x Periodontitis: Onde estamos agora? Disponível em: www.odontologia.com.br; Acesso em 30 de maio de 2008.
 49. Lohinai Z, Stachlewitz R, Virág L, Székely AD, Haskó G, Szabó. Evidence for reactive nitrogen species formation in the gingivomucosal tissue. *J Dent Res*. 2001; Feb;80(2):470-5.
 50. Muscará MN, Wallace JL. Nitric Oxide. V. therapeutic potential of nitric oxide donors and inhibitors. *Am J Physiol*. 1999; 276 (6 Pt 1):G1313-6.
 51. Gyurko R, Shoji H, Battaglino RA, Boustany G, Gibson FC 3rd, Genco CA, Stashenko P, Van Dyke TE. Inducible nitric oxide synthase mediates bone development and *P. gingivalis* induce alveolar bone loss. *Bone* 2005; 36 (3): 472-9.
 52. Fukada SY, Silva TA, Saconato IF, Garlet GP, Ávila-Campos MJ, Silva JS, Cunha FQ. iNOS-derived nitric oxide modulates infection-stimulated bone loss. *J Dent Res*. 2008; 87 (12): 1155-9.
 53. Chae BS, Ahn YK, Kim JH. Effects of swainsonine on the humoral immune response of lipopolysaccharide. *Arch Pharm Res*. 1997; 20 (6): 545-9.
 54. Matejka M, Partyka L, Ulm C, Solar P, Sinzinger H. Nitric oxide is increased in periodontal disease. *J Periodontal Res*. 1998; 33 (8): 517-8.
 55. Hesse M, Modolell M, La Flamme AC, Schito M, Fuentes JM, Cheever AW, Pearce EJ, Wynn TA. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *J Immunol*. 2001;

167 (11): 6533-44.

56. Rausch-Fan X, Y Matejka M. From plaque formation to periodontal disease, is there a role for nitric oxide? *Eur J Clin Invest.* 2001; 31 (10): 833-5.
57. Carossa S, Pera P, Doglio P, Lombardo S, Colagrande P, Brussino L, Rolla G, Bucca C. Oral nitric oxide during plaque deposition. *Eur J Clin Invest.* 2001; 31 (10): 876-9.
58. Güllü C, Ozmeric N, 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 Periodontal Res.* 2005; 40 (2): 168-75.
59. Reher VG, Zenóbio EG, Costa FO, Reher P, Soares RV. Nitric oxide levels in saliva increase with severity of chronic periodontitis. *J Oral Sci.* 2007; 49 (4): 271-6.
60. Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vivo and in vitro. *Br J Pharmacol.* 1990; 101 (3): 746-52.
61. Southan GJ, Szabó C. Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. *Biochem Pharmacol.* 1996; 51 (4): 383-94.
62. Moilanen E, Vapaatalo H. Nitric oxide in inflammation and immune response *Ann Med.* 1995; 27 (3): 359-67.
63. Albrecht EW, van Goor H, Tiebosch AT, Moshage H, Tegzess AM, Stegeman CA. Nitric Oxide production and nitric oxide synthase expression in acute human renal allograft rejection. *Transplantation* 2000; 70 (11): 1610-6.
64. Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1990; 87 (2): 682-5.