



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**DETERMINACIÓN DE NIVELES DE ESTRÉS OXIDANTE POR
NICOTINA EN ENCÍA DE RATA**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

C.D. YADIRA ROMERO SERRANO

TUTOR

DRA. DIANA BARRERA OVIEDO

FACULTAD DE MEDICINA

MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE 2013.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| RESUMEN | 1 |
| I. INTRODUCCIÓN | 2 |
| II. MARCO TEÓRICO | 4 |
| 1. Radicals libres | 4 |
| 1.1 Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno | 5 |
| 1.2 Fuentes de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno | 6 |
| 1.3 Anión superóxido | 7 |
| 1.4 Radical hidroxilo | 8 |
| 1.5 Peróxido de hidrógeno | 9 |
| 2 Estrés oxidante | 10 |
| 2.1 Daño por estrés oxidante | 11 |
| 2.2 Daño a lípidos | 11 |
| 2.3 Daño a proteínas | 12 |
| 2.4 Daño al DNA | 13 |
| 3 Antioxidantes | 14 |
| 3.1 Enzimas antioxidantes | 15 |
| 3.1.1 Superóxido dismutasa | 15 |
| 3.1.2 Catalasa | 16 |
| 3.1.3 Glutation peroxidasa | 17 |
| 4 Enzimas pro-oxidantes | 19 |
| 4.1 NADPH oxidasa | 20 |
| 4.2 Xantina oxidasa | 21 |
| 5. Humo de cigarro como fuente de ERO | 23 |
| 6 Nicotina | 25 |

| | | |
|--------|---|----|
| 7 | Encía | 26 |
| 7.1 | Tejido Epitelial | 28 |
| 7.2 | Epitelio escamoso estratificado queratinizado | 28 |
| 7.3 | Población intrínseca | 28 |
| 7.4 | Poblacion extrínseca permanente | 29 |
| 7.5 | Población extrínseca transitoria | 29 |
| 7.6 | Tejido conjuntivo gingival | 30 |
| 7.7 | Fibras gingivales | 30 |
| 7.8 | Enfermedades de la encía | 31 |
| 7.9 | Gingivitis | 31 |
| III. | Planteamiento del problema | 34 |
| IV. | Hipótesis | 33 |
| V. | Objetivo | 33 |
| VI. | Objetivos Particulares | 33 |
| VII. | Justificación | 35 |
| VIII. | Material y Métodos | 35 |
| 1. | Reactivos | 35 |
| 2. | Animales | 35 |
| 3. | Diseño experimental | 35 |
| 3.1 | Homogenado | 36 |
| 3.1.1 | Cuantificación de proteínas | 36 |
| 3.1.2 | Determinación de anión superóxido | 37 |
| 3.1.3. | Determinación de peróxido de hidrógeno | 37 |
| 3.1.4. | Determinación de radical hidroxilo | 38 |

| | |
|---|----|
| 3.1.5. Actividad de superóxido dismutasa | 38 |
| 3.1.6. Actividad de catalasa | 39 |
| 3.1.7. Actividad de glutatión peroxidasa | 39 |
| 3.1.8. Actividad de xantina oxidasa | 39 |
| 3.1.9. Actividad de NADPH oxidasa | 40 |
| 3.1.2. Lípidos oxidados | 40 |
| 3.1.3 Proteínas oxidadas | 41 |
| 4. Cortes histológicos | 41 |
| 4.1. Tinción H&E | 42 |
| 4.2. Inmunohistoquímica | 42 |
| 5. Análisis estadístico | 42 |
| IX. Resultados | 43 |
| 1. Determinación de ensayo de estudio | 43 |
| 2. Especies reactivas de oxígeno | 43 |
| 3. Actividad de enzimas antioxidantes | 46 |
| 4. Actividad de enzimas pro-oxidantes | 48 |
| 5. Tinción de hematoxilina y eosina H&E | 49 |
| 6. Inmunohistoquímica | 50 |
| 7. Marcadores de daño por estrés oxidante | 54 |
| X Discusión | 56 |
| XI Conclusiones | 60 |
| XII Bibliografía | 61 |

RESUMEN

Las enfermedades del periodonto como la gingivitis y la periodontitis, están asociadas a múltiples factores externos así como propios del organismo. Uno de los factores externos que está fuertemente ligado como factor de riesgo es el cigarro, ya que induce estrés oxidante en el cuerpo (aumento de las especies reactivas de oxígeno y/o disminución del sistema antioxidante por ejemplo la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT)). En la presente investigación se busca conocer la participación del estrés oxidante en el daño ocasionado por la nicotina en la encía de un modelo murino.

La nicotina es uno de los principales componentes del cigarro, es el componente más tóxico y de mayor presencia; y el único que causa dependencia.

En este trabajo se utilizó la encía de ratas macho Wistar. El modelo se estableció a través de una curva dosis respuesta utilizando diferentes concentraciones de nicotina, (50 mM a 0.000005mM) y por lapsos de tiempo de 2 y 3 horas. Se seleccionaron las concentraciones de 0.5mM y 0.05mM y un tiempo de 3 horas para evaluar el estrés oxidante. Además se incluyó un grupo donde se ha observado estrés oxidante previamente (dicromato de potasio 100 μ M).

Se determinaron marcadores de estrés oxidante. Se midió las ERO, el contenido de carbonilos en proteínas (proteínas oxidadas), el contenido de malondialdehído (lípidos oxidados) en homogenados de encía de rata.

Se evaluó el sistema pro-oxidante y antioxidante enzimático. Se determinó la actividad de enzimas pro-oxidantes (NADPH oxidasa y XO) y antioxidantes (SOD, CAT, GPx) en homogenados.

Se encontró que después de 3h de exposición a la nicotina, el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el hidroxilo aumentaron hasta 10 veces su producción. Las enzimas antioxidantes SOD y GPx son inhibidas en la encía de rata; y la catalasa es inducida. Las enzimas pro-oxidantes XO y NADPH oxidasa, son inducidas. El daño provocado por el desbalance redox es evidente al aumentar la lipoperoxidación y la oxidación de proteínas y es dependiente de la concentración de nicotina.

I. INTRODUCCIÓN

El humo de cigarro es una compleja mezcla de más de 4700 compuestos químicos incluyendo radicales libres y la nicotina; esta última el mayor componente del tabaco y es sabido que promueve el desarrollo de gingivitis y periodontitis, (Kang et al., 2011) Bergstrom y Floderus Myrthed, observaron que el humo y los componentes del tabaco pueden reducir el flujo sanguíneo gingival y el sangrado gingival (Bergstrom y Floderus Myrthed 1983); también se ha observado que la encía de los fumadores contiene un mayor número de células queratinizadas (Calonius 1962); así el tabaco y sus componentes tóxicos parecen producir una vasoconstricción prolongada del aporte vascular gingival (Clarke et al., 1981); este efecto parece ser un efecto directo de la nicotina; y a su vez esto tiende a reducir los signos clínicos de la gingivitis. (Bergstrom, 1990).

S.W, Kang refiere que la nicotina induce estrés oxidante intracelular, reconocido como un importante agente en el daño de moléculas biológicas (Kang et al., 2011). Lahmouzi, en su estudio *in vitro* con fibroblastos de encía de rata tratados con nicotina a 3 y 5 mM, observó que el crecimiento se reducía significativamente; además el análisis ultraestructural mostro indicios de necrosis, y un aumento en la apoptosis celular (Lahmouzi et al., 2000). En estudios relacionados con fibroblastos de encía humana expuestos a nicotina se reduce la viabilidad celular por tiempo y dosis dependiente; y aumenta la generación de ERO, además de evidenciar cambios morfológicos y aumento en la apoptosis celular (Kang et al., 2011); De acuerdo a (Chung, 2006) los niveles sistémicos y locales de MDA son aumentados por fumar; además de que los niveles locales de SOD, GSH y CAT pueden incrementar por el consumo de cigarro (Chung, 2006); Grang, ha reportado que los niveles de peróxidos lipídicos son elevados en tejido de personas fumadoras así como en su sangre y la catalasa muestra la misma tendencia (Grang et al., 2006). Souto reporto que fumar afecta la distribución cuantitativa de las células de Langerhans y las células dendríticas, además se han asociado los niveles de 8-hidroxi-2desoxiguanosina (8-OHdG) como mediador de daño oxidante en la sangre de la encía con la periodontitis (Souto et al., 2011). Konopka reporta que cuando las células del epitelio gingival se expusieron al

humo del cigarro, se observa una inhibición significativa del crecimiento celular y este fenómeno está mediado por muerte celular programada, apoptosis (Konopka et al., 2006). El humo del cigarro también inhibe la migración de las células epiteliales. (Semlali et al., 2011). El agotamiento de GSH podría ser un mecanismo de citotoxicidad inducida por el humo del cigarrillo; y podría correlacionarse con la reducida actividad reparadora y regenerativa de los tejidos gingivales y periodontales previamente reportados en los fumadores (Graziano et al., 2012).

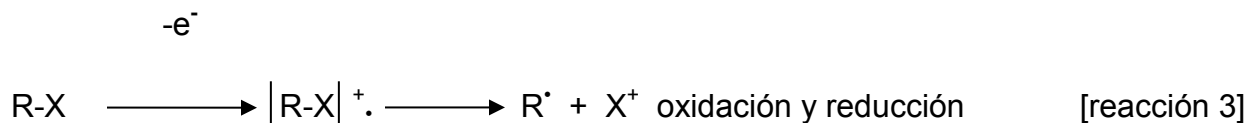
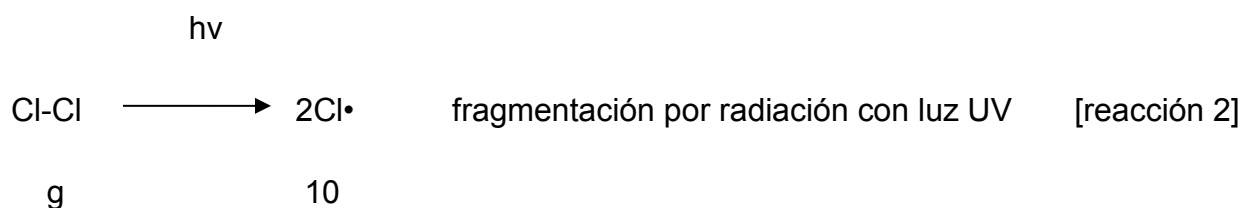
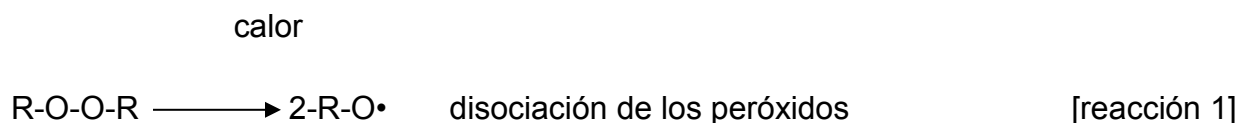
Por otro lado, estudios realizados por Gomes mostraron que las ratas con enfermedad periodontal inducida denotaron estadísticamente mayores niveles de mieloperoxidación en comparación con el grupo control de ratas (Gomes et al., 2009). Esto confirma la hipótesis de que la mieloperoxidasa puede servir como un marcador inflamatorio de enfermedades periodontales. Sin embargo; Milanezi de Almeida refiere que hay poca información de los estudios *in vivo* sobre fumar y/o la nicotina que afecten los tejidos gingivales en ausencia de placa. De acuerdo a sus estudios la nicotina administrada sistémicamente no afecta, *in vivo*, en el número y proliferación de fibroblastos del tejido gingival de ratas (Milanezi de Almeida et al., 2011).

II. MARCO TEÓRICO

1. RADICALES LIBRES

Un radical libre es un átomo o un grupo de átomos que contiene un electrón desapareado dentro de su configuración electrónica; es decir, la existencia de un electrón que no tiene una pareja con spin opuesto dentro de un átomo o un grupo de átomos; o cualquier especie capaz de existir independientemente y que contiene uno o más electrones desapareados.

Un radical libre se forma cuando un enlace se fragmenta homolíticamente, para lo cual se debe suministrar la suficiente energía para disociar el enlace. Existen cuatro maneras de suministrar dicha energía: térmica (reacción 1), fotoquímica (reacción 2), radioquímica y por una reacción de óxido reducción (reacción 3) (Murrant y Reid, 2001).



La generación de radicales ocurre bajo condiciones fisiológicas, y es normalmente balanceado por el sistema de defensa antioxidante de la célula; los beneficios de los radicales libres ocurren a concentraciones bajas y moderadas como por ejemplo en defensa contra agentes infecciosos, en señalización celular, un ejemplo más claro es en la inducción de respuesta mitogénica (Valko et al., 2007).

1.1 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y DE NITRÓGENO

Se puede dividir en dos grupos; los radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno. Los radicales derivados del oxígeno representan la clase más importante de especies reactivas generadas en sistemas vivos (Miller y Aust, 1990). Se consideran especies reactivas de oxígeno (ERO) al oxígeno atómico (O) y al ozono (O₃) que se genera con la unión de O al O₂ al oxígeno singulete (¹O₂), que se produce con la excitación de uno de los electrones desapareados del O₂ y al superóxido (O₂^{-•}), al peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y al radical hidroxilo (•OH), que son especies parcialmente reducidas. También el oxígeno forma compuestos con el nitrógeno y estos pueden ser más reactivos que el O₂ en su estado basal de energía, estas especies son el monóxido de nitrógeno u óxido de nítrico (NO•), el dióxido de nitrógeno (NO₂•) y el peroxinitrito (ONOO⁻), y se reconocen como especies reactivas de nitrógeno (ERN) (Halliwell y Gutteridge, 1999) (Tabla 1).

Tabla 1. Especies Reactivas de Oxígeno y Nitrógeno

ERO

| RADICALES | NO RADICALES |
|--|--|
| Superoxido (O₂^{-•}) | Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) |
| Hidroxilo (OH•) | Ácido hipocloroso (HOCl) |
| Peroxilo (RO₂•) | Singulete de oxígeno (¹ O ₂) |
| Alcoxilo (RO•) | Peroxinitrito (ONOO ⁻) |
| Hidroperoxilo (HO₂•) | Ozono (O ₃) |

ERN

| RADICALES | NO RADICALES |
|--|--|
| Óxido Nítrico (NO•) | Ácido nitroso (HNO ₂) |
| Dióxido de nitrógeno (NO ₂ •) | Catión nitrosilo (NO ⁺) |
| | Tetraóxido de dinitrógeno (N ₂ O ₄) |
| | Trióxido de dinitrógeno (N ₂ O ₃) |
| | Peroxinitrito (ONOOO ⁻) |
| | Catión nitronio, (NO ₂ ⁺) |
| | Cloruro de nitrilo (NO ₂ Cl) |
| | Anión nitroxilo (NO ⁻) |
| | Alquil peroxinitritos (ROONO ⁻) |

1.2. FUENTES DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y NITRIGENO

La mitocondria es uno de los sitios propuestos como principales generadores de especies reactivas de oxígeno. Esto obedece a que el oxígeno que se respira gracias al intercambio de gases en los pulmones, y que es transportado por la hemoglobina de la sangre hasta llegar a las células, se utiliza como aceptor final en la respiración mitocondrial. Es decir la función del oxígeno es la de recibir los electrones provenientes de la cadena respiratoria, y junto con protones de la matriz mitocondrial, forman agua metabólica como un subproducto de la oxidación de la glucosa (Vizi V, 2005; Chen et al., 2003).

La producción de anión superóxido ocurre principalmente en la mitocondria (Cadenas y Sies, 1998). La cadena de transporte de electrones en la mitocondria es la principal fuentes de ATP en células eucariontes. Se estima que alrededor de 1-3% de electrones escapan de la cadena respiratoria para generar superóxido. El superóxido es producido por los complejos I y III de la cadena respiratoria y una de estas formas aniónicas está tan fuertemente cargada que es capaz de cruzar la membrana interna de la

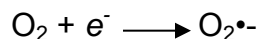
mitocondria, (Muller y Van Remmen, 2004). La velocidad de producción de $O_2\bullet$ de la mitocondria se estimado aproximadamente en 1.2 nmol/min/mg (Boveris et al., 1972). La xantina oxidasa también se ha identificado como una fuente potencial de ERO en el citosol de fibras musculares. En la conversión enzimática de hipoxantina a xantina, el $O_2\bullet$ aparece como un derivado (Apple et al., 1991; Laughlin et al., 1990; Mac Cutchan et al., 1990). Fuentes enzimáticas adicionales de ERO pueden incluir a las NADPH-oxidasa (Duncan y Rudge, 1998; Dinger et al., 2007) monoaminooxisada (MAO), óxido nítrico sintasa (NOS) (Sas et al., 2007), oxidasa sarcoplasmicas (Crane et al., 1985; Freeman y Crapo, 1982), y enzimas del metabolismo del ácido araquidónico incluyendo la ciclooxigenasa (Okabe et al., 1985), lipoxigenasa y citocromo P450 (Freeman y Crapo, 1982), así como otras enzimas de membrana plasmática (Crane et al., 1985).

Las células que liberan ERO Y ERN en el espacio extracelular incluyen células endoteliales (Marin y Rodríguez-Martínez, 1995; Mitchell, 1996; Panus et al., 1993), células vasculares de músculo liso, (Charpie y Webb, 1993; Mohazzab-H y Wolin, 1994) neuronas motoras (Riberia et al., 1998), leucocitos, (Suzuki et al., 1996) y eritrocitos (Stamler et at., 1997). Dependiendo de la carga y la reactividad, las ERO y ERN liberadas al espacio extracelular por dichas células pueden difundir al citosol.

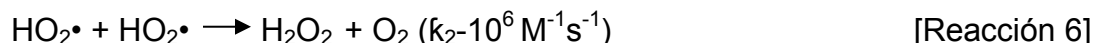
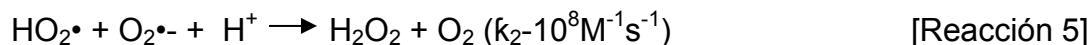
1.3 ANIÓN SUPERÓXIDO

El anión superóxido ($O_2\bullet^-$) es el radical más importante producido por la ganancia de un electrón en los sistemas biológicos (reacción 4). Esta ERO puede actuar como un agente reductor y oxidante. La difusión de $O_2\bullet$ a través de las membranas puede restringirse debido a la carga y reactividad (Freeman y Crapo, 1982; Halliwell y Guttereridge, 1986; Rosen y Freeman, 1984).

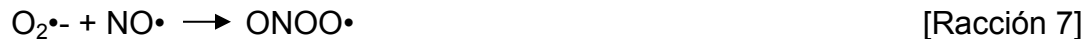
El anión superóxido reacciona con algunas moléculas y genera nuevos radicales, pero también puede reaccionar consigo mismo de tal forma que un $O_2\bullet^-$ se oxida a O_2 y el otro se reduce a H_2O_2 . Esto constituye la reacción de dismutación espontánea (Freeman y Crapo, 1982; Murrant y Reid, 2001). La reacción de dismutación espontanea puede ocurrir de dos formas (reacciones 5 y 6).



[Reacción 4]



Además de la dismutación, el grupo de enzimas, superóxido dismutasas (SODs) elimina específicamente al $\text{O}_2\bullet^-$. El $\text{O}_2\bullet^-$ es tóxico para célula en parte porque a partir de él se puede originar el $^1\text{O}_2$ y el $\bullet\text{OH}$, el $\text{O}_2\bullet^-$ en su forma protonada $\text{HO}_2\bullet$ puede reaccionar con otros radicales libres como por ejemplo con el óxido nítrico $\text{NO}\bullet$ para formar peroxinitrito (reacción 7) (Halliwell y Gutteridge, 1992; Murrant y Reid, 2001; Sas et al., 2007).



La eliminación del $\text{O}_2\bullet^-$ es a través de las enzimas SOD; la actividad de esta enzima es muy eficiente ($10^9 \text{M}^{-1}\text{seg}^{-1}$) e independiente de pH. (Finney y O'Halloran 2003).

1.4 RADICAL HIDROXILO

El Radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), es la forma neutral de él ion hidróxido, posee una alta reactividad, haciéndolo un radical muy peligroso con una vida media corta *in vivo* de aproximadamente 10^{-9}s . Es producido cuando el agua es expuesta a radiación ionizante (Stadtman, 1986)

Tanto el $\text{O}_2\bullet^-$ como el H_2O_2 son ERO que interaccionan poco con los demás compuestos celulares, sin embargo, ambos son tóxicos, en parte porque generan singulete de oxígeno y $\bullet\text{OH}$; así cuando el $\bullet\text{OH}$ es producido *in vivo* reacciona cerca del sitio de su formación. El $\bullet\text{OH}$ es un poderoso agente oxidante que puede reaccionar con una gran variedad de moléculas orgánicas e inorgánicas (Kohen y Nyska, 2002).

El estado redox de la célula está fuertemente vinculado a una pareja redox el Hierro y el cobre, y se mantiene dentro de los estrictos límites fisiológicos; ha sido sugerido que la regulación del hierro asegura que no haya hierro libre intracelular; sin embargo *in vivo*

bajo condiciones de estrés un exceso de superóxido libera hierro, "hierro libre" a partir de moléculas que lo contienen; la liberación de hierro por $O_2^{\bullet-}$ ha sido demostrada para clusters [4Fe-4S] contenidos en enzimas de la familia de la deshidrogenasa-liasa (Halliwell, 1981_a; Gonzalez et al., 2007).

La liberación de Fe^{+2} puede participar en la reacción de Fenton (reacción 9) generando alta reactividad del radical hidroxilo (Valko et al., 2005; Loenard et al., 2004). La forma más realista en la producción de radical hidroxilo de acuerdo con la reacción de Fenton se produce cuando el metal es el hierro, el cobre, el cromo, o el cobalto (Rae et al., 1999)



En las moléculas orgánicas en la célula el $\bullet OH$ reacciona con el DNA, proteínas, aminoácidos, azúcares y metales. Las tres reacciones principales del radical hidroxilo incluyen abstracción de hidrógeno, adición y electrotransferencia.

1.5 PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se forma cuando cada uno de los electrones libres del O_2 se ha apareado con un electrón de giro contrario. El H_2O_2 no es un radical en si debido a que tiene todos sus electrones apareados. Es un agente oxidante y reductor débil, por lo tanto poco reactivo; sin embargo puede difundir a través de las membranas (Nath y Norby, 2000). Bajo condiciones fisiológica se sabe que los peroxisomas producen H_2O_2 (Valko et al., 2004).

Los peroxisomas son el sitio de mayor consumo de oxígeno en la célula, este consumo de oxígeno en los peroxisomas es el que permite la producción de H_2O_2 que posteriormente es usado para oxidar una variedad de moléculas; el organelo también contiene catalasa que descompone el H_2O_2 y presumiblemente previniendo su acumulación (DeCoursey y Ligeti, 2005).

La velocidad de producción de H_2O_2 es relativamente alta en todas las células representando alrededor de 1-3% del consumo total de O_2 , principalmente como ERO secundaria debido a la dismutación de $O_2^{\bullet-}$ (Halliwell y Gutteridge, 1999).

Sus efectos químicos deletéreos se pueden dividir en 2 categorías; actividad directa originada por sus propiedades oxidantes, la cual incluye degradación de hemoproteínas, liberación de metales, inactivación de enzimas oxidación de lípidos; y en actividad indirecta en la cual el H_2O_2 sirve como fuente de más especies deletéreas; así como el $\bullet OH$ o $HClO$ (Halliwell, 2000).

Se han caracterizado varias maneras para eliminar el H_2O_2 . La catalasa no-muonofuncionales dismutan el H_2O_2 en O_2 y H_2O y lo hacen con una gran eficiencia. Las hemoperoxidasa reducen el H_2O_2 en H_2O ; las peroxi-reductasas deshacen el H_2O_2 y otros peróxidos a través de un sistema de óxido reducción de grupos tioles y lo mismo hacen las glutatión peroxidasa.

La sobreproducción de especies reactivas ocasiona el establecimiento del estrés oxidante.

2. ESTRÉS OXIDANTE

El estrés oxidante se define como el resultado de un desequilibrio entre factores oxidantes y los sistemas antioxidantes, ya que puede ocurrir debido a un exceso de radicales libres o por la disminución de los sistemas antioxidantes. En la presencia de un agente oxidante menor este puede ser adaptado con la estimulación del sistema antioxidante y con la parcial o total compensación de la sobrecarga oxidante (Vadea et al., 2010).

El estrés oxidante lleva a lesiones bioquímicas y fisiológicas las cuales pueden deteriorar el metabolismo, causando daño oxidante a lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, lo que eventualmente resulta en muerte celular (Heinonen et al., 1998; Rice-Evans y Millar, 1996; Satue-Garcia et al., 1997; Chance et al., 1979; Fridovich, 1975, 1978; Halliwell 1978^a, 1981^a; Tang et al., 2004).

El daño por estrés oxidante está asociado con el envejecimiento y numerosas enfermedades humanas (Finkel y Holbrook, 2000; Halliwell, 1991; Halliwell y Auroma 1992; Halliwell y Gutteridge, 1999; Maxwell, 1995; Mujahid et al., 2007). Por ejemplo: inflamación, cáncer, arteroesclerosis, diabetes mellitus (Ames, 1999, 2001; Barthomeur et al., 2001; Remacle y Renard 1996), enfermedad de parkinson, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrofica, enfermedad de Wilson, ataxia de Fredreich y esclerosis múltiple (Chaudhury y Saeker, 1983; Fang, 1989; Sas et al., 2007).

2.1 DAÑO POR ESTRÉS OXIDANTE

Un estímulo oxidante de baja intensidad hace que una célula pueda resistir luego condiciones más oxidantes. Sin embargo; el acumulativo y continuo estímulo de fuentes endógenas y exógenas de daño oxidante a los componentes celulares (Comporti, 1989) altera muchas funciones. Entre los componentes más vulnerables están: DNA, proteínas y a las membranas celulares (lípidos). Así, se puede detectar en individuos sanos bases nitrogenadas alteradas en el DNA, aminoácidos modificados en las proteínas y peroxidación de lípidos (Pleschke et al., 2000).

El radical hidroxilo se sabe reacciona con todos los componentes de la molécula de DNA, dañando las bases puricas y pirimidicas y también la cadena de principal de desoxirribosa (Halliwell y Gutteridge, 1999).

2.2 DAÑO A LÍPIDOS

Las membranas celulares contienen fosfolípidos que tienen ácidos grasos con varios enlaces dobles. Estos ácidos grasos poliinsaturados son más vulnerables a la oxidación que los saturados y los monoinsaturados porque los metilenos entre dos dobles enlaces pueden perder fácilmente un hidrógeno (hidrógeno alílico). Las especies de oxígeno reactivas que pueden sustraer estos hidrógenos son el HO• y el HO₂•- (Hansberg, 2002).

El daño a los lípidos es usualmente llamado lipoperoxidación y ocurre en tres etapas; en la primera etapa, la iniciación, involucra el ataque de ERO capaces de abstraer un átomo de hidrógeno de un grupo metileno en el lípido. La presencia de un doble enlace adyacente al grupo metileno, debilita la unión entre el átomo de carbono y el hidrógeno; así que puede ser fácilmente removido de la molécula (Kohen et al., 2002).

Después de la abstracción de hidrógeno, el radical de ácido graso restante conserva un electrón y se estabiliza por reordenación de la estructura molecular para formar un dieno conjugado (Halliwell y Gutteridge, 1999). Cuando el oxígeno está en suficiente concentración en los alrededores, el radical de ácido graso reacciona con él para formar ROO• durante la etapa de propagación. Estos radicales así mismos son capaces de abstraer otro átomo de hidrógeno de una molécula de ácido graso vecino, lo que conduce de nuevo a la producción de radicales de ácidos grasos que se someten a la misma reacciones de reordenamiento y la interacción con oxígeno. El ROO• se convierte en un hidroperóxido de lípido que puede descomponerse además a un aldehído o la forma cíclica endoperóxido, isoprotanos, e hidrocarburos. La etapa de propagación permite que la reacción continúe. Una sola iniciación puede dar lugar a una reacción en cadena que resulta en la peroxidación de los lípidos insaturados todo en la membrana (Meral et al., 2000). La última etapa, terminación de la cadena, se produce después de la interacción de un ROO• con otro radical o antioxidantes (Kohen et al., 2002).

2.3 DAÑO A PROTEÍNAS

Las proteínas, también los principales componentes de las membranas, pueden servir como posibles blancos de ataque por ERO. Entre los diversas ERO, el OH•, RO•, y las especies reactivas de nitrógeno reaccionan predominantemente y causan daño a las proteínas (Kohen et al., 2002). El HO• reacciona con cualquier aminoácido en el sitio donde se forma, que generalmente son sitios en donde se encuentra un metal de transición. El $^1\text{O}_2$ es más selectivo y reacciona particularmente con los aminoácidos triptofano, tirosina, histidina, lisina, metionina y cisteína (Lledías et al., 1998). El

peróxido de hidrógeno y los radicales superóxido en concentraciones fisiológicas ejercen efectos débiles en las proteínas (Hansberg, 1999).

Las proteínas pueden sufrir daños directos e indirectos seguido a la interacción con ERO, incluyendo la peroxidación, daño específico a residuos de aminoácidos, los cambios en su estructura terciaria, la degradación, y la fragmentación. Las consecuencias del daño a proteínas como mecanismo de respuesta al estrés son la pérdida de actividad enzimática, funciones celulares alteradas tales como la producción de energía, la interferencia con la creación de potenciales de membrana, y los cambios en el tipo y el nivel de las proteínas celulares (Dubois et al., 1998).

Los productos de oxidación de proteínas son por lo general aldehídos, compuestos ceto, y carbonilos. Uno de los principales productos de adición que pueden ser fácilmente detectados y por lo tanto, servir como un marcador de daño oxidante a proteínas es 3-nitrotirosina. Se produce este aducto después de la de la interacción entre ONOO• y otra ERN con el aminoácido tirosina (Davis, 1987). Después del ataque del radical OH•, una serie de compuestos se puede formar, incluyendo hidroxiprolina, glutamil semialdehído y otros (Halliwell y Gutteridge, 1999). Las proteínas modificadas son susceptibles a muchos cambios en su función; estos cambios incluyen la fragmentación química, inactivación, y el aumento de la degradación proteolítica (Stocker y Azzì, 2000).

2.4 DAÑO AL DNA

El daño al DNA ocurre, a una tasa baja pero continua, la pérdida de bases, la desaminación de la citosina en uracilo y de la 5–metilcitosina en timidina (Marnett y Plastaras, 2001). Aunque el DNA es una molécula estable, bien protegida, las ERO pueden interactuar con él y provocar diversos tipos de daño: modificaciones de bases, y ruptura de la doble cadena de ADN, pérdida de las purinas (sitios apurínicos), daño a la desoxirribosa, y daños en el sistema de reparación del ADN. No todas las especies reactivas de oxígeno pueden causar daños, la mayoría es atribuible a los radicales hidroxilo (Ames, 1999). En condiciones de oxidantes las proteínas que normalmente

están unidas al ADN pueden generar uniones covalentes con él, por ejemplo, una unión entre una tirosina y una timina. Así mismo, los lipoperóxidos pueden reaccionar con el ADN y modificarlo (Hansberg, 2002).

El ADN de las mitocondrias y del cloroplasto también se modifica. De hecho, el ADN mitocondrial de los animales generalmente presenta un mayor número de modificaciones que el ADN nuclear (Pleschke et al., 2000).

Los cambios en las bases nitrogenadas pueden generar mutaciones cuando se duplica el ADN. Por ejemplo, la 8-hidroxi guanina puede hacer puentes de hidrógeno con una adenina en vez de con una citosina y la 8-hidroxi adenina con una guanina en vez de con una timina (Marnett y Plataras, 2001).

El daño a lípidos, proteínas y ADN es evitado por la presencia de moléculas y enzimas especializadas, llamadas antioxidantes.

3. ANTIOXIDANTES

Un antioxidante es cualquier sustancia que retarde, prevenga o remueva el daño oxidante a una molécula blanco (Halliwell y Gutteridge, 2000).

Los mecanismos de defensa contra el estrés oxidante inducido por los radicales libres incluye: a) mecanismos de prevención b) mecanismos de reparación, c) defensas físicas, d) defensas antioxidantes. Las defensas antioxidantes enzimáticas incluyen la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), catalasa (CAT); y dentro de los antioxidantes no enzimáticos están representados por el ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), glutatión (GSH), carotenoides, flavonoides y otros antioxidantes (Masella et al., 2005).

Muchos de los efectos biológicos de los antioxidantes parecen estar relacionados con su capacidad no solo para eliminar los radicales libres, sino también en su capacidad para modular vías de señalización celular (Mates et al., 1999).

3.1 ENZIMAS ANTIOXIDANTES

3.1.1 SUPEROXIDO DISMUTASA

La familia de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalizan eficazmente la dismutación de $O_2^{\bullet-}$ ($10^9 M^{-1} s^{-1}$) e independiente del pH (reacción 13). En los mamíferos esta familia está formada por tres miembros, los cuales se ubican en lugares específicos, dos dentro de la célula y uno extracelular. La primera enzima es una SOD que tiene en su centro catalítico un cobre y un zinc (SOD1o Cu/Zn-SOD) y se ubica en el citoplasma, el núcleo y la membrana externa de la mitocondria. La segunda enzima está ubicada cerca de la membrana interna mitocondrial, es una SOD que une manganeso en su centro catalítico (SOD2 o MnSOD); y finalmente la SOD que se localiza fuera de la célula y está asociada a la matriz extracelular y al igual que la primera SOD tiene asociado un cobre y un zinc (SOD3 o EC-SOD) (Halliwell y Guteriedge, 1999).



Estas enzimas poseen diferentes características como estructura, masas moleculares, y las constantes de velocidad de reacción (Tabla 2), la propia enzima es capaz de mejorar la dismutación espontánea de los radicales superóxido a H_2O_2 . El producto final de la reacción de dismutación de H_2O_2 puede ser eliminado por la actividad de la enzima catalasa y miembros de la familia incluyendo la glutatión peroxidasa.

Tabla 2. Características de SOD en humanos.

| Nombre | Ubicación | Metal en centro catalítico | Peso en KDa | Ubicación del gene en humanos | Características |
|-------------------------|---|----------------------------|-------------|-------------------------------|------------------------------------|
| SOD1 CuZnDOD | Citoplasma, núcleo, peroxisomas, y en la membrana externa de la mitocondria | Cu y Zn | 32 | Cromosoma 21 | Simero, 153 aminoácidos por unidad |
| SOD2 | Memembrana | Mn | 89 | Cromosoma | Homotetramero |

| | | | | | |
|-----------------------|---|---------|-----|-------------|---------------------------|
| MnSOD | interna de la mitocondria | | | 6 | |
| SOD3 ECSOD | Extracelular asociada a heparina sangre entre otros | Cu y Zn | 135 | Cromosoma 4 | Glucoproteína tetramérica |

(Konigsberg FM; 2008)

En la enzima SOD1 solo el cobre tiene importancia catalítica, mientras que en zinc confiere estabilidad a la estructura proteica, sin embargo ambos metales están muy conectados por una amidazolato que provee la histidina 63. La enzima SOD2 es vital para la mitocondria ya que es uno de los organelos celulares que está sometido a mayor estrés; puesto que se estima que el 4 al 5 % de los electrones transportados por la cadena respiratoria son desviados para producir $O_2^{\bullet-}$. SOD3 es la única proteína extracelular que puede eliminar el $O_2^{\bullet-}$; a diferencia de las otras dos presenta una glucosilación en el aminoácido 89, SOD3 está presente en la matriz extracelular unida principalmente a la heparina y a las fibras de colágena tipo I de la mayor parte de los tejidos. También se ha encontrado en plasma y en fluido linfático y cefaloraquídeo (Lynch y Kuramitsu, 2000).

La reacción catalítica de SOD, es llevada a cabo en dos pasos, ambas son reacciones enzimáticas de primer orden respecto al $O_2^{\bullet-}$. El $O_2^{\bullet-}$ generado en la mitocondria o en otros sistemas es convertido por las SOD en H_2O_2 , el cual a su vez también es convertido en H_2O por la catalasa o por la glutatión peroxidasa (GPx) (Gulesserian et al., 2001).

3.1.2. CATALASA

Las catalasas son las enzimas que descomponen al H_2O_2 directamente en O_2 y agua para ello emplean dos moléculas iguales de H_2O_2 , una como agente reductor y otra como oxidante.

La familia de las catalasas más distribuidas es la de las catalasas monofuncionales. Estas enzimas son las que exhiben la actividad de catalasa más elevada, aunque también pueden tener actividad moderada de peroxidasa, pero solo en presencia de

moléculas pequeñas como agentes reductores (como el etanol y metanol). La mayor parte de estas enzimas está formada por 4 subunidades idénticas, aunque puede haber enzimas diméricas.

Cada una de las subunidades de la enzima está asociada a una ferro-protoporfirina-IX (hemo *b*) o derivados del mismo, como el hemo *d* o una clorina (Lledías et al., 1998). El hemo por sí solo cataliza la dismutación del H_2O_2 aunque con mucha menor eficiencia que la catalasa; casi todas las catalasas tienen una masa de 50 a 65 KDa (cerca de 480 aminoácidos) por subunidad. Sin embargo, también hay una familia de catalasa denominada de subunidad grande, que tiene una masa de 80 a 95 KDa (casi 700 aminoácidos) por subunidad. Estructuralmente las subunidades de las catalasas se caracterizan por 4 dominios. En las catalasas de subunidad grande existe un dominio adicional hacia el extremo C-terminal de casi 150 aminoácidos. Se piensa que este es un dominio de unión de flavinas.

Las catalasas monofuncionales dismutan el H_2O_2 en O_2 y H_2O y lo hacen con una gran eficiencia a cualquier pH entre 4 y 11. Son enzimas muy resistentes a agentes desnaturizantes y solventes orgánicos. Se inactivan con 3-amino-1,2,4-triazol y, como todas las hemoproteínas, se inhiben con cianuro y azida (Klotz et al., 1997).

Hay varios subgrupos de catalasas: uno de plantas, uno de animales, uno de hongos, dos de bacterias y uno de bacterias y hongos en donde se encuentran las catalasas grandes (Díaz et al., 2001).

3.1.3 GLUTATION PEROXIDASA

La enzima glutatión peroxidasa (GPx) es una selenoproteína antioxidante. La GPx reduce los hidroperóxidos utilizando glutatión como agente reductor, aunque las de hidroperóxidos de fosfolípidos pueden utilizar tioredoxina, glutaredoxina o tioles proteicos como fuente de poder reductor. Se han descrito GPx en los animales, en las plantas, en los esporozoarios, en algunas algas, hongos y bacterias. Los mamíferos

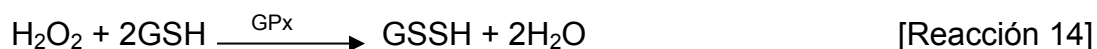
tienen varias peroxidases de glutatión: la citosólica (GPx1), la gastrointestinal (GPx2), la plasmática (GPx3) y la de hidroperóxidos de fosfolípidos (GPx4) (Brigelius-Flohé R; 1999). Son homotetrámeros con la excepción de la GPx4 que es un monómero de tamaño menor al de las subunidades de las otras glutatión peroxidases (Tabla 3). La GPx de hidroperóxidos de fosfolípidos es capaz de actuar sobre los fosfolípidos de las membranas celulares y de las lipoproteínas, además de los hidroperóxidos de timina y de ésteres de colesterol (Taurang , 1999).

Tabla 3. Isoformas de GPx en mamíferos: Localización, peso molecular, estructura y Km

| Isoenzima | Localización | Tipo de estructura | Peso molecular (kDa) | Km (μM) ¹ [GSH] = 1 mM |
|--------------|-------------------------------|--------------------|--------------------------------|--|
| GPx-1 | Citosol | Homotetrámero | 22 por subunidad (88 en total) | 12 para H ₂ O ₂ |
| GPx-2 | Citosol | Homotetrámero | 22 por subunidad (88 en total) | 3 para H ₂ O ₂ |
| GPx-3 | Fluidos extracelulares | Homotetrámero | 23 por subunidad (92 en total) | 3.3 para H ₂ O ₂ |
| GPx-4 | En citosol y membrana celular | Monómero | 19.7 | 11 para hidroperóxidos de fosfolípidos |

¹Los valores de Km son para GPx de humanos.(Konigsberg, 2008)

El GSH es el donador de equivalentes reductores en la reacción que cataliza la GPx; de esta manera, la reducción H₂O₂ a agua y la oxidación de glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG) ocurre simultáneamente (reacción 14).



La GPx también cataliza la reducción dependiente del GSH de los hidroperóxidos de los ácidos grasos, por ejemplo, los de la lipoperoxidación de los ácidos linolénico y linoleico, del 7β-hidroperoxido del colesterol y varios hidroperóxidos sintéticos, como el cumeno y los t-butil hidroperóxidos (Konigsberg, 2008).

4. ENZIMAS PRO-OXIDANTES

Los organismos no sólo tienen enzimas para desechar las especies reactivas de oxígeno y las especies reactivas de nitrógeno, sino que también tienen enzimas que producen $O_2\bullet$ y $NO\bullet$ y ácidos hipohalogenosos, además de las oxidasas que producen H_2O_2 .

En las células, las especies de oxígeno y nitrógeno reactivas están generando continuamente productos de oxidación y de nitratación que se pueden detectar en los sitios que se producen o como productos que se desecharan. Esto se debe en parte a que no se puede evitar totalmente la generación del $HO\bullet$ y el 1O_2 ni prever el sitio en donde se van a producir. Sin embargo; se ha observado que las ERO y ERN tienen funciones específicas. Tal es el caso de la participación del H_2O_2 en la síntesis de la hormona tiroidea y en la maduración y capacitación de los espermatozoides; el NO en la vasodilatación en los mamíferos.

Las enzimas que más se han estudiado son las que se activan cuando algún microorganismo invade el organismo, como la responsable del llamado estallido respiratorio en los leucocitos de los mamíferos y en las plantas. La NADPH oxidasa es una enzima que se encuentra en muchas células y que produce $2 O_2^-$ a partir de $2 O_2$ y NADPH como donador de electrones (Babior, 1997).

En condiciones fisiológicas las enzimas pro-oxidantes; (denominadas de esta forma porque son capaces de generar ERO), son expresadas en concentraciones controladas; en diversas alteraciones de los tejidos, donde se produce un mecanismo de isquemia, o cuando se activa el sistema inmunológico por procesos inflamatorios o infecciosos, se aumenta en forma exponencial la expresión de estas enzimas, llevando

a la célula o al tejido a una situación de estrés oxidativo por exceso de producción de radicales libres. Dentro de las enzimas pro-oxidantes esta: la xantina deshidrogenasa, NADPH oxidasa, xantina oxidasa, Mieloperoxidasa y la óxido nítrico sintasa.

4.1 NADPH oxidasa

La familia de enzimas NADPH oxidasa (NOX), que se encuentran en varios tejidos, de las cuales la más estudiada es la que se encuentra dentro de las células fagocíticas. Este tipo de NOX se activa cuando hay una amenaza por agentes patógenos, produciendo ERO y matando a los agresores.

La NOX se encuentra desensamblada dentro de la célula y es necesario que se acoplen todos los componentes para que pueda funcionar. La NOX activa es un multicomponente enzimático localizado en las membranas plasmáticas de las células activas. Sin embargo; las proteínas que conforman pueden ser membranales o citosolicas. El complejo que está anclado en la membrana está compuesto de una subunidad proteínica glucosilada con un peso molecular de 91 kDa (gp91phox) y una subunidad proteínica no glicosilada de 22 kDa (p22phox), formando un complejo en una relación 1:1. Este complejo contiene dentro de su estructura proteínica a dos grupos hemo un grupo flavin-adenin dinucleótido (FAD), que son los encargados directos del flujo de electrones dentro de la NOX.

Los componentes citosólicos de la NOX son las subunidades proteínicas p47phox, p67phox, p40phox, junto con una pequeña proteína G que actúa como GTPasa y que puede ser rac1 o rac2. En las células en reposo o no activadas, las subunidades p47phox, p67phox, p40phox, interactúan entre sí formando un complejo citosólico.

Actualmente se han identificado homólogos de gp91phox y su familia de proteínas, y fueron designados como la familia NOX/DUOX de NADPH oxidasa. Durante su activación, los componentes citosólicos se trasladan a la membrana iniciando la producción del $O_2^{\bullet-}$ (DeCoursey y Liguetti 2005).

NOX se puede activar ya sea por mecanismos dependientes o independientes de receptor. Los eventos que acompañan la activación de la NOX son: la opzonizada partícula o el agente soluble que debe unir al receptor. El receptor transmite la información a través de la familia de las proteínas G heterotriméricas (proteínas G que unen GTP). Las proteínas G activan a las enzimas de la membrana como la fosfolipasa (PLC), fosfolipasa A2 (PLA2), y fosfolipasa D (PLD), lo cual conlleva a la liberación de mensajeros intracelulares o segundos mensajeros. Por ejemplo, la PLC corta al lípido membranal fosfatidil inositol-4,5-difosfato (PIP_2) y lo convierte en diacilglicerol (DAG); este tipo de moléculas activan a proteínas cinasa como PKA, PKC y las MAP-cinasa.

La PLA2 activa a las proteínas G produce ácido araquidónico, que a su vez activa a la NOX. Los tres componentes citosólicos que forman el heterotrimerio, p47phox, p67phox y p40phox, junto con rac, se traslocan a la membrana plasmática o membrana del fagosoma, y se ensamblan el flavocitocromo b_{558} . Una vez que NOX está ensamblada, la actividad de la enzima y su actividad catalítica puede llevarse en diversos puntos.

El mecanismo para que comience a producir $O_2^{\bullet-}$, es el siguiente: el NADPH debe ligarse a un sitio de unión en la subunidad gp91 phox, en donde se oxida perdiendo dos electrones, se libera de la enzima en forma de $NADP^+$. Los electrones se transfieren de uno en uno hacia el FAD, posteriormente al hemo más interno de ahí el más externo. Cada electrón pasa del último hemo al O_2 , y por último, el oxígeno recibe un electrón, se convierte entonces en el $O_2^{\bullet-}$. (Cross y Segal, 2004)

4.2 XANTINA OXIDASA

La xantina oxidasa (XO), es una forma de xantina oxidoreductasa que produce ERO es una enzima que cataliza la oxidación de hipoxantina a xantina y puede luego catalizar la oxidación de xantina en ácido úrico (Hille, 2005; Harrison, 2002)

La xantina oxidasa (XO) es un homodímero de dos subunidades catalíticamente independientes, con un grupo molibdopterio. Tiene 2 moléculas de flavina (unidas como FAD), 2 átomos de molibdeno, y 8 átomos de hierro por unidad enzimática. Los átomos

de molibdeno se encuentran como [cofactores](#) de [molibdopterina](#) y son los sitios activos de la enzima. Los átomos de hierro son parte de la [ferredoxina](#) de los [centro hierro-azufre](#) [2Fe-2S] y participan en reacciones de transferencia de electrones (Muraoka y Miura 2004).

La enzima xantina oxidoreductasa (XOR) es un miembro evolutivamente muy conservado de la familia de las enzimas que poseen Molibdeno (Mo) como grupo prostético. En mamíferos, los mayores niveles de XOR se encuentran en el hígado y en el intestino delgado. Esta enzima puede encontrarse en una de sus dos formas interconvertibles, que son la xantina deshidrogenasa (XDH) y la xantina oxidasa (XO).

La diferencia entre ellas es que la XO solo puede reducir al oxígeno, mientras que la XDH puede reducir tanto al oxígeno como la NADP⁺, pero es mucho más a fin a este último. Ambas participan en el catabolismo de los compuestos nitrogenados, particularmente en la degradación de las purinas (adenina y guanina). La XOR cataliza las reacciones terminales de esta vía, transformando a la hipoxantina en xantina y a la xantina en ácido úrico, que es el producto final de las purinas en humanos. (Harrison, 2002; 2004).

La conversión de la enzima ocurre por dos diferentes vías que determinan la irreversibilidad del proceso. La conversión irreversible de la XDH a XO ocurre cuando la enzima se rompe de manera proteolítica, se convierte en la forma de XO de manera irreversible. Esto puede ocurrir ya sea por tratamiento con enzimas que degradan proteínas, como la tripsina, pancreatina o alguna proteinasa. La conversión reversible de la XDH a XO ocurre cuando se oxida algunos grupos tioles (-SH) de las cisteínas (al parecer la cis 535 y la 922).

El mecanismo de reacción de la enzima XOR aún no se conoce del todo; sin embargo el fenómeno en general se ha dividido en dos semi-reacciones: reductora y oxidante (Hillie, 2006). La semi-reacción reductora ocurre en el Mo-Co. La XOR recibe dos electrones provenientes de la xantina para reducir al Mo (VI) en Mo (IV). Así mismo, se transfiere hidrógeno de la posición del carbono 8 de la xantina hacia unos de los ligandos de azufre que unen al molibdeno reduciéndolo (pasa de Mo= S a Mo-SH). Al

mismo tiempo se lleva a cabo un ataque nucleofílico hacia el Carbono 8 por un grupo hidroxilo proveniente del agua, para formar ácido úrico (Hille, 2005).

En contraste, la semi-reacción oxidante se lleva a cabo en el FAD, ya que existe la transferencia intramolecular de electrones desde el Mo-Co hacia el FAD mediada por los centros [2Fe-2S]. El FAD, por tanto, sirve como reservorio de electrones para mantener al centro Mo-Co en un estado Mo (VI), y la flavina se convierte en FADH₂. De este punto los electrones se transfieren a su aceptor final, ya sea O₂ o NAD⁺.

Durante la reoxidación de la XOR totalmente reducida, transfiere los electrones remanentes en pasos separados, de manera tal que cada electrón reduce de forma independiente a un oxígeno, generando O₂^{•-}. De modo que la reoxidación de la XOR totalmente reducida produce dos H₂O₂ y dos O₂^{•-} (Hiller, 2006).

5. HUMO DE CIGARRO COMO FUENTE DE ERO

El humo del cigarro es una mezcla química compleja y dinámica de más de 4700 compuestos químicos (Rockville, 2010). La nicotina es el mayor alcaloide en el cigarro y ha sido considerada la responsable de efectos deletéreos (Argentin y Cicchetti, 2004). Pocos componentes se han estudiado bien, entre ellos la nicotina y el CO₂, pero que son mucho menos dañinos que el humo en su conjunto, pues los radicales libres y otros oxidantes presentes en altas concentraciones (Pryor y Stone, 2000), en él pueden ser los responsables de la mayoría de los daños funcionales y morfológicos que acompañan el hábito de fumar (Pitillo, 2000), y aún la nicotina, la sustancia orgánica más abundante en el humo del cigarro, tiene un efecto fundamental mediante una producción muy alta de radicales libres, particularmente del radical hidroxilo y del anión superóxido (Kaufmann, 2000).

El humo del cigarro puede ser separado en 2 fases, la fase gaseosa y la sólida o alquitrán. En la fase gaseosa se han detectado las siguientes especies reactivas: anión superóxido, radicales hidroxilo y peroxilo, H₂O₂, ¹O₂, óxido nítrico, peroxinitrito y NO₂ (Neunteufl et al., 1998). Sin embargo, la principal fuente de superóxido y H₂O₂ en el humo del cigarro es debida a los polifenoles de la fase sólida (Kodama et al., 1997), la que contiene cientos de compuestos orgánicos. Entre ellos los más importantes son las

quinonas que son una mezcla en equilibrio entre semiquinonas, hidroquinonas y quinonas, y que están muy probablemente envueltas en la toxicidad del hábito de fumar porque este sistema produce gran cantidad de ERO como superóxido, H_2O_2 y el radical hidroxilo (Benejee et al., 1998).

Los metales de transición (como el hierro) también están presentes en el humo del cigarro donde tienen un papel clave en el daño celular inducido por ERO, dada su función en la producción de especies reactivas como $OH\cdot$ mediante la reacción de Fenton (Rockville MD. 2010).

Al fumar se forman hidrocarburos policíclicos aromáticos, carcinógenos tipificados por el venzo pireno. Estos y otros carcinógenos son lipofílicos, por lo que son metabolizados hacia metabolitos hidrofílicos para facilitar su excreción mediante la adición de grupos funcionales polares lo que se realiza por reacciones de oxidación llevadas a cabo por monoxigenasas, como las del citocromo P_{450} . Todas estas reacciones oxidantes pueden también generar ERO que son capaces junto a las originadas en el propio humo de provocar mutaciones, así como favorecer procesos de peroxidación lipídica que explican en el daño patológico que causa el humo de cigarro (Van Klaveren et al., 2000).

El humo de cigarro no sólo deposita ERO directamente en pulmones, tracto aéreo y mucosa oral, sino que también genera daños a los tejidos por el consumo de los sistemas antioxidantes; los deja vulnerables a la acción de los radicales libres (Cross et al., 1999), que de otra forma serían neutralizados por los niveles normales de antioxidantes, por lo cual los fumadores tienen niveles más bajos de vitamina C sérica y de beta caroteno (Wie et al., 2001) y un índice antioxidante del plasma menor, independientemente del ingreso dietético de antioxidantes que también puede verse afectado. (Cross et al., 1999).

6. NICOTINA

La hoja de tabaco contiene muchos alcaloides; la nicotina es la más abundante. El contenido de nicotina varía, entre otros factores, por la posición de la hoja en el tallo de tabaco y también por el tipo de mezcla o de la hoja utilizada en un cigarro (Rockville, 2010). La nicotina es adictiva en los seres humanos debido a que una porción de la molécula de la nicotina es similar a la acetilcolina, un importante neurotransmisor cerebral (Brody et al., 2006).

Los alcaloides de la hoja de tabaco incluyen anatabina, anabasina, nornicotina, N-methilanabasina, nicotina, nicotina N'-óxido, miosmina, β -nicotirina, cotinina, y 2,3'-bipiridilo. En productos comerciales de tabaco, las concentraciones de nicotina varían desde 6 a 18 miligramos por gramo (mg / g) (0,6 a 1,8 por ciento en peso) (Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer [IARC] 2004).

La molécula de la nicotina no protonada contiene dos átomos de nitrógeno con propiedades básicas. La molécula de la nicotina no protonada puede por lo tanto añadir un protón para formar una especie monoprotonada o dos protones para formar la especie diprotonada, (Brunnemann y Hoffmann, 1975). El primer protón añadido a la nicotina se une predominantemente al nitrógeno en el anillo de cinco miembros (pirrolidina), debido a que el nitrógeno es significativamente más básico que el nitrógeno en el anillo de seis miembros (piridina). Aunque la nicotina no protonada es volátil, la nicotina no protonada es volátil y es capaz de entrar en la fase de gas y pasar fácilmente en las membranas lipídicas. En la planta de tabaco y en la hoja seca, la nicotina existe en gran parte en sus formas iónicas, de lo contrario, se perdería rápidamente a la atmósfera circundante (Rockville, 2010).

La nicotina afecta una gran variedad de procesos celulares que van desde la expresión génica hasta secreción de hormonas (Argentin y Cicchetti, 2004) y modulación de la actividad enzimática (Yildiz et al., 1999). Otro efecto importante de la nicotina es la regulación negativa de la apoptosis, un proceso morfológicamente distinto de la muerte celular que implica la activación de un programa intrínseco de suicidio celular. La apoptosis es un mecanismo de defensa importante para prevenir y eliminar las células

cancerosas (Heishma et al., 1994) y, por lo tanto, su regulación negativa puede contribuir al desarrollo y el crecimiento tumorogénico y a una disminución en la eficacia de terapias contra el cáncer.

Diferentes estudios indican que la nicotina ejerce un efecto supresor sobre la señalización de la vía de la muerte, incluyendo líneas celulares de cáncer (Wright et al., 1993), lo que contribuye al crecimiento del tumor. Estudios *in vitro* e *in vivo* en células de roedores mostraron que la exposición a la nicotina produce lesiones oxidantes en tejidos de hámster chino, rata, ratón y, a menudo resulta en un agotamiento de contenido de glutatión y una disminución en la actividad de algunas enzimas antioxidantes, tales como catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (Bhagwat et al., 1998; Wetscher et al., 1995).

La nicotina como parte del humo del cigarro afecta a la encía como barrera primaria de protección en el organismo.

7. ENCÍA

La encía es un tejido conjuntivo denso cubierto por epitelio escamoso queratinizado y forma parte de los tejidos del periodonto, la encía es la porción más periférica del periodonto; comienza en la unión mucogingival y cubre la porción coronal del proceso alveolar y termina en el cuello del diente, lo rodea. La encía asegura con ello la continuidad del recubrimiento superficial de la cavidad bucal (Eley et al., 2011).

La encía por su función y ubicación se clasifica en mucosa masticatoria. En condiciones sanas es de color rosa pálido (salmón ó coral), pero es común que el color varíe dependiendo del grosor epitelial y la queratinización, vascularización y pigmentación. La textura superficial que presenta es firme y puede tener pequeñas depresiones en forma puntiforme (Eley et al., 2011).

La encía está formada histológicamente por epitelio y tejido conjuntivo, de distinto origen embriológico; a su vez se divide de acuerdo a la relación con los tejidos dentales: (a) encía libre y (b) encía insertada (Figura 1)

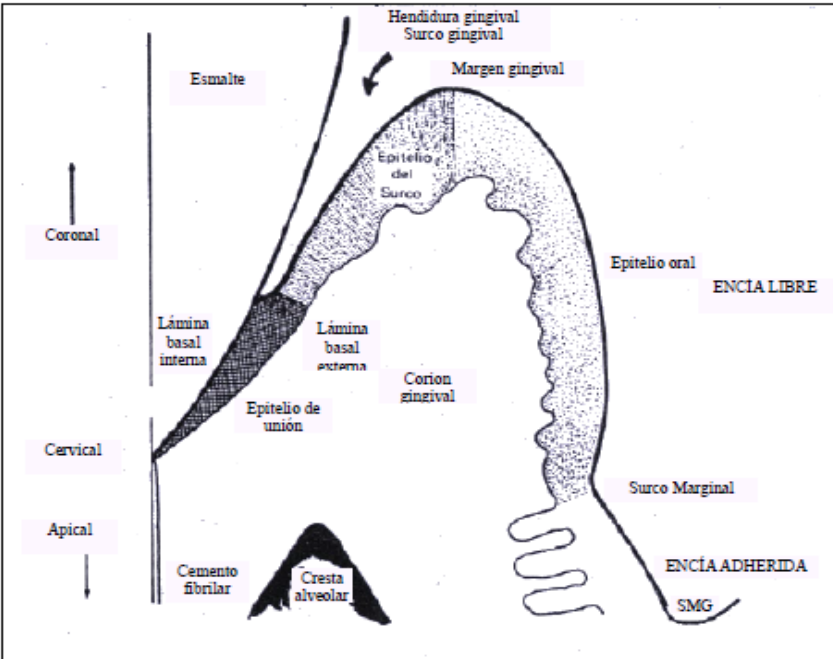


Figura. 1. Representación esquemática de la encía insertada y la encía libre y sus principales partes anatómicas.

La encía posee las siguientes porciones anatómicas: (a) Margen Gingival: tiene aproximadamente 1,5 mm de ancho y rodea los dientes en forma de collar siguiendo las ondulaciones de las superficies de los dientes según su convexidad. (b) Surco gingival: este es un surco o línea que se encuentra entre la encía libre y la encía adherida. La encía libre se encuentra sobre la superficie dentaria y está sin adherir; este espacio poco profundo tiene forma de V; en condiciones normales la profundidad es de 0.5 a 2 mm. (c) Encía insertada: También denominada adherida o fija, ya que presta inserción en el periostio del hueso alveolar correspondiente. Sus límites son hacia oclusal el surco marginal y hacia apical en el surco mucogingival, que lo separa de la mucosa de revestimiento de la cavidad bucal. La encía es firme y elástica, el ancho varía en las diferentes áreas de la boca de 1 a 9 mm (Eley et al., 2011).

7.1 TEJIDO EPITELIAL

El tejido epitelial es un conjunto de células asociadas o dispersos que constituyen un nivel organizado supracelular destinado al revestimiento de superficies y la elaboración de sustancias específicas para el metabolismo. Las poblaciones epiteliales se originan a partir de las tres hojas blastodérmicas, ectodermo, mesodermo y endodermo, poseen un sistema de renovación permanente y presentan dos líneas de diferenciación celular, la diferenciación protectora para el revestimiento y la diferenciación glandular para la secreción. El tejido epitelial es avascular y se asienta sobre una membrana basal que las une al tejido conjuntivo subyacente rico en vasos a expensas del cual se nutre (Gómez y Campos, 2010).

7.2 EPITELIO ESCAMOSO ESTRATIFICADO QUERATINIZADO.

Está constituido por dos tipos de poblaciones celulares: (a) Intrínseca, formada por queratinocitos y (b) Extrínseca de origen ajeno al epitelio, formada por una población permanente y una transitoria (Gómez y Campos, 2010).

7.3 POBLACIÓN INTRÍNSECA

Los queratinocitos, son células que componen el epitelio bucal y están destinadas a queratinizarse durante su evolución sufren una migración desde las capas más basales hasta la superficie; formando diferentes estratos que confieren características específicas a cada uno de ellos, denominados: (a) estrato basal, (b) estrato espinoso, (c) estrato granuloso y (d) estrato córneo (Figura. 2).

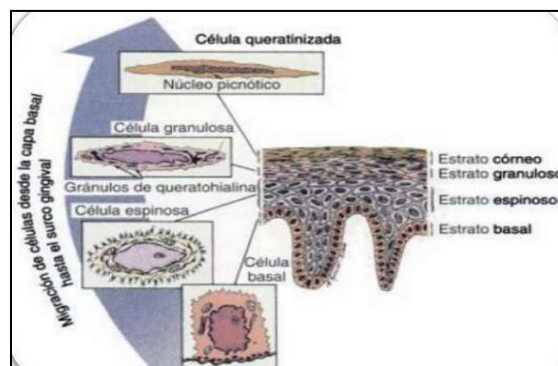


Figura 2. Representación esquemática de la migración de células desde la capa basal hasta el surco gingival; formando los diferentes estratos.

El estrato basal: está constituido por una capa única de células de forma cúbica o cilíndrica, el núcleo es redondo u oval, el citoplasma es muy basófilo conferido por los ribosomas y son responsables de la formación de la lámina basal. En esta capa existen células epiteliales mitóticas que por división y diferenciación darán lugar a los queratinocitos de las capas superiores. El estrato espinoso: está formado por varias hileras de queratinocitos, las células que lo constituyen son poligonales de núcleo redondo pequeño, con citoplasma ligeramente basófilo, se encuentran células de Langerhans y células de Merkel. El estrato Granuloso: está constituido por dos o tres capas de células escamosas con un núcleo pequeño, el citoplasma está lleno de gránulos de queratohialina, en esta zona comienza la degeneración del núcleo. El estrato Córneo: se caracteriza por estar constituido por células planas sin núcleo evidente, no hay gránulos de quetaohialina, carecen de orgánulos; la célula queratinizada se torna una escama compacta y deshidratada (Gómez y Campos, 2010).

7.4 POBLACIÓN EXTRINSECA PERMANENTE

Está formada por melanocitos, células de Merkel y células de Langerhans. Las melanocitos, son células claras con núcleos pequeños, se caracterizan por tener abundantes gránulos precursores de melanina. Las células de Merkel son células claras con escasos gránulos densos de forma esférica. Son células sensoriales adaptadas para la recepción de la presión. Las células de Langerhans: procesan y presentan los antígenos a los linfocitos T e inician una rápida respuesta inmunológica (Gómez y Campos, 2010).

7.5 POBLACIÓN EXTRINSECA TRANSITORIA

Está formada por Granulocitos, Linfocitos y Monocitos.

7.6 TEJIDO CONJUNTIVO GINGIVAL

El tejido conjuntivo gingival consta de una malla de haces de fibras de colágeno que circula por una sustancia fundamental que contiene vasos sanguíneos y nervios, además de fibroblastos macrófagos, mastocitos, linfocitos células plasmáticas y otras células del sistema de defensa, que son más numerosas cerca del epitelio de unión donde la actividad inmunitaria es continua. Las fibras de tejido conjuntivo gingival están formadas por una célula fibroblástica especializada y una red fibrosa colágena insertada en la matriz extracelular compuesta de proteoglucanos y otras glucoproteínas de la matriz extracelular, la función del tejido conjuntivo es la remodelación constante de los componentes de la matriz y depende de interacciones entre las células y las moléculas de la matriz extracelular. Esto modula la producción y unión a sus receptores de moléculas de señalización, como factores de crecimiento y factores de diferenciación y las moléculas de adhesión celular y sus interacciones con componentes de la matriz extracelular (Gómez y Campos, 2010).

7.7 FIBRAS GINGIVALES

El tejido conjuntivo de la encía se organiza para mantener el margen gingival unido al diente alrededor del cuello y para mantener la integridad de la inserción dentogingival. La disposición de las fibras es complicada, pero se han descrito como divididas en varios grupos de haces de fibras de colágeno: (a) Fibras dentogingivales o gingivales libres, que se insertan en el cemento radicular y se abren en abanico en la encía y sobre el margen alveolar, para fusionarse con el periostio de la encía insertada. (b) Fibras alveologingivales o de la cresta alveolar de donde nacen y fluyen coronalmente hacia la encía. (c) Fibras circulares, que rodean al diente. (d) Fibras transeptales que circulan de diente a diente coronalmente a la cresta alveolar. Hay una gran interacción entre los grupos de fibras, El colágeno es sintetizado por los fibroblastos y se segrega de forma inactiva, en forma de procolágeno que luego se convierte en tropocolágeno en el espacio extracelular, el tropocolágeno se polimeriza en fibrillas de colágeno, que luego se agregan en haces de colágeno para formar entrecruzamientos.

Pueden segregarse diferentes tipos de colágeno para formar entrecruzamientos; cada una de las formas de colágeno está basada en variaciones de composición de la molécula básica de tropocolageno. La forma más común encontrada en la encía es el colágeno tipo I, que forma los haces de fibras mayores y las fibras de colágeno laxo, también se encuentran algunos colágenos de tipo III, V y VI, este último en las membranas basales de los vasos sanguíneos y el epitelio subyacente (Eley et al., 2011).

7.8 ENFERMEDADES DE LA ENCÍA

Las enfermedades gingivales son una amplia familia de patologías diferentes y complejas, que se encuentran confinadas a la encía y son el resultado de diferentes etiologías (Eley et al., 2011) . La característica común a todas ellas es que se localizan exclusivamente sobre la encía; no afectan de ningún modo a la inserción ni al resto del periodonto. De ahí que se engloben en un grupo independiente al de las enfermedades periodontales (Matezans y Matos, 2008).

7.9 GINGIVITIS

La gingivitis es una condición reversible de los tejidos blandos gingivales, que, como consecuencia de un proceso inflamatorio hay presencia de sangrado y pueden cambiar de color, tamaño y consistencia el tejido gingival. El desarrollo de la gingivitis puede progresar a enfermedad periodontal; este desarrollo puede ser dividido en una serie de pasos; se clasifica el desarrollo de la enfermedad en: lesión inicial, lesión temprana y lesión establecida. (Tabla 4); (Ohlrich et al., 2009).

Tabla 4. FASES DE LA GINGIVITIS

| Fase | Tiempo (días) | Vasos sanguíneos | Epitelio de unión y del surco | Células inmunitarias predominantes | colágeno |
|---------------------------|---------------|--|--|------------------------------------|--------------------------------------|
| Lesión inicial | 2 a 4 | Dilatación vascular | Infiltrados por PMN | PMN | Perdida perivascular |
| Lesión Temprana | 4 a 7 | Vasculitis proliferación vascular | Formación de proyecciones interpapilares | Linfocitos | Mayor pérdida en torno al infiltrado |
| Lesión establecida | 14 a 21 | Proliferación vascular y estasis sanguínea | Formación de proyecciones interpapilares y zonas atróficas | Células plasmáticas | Pérdida continua |

The immunopathogenesis of periodontal disease, (Ohlrich E.J., et al; 2009)

Las alteraciones gingivales se clasifican según su origen, por placa dentobacteriana (PDB), o por ausencia de esta (Tabla 5.), de acuerdo a la clasificación publicada en el International World Workshop in Clinical Periodontics en 1999; las alteraciones gingivales asociadas PDB, son aquellas en la que la PDB es un condición necesaria para el desarrollo de la gingivitis. Las enfermedades gingivales en las que la PDB no juega un papel primordial; sino que su origen está dado por otros factores (Eley et al., 2011).

Tabla 5. CLASIFICACIÓN DE ENFERMEDADES GINGIVALES

| Enfermedades gingivales inducidas por PDB | Enfermedades gingivales no asociadas a PDB |
|--|--|
| 1 Gingivitis asociada únicamente a PDB Sin otros factores locales | 1 Lesiones originadas por bacterias específicas Nesisseria gonorrea Treponema Pallidum |

| | |
|---|--|
| <p>contribuyentes Con otros factores locales contribuyentes</p> <p>2 Enfermedades gingivales modificadas por factores sistémicos. Asociado al sistema endocrino. En la pubertad En el ciclo menstrual En el embarazo a)gingivitis b)granuloma piógeno 4) Gingivitis en la diabetes mellitus. b) Asociadas a discracias sanguíneas. 1)Gingivitis en la leucemia 2)Otras</p> <p>3 Enfermedades gingivales influenciadas por medicación. Influidas por drogas. Agrandamientos gingivales inducidos por drogas Gingivitis influenciada por drogas Influenciada por anticonceptivos Otros.</p> <p>4 Enfermedades gingivales modificadas por malnutrición. Gingivitis por deficiencia de ac. Ascórbico. otros</p> | <p>Estreptococal sp. Otras variedades.</p> <p>2 Enfermedad gingival de origen viral. Infecciones por herpes. 1) Gingivoestomatitis primaria. 2) herpes oral recurrente 3)varicela-zoster.</p> <p>Otras.</p> <p>3 Enfermedad gingival de origen fúngico. Infecciones por Candida Candidiasis gingival generalizada. Eritema gingival lineal Hitoplasmosis Otras</p> <p>4 Lesiones gingivales de origen genético. Fibromatosis gingival hereditaria Otras</p> <p>5 Manifestaciones gingivales de ciertas condiciones sistémicas. Desórdenes mucocutáneos. Liquen plano Penfigoide Pénfigo vulgar Eritema multiforme Lupus eritematoso Inducido por drogas Otros Reacciones alérgicas. Materiales dentales Mercurio Níquel Acrílico Otros Reacciones atribuibles a Dentífricos Anjuegos bucales Aditivos del chile Alimentos y aditivos Otros</p> <p>6 Lesiones traumáticas (iatrogenias, incidentales, accidentales) Químicas Físicas Térmicas</p> <p>Reacciones a cuerpo extraño</p> <p>No especificadas (NES).</p> |
|---|--|

International World Workshop in Clinical Periodontics 1999.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cómo cambian los sistemas pro-oxidante y antioxidante de encía de rata expuesta a nicotina?

IV. Hipótesis

Las enzimas que generan especies reactivas (ERO) aumenten al igual que las ERO y se modifica el sistema antioxidante en la encía de rata expuesta a nicotina.

V. OBJETIVO

Evaluar los cambios de estrés oxidante debidos a la exposición a nicotina en encía de rata.

VI. OBJETIVOS PARTICULARES

Evaluar las enzimas antioxidantes (SOD, CAT y GPx) en encía de rata expuesta a nicotina.

Evaluar las enzimas pro-oxidante (NADPH oxidasa y XO) en encía de rata expuesta a nicotina.

Evaluar marcadores de estrés oxidante y los niveles de ERO ($O_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot} , H_2O_2) en encía de rata expuesta a nicotina.

VII. Justificación

La integridad de la encía es esencial como primera barrera de entrada al organismo. La caracterización completa de los sistemas pro-oxidante y antioxidante previo al daño a la encía debida a la exposición a nicotina, permitirá tener un panorama más completo para buscar posibilidades para evitarlo o disminuirlo.

VIII. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Reactivos

Ácido ascórbico, el naranja de xilenol, el hidroxitolueno butilado, el nitroazul de tetrazolio (NBT), el carbonato de sodio (Na_2CO_3), la desoxirribosa, el ácido tiobarbitúrico, la xantina oxidasa, la xantina, el NADPH, la (\pm) nicotina y los anticuepos que se utilizarón en la inmunohistoquica contra NADPHox, SOD, CAT y GPx fueron de la marca Sigma-Aldrich. El dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el metanol grado HPLC, el H_2SO_4 , fueron de la marca JT Baker. El medio Dulbecco's Modified Eagle (DMEM)

2. Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 250 a 400g de peso, las cuales se mantuvieron en jaulas con ciclos artificiales luz/oscuridad de 12 h. Los animales se mantuvieron con alimentación y agua. Los animales que formaron parte del grupo control de otros protocolos fueron utilizados para realizar este estudio, debido a que solo se utilizaría la encía.

3. Diseño experimental

Cada grupo estuvo formado por 3 animales; una vez que los animales eran sacrificados, se tomaba la encía de la papila interdental del animal. El tejido fue lavado con solución salina isotónica estéril (SSI), para posteriormente incubarlo en la solución de nicotina correspondiente.

El ensayo de estudio se diseñó a partir de curvas dosis respuesta con concentraciones de nicotina de 0.000005 uM a 50 uM con tiempo de 2 y 3 horas de incubación a 37°C en una atmosfera de O₂ con 5% de CO₂ en una incubadora RM130005-9ABA (Revco termo Electrón Corporation), una vez estandarizado el modelo se utilizaron las concentraciones de 0.05 uM y 0.5 uM, en un tiempo de incubación de 3 horas utilizando como vehículo medio DMEM con antibiótico; además se utilizó como control de daño una concentración de dicromato de potasio, (DCrK) de 100uM.

Grupos:

| Grupo 1 | Grupo 2 | Grupo 3 | Grupo 4 |
|-------------------|--------------|-------------|--------------|
| Control [Nic 0uM] | [Nic 0.05uM] | [Nic 0.5uM] | [100uM DCrK] |

3.1 Homogenado

Se preparó el homogenado de encía con 2 fragmentos de encía; una vez transcurrido el tiempo estimado de incubación, el tejido se retiró del medio y se colocó en 70µL amortiguador de fosfatos 20uM, pH 7.4, tritón 1% empleando un homogenador tipo politrón (marca POLYTRON) durante 20 segundos, los homogenados se centrifugaron a 10000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, dependiendo del parámetro a medir se hicieron las mediciones correspondientes: a) cantidad de proteína, b) determinaciones de O₂•-, H₂O₂ y •OH, c) SOD, CAT GPx, NADPHox y XO. Los experimentos se hicieron por triplicado.

3.1.1 Cuantificación de proteínas

La determinación de proteínas se realizó por método colorimétrico de Lowry (et al., 1951); Se preparó una curva patrón con albumina sérica bovina (0, 5, 10, 15, 25, 35 ,50 y 100 µg/ml) y se trató a la par las muestras, se adicionaron 100 µl de solución C [A:B, 50:1 (tartrato de sodio y potasio 0.02% NaOH 0.4%, Na₂CO₃ 2%; B: CuSO₄ 0.5%,)] se agitó y se incubó a temperatura ambiente por 10 min, después se adicionaron 10 µl de solución D (folin:agua 1:1), se agito en vortex G-560 (Scientific

Industries) y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente, la absorbancia se determinó a 660nm. Se utilizó una curva para calcular la concentración de cada muestra analizada. Los resultados se expresaron como μg de proteína.

3.1.2 Determinación de anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$)

En esta determinación, se empleó el método de reducción de NBT. En este ensayo el NBT es reducido por $\text{O}_2^{\bullet-}$ y se convierte en formazan de NBT que se absorbe a 560 nm. Las sales de tetrazolio son indicadores coloridos muy sensibles a reacciones enzimáticas redox.

Se utilizó como blanco la mezcla de reacción (NBT 0.075 mM y carbonato de sodio 32 mM en AF 50mM pH7). A 10 μl de muestra en AF de 20 mM pH 7.4, se adicionó 80 μl de la mezcla de reacción. Se agitó en vortex e inmediatamente se midió la absorbancia cada minuto por 3 minutos en un espectrofotómetro DU 800 (Beckman). Se obtuvo el promedio de las diferencias por minuto, se calculó la concentración de $\text{O}_2^{\bullet-}$ utilizando el coeficiente de absortividad molar ($25\ 400\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

3.1.3 Determinación de peróxido de Hidrógeno (H_2O_2)

Esta determinación se realizó siguiendo el método de FOX. Este método se basa en la oxidación del ión ferroso (Fe^{2+}) por H_2O_2 a la forma férrica (Fe^{3+}). La cual forma un complejo con el naranja de Xilolenol cuya absorción máxima se presenta a los 560nm (Jiang et al., 1992; Lee y Halliwell, 2001; Nourooz-Zadeh y Wolf, 1994; Nourooz-Zadeh et al., 1995).

Se preparó una curva de 0, 10, 25, 50 y 75 μM de H_2O_2 . A 10 μl de la curva o de la muestra se les adicionó un 1 μl de metanol y se agitó en vortex, luego se adicionaron 100 μl del reactivo de FOX (9 volúmenes de hidroxitolueno butilado 4mM en MeOH y 1 volumen de naranja de xilolenol 1mM, $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ 2.56 mM en H_2SO_4 250mM) y se agitó en vortex. La curva y las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min. Se determinó la absorbancia de la curva y de las muestras a 560 nm. Con los datos de la curva se calculó la concentración de H_2O_2 en cada muestra.

3.1.4 Determinación de radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$)

Para la determinación de $\bullet\text{OH}$ se utilizó el método indirecto del ácido tiobarbitúrico. El cual está basado en la conversión de desoxirribosa a malondealdehído por acción del $\bullet\text{OH}$. Posteriormente el malondealdehído reacciona con el ácido tiobarbitúrico en medio ácido formando un aducto de color rosa (Halliwell et al. 1991).

Se le adicionarón 80 μl de mezcla de reacción (ácido ascórbico 0.25mM y desoxirribosa 0.65 mM en AFK 20 mM pH 7.4) a 10 μl de muestra y se agitó en vortex y se incubó durante 1 h a 37°C, cinco minutos antes de cumplirse la hora de incubación se preparó un curva estándar con tetrametoxipropano de 0,0.74, 1.48, 2,96, 5.92, 11.84 y 23.68 μM , que equivalen respectivamente a: 0,0.74, 1.48, 2,96, 5.92, 11.84 y 23.68 nmol de malondealdehído. Transcurrido el tiempo de incubación, se adicionarón 100 μl de la mezcla de TBA (TBA 25.32 mM, HCl 0.636 M, TCA 1487 M y DFO 1mM) a la curva y a las muestras y se agitaron en vortex. Se colocaron en un baño de ebullición durante 10 min. Se midió la absorbencia a 532 nm. Con los datos obtenidos de la curva se calculó la concentración de $\bullet\text{OH}$ en la muestra.

3.1.5 Actividad de superóxido dismutasa total (SOD)

La actividad de la SOD total se determinó por la reducción de NBT. Se preparó una solución de xantina oxidasa con una concentración de 168 U/L y una mezcla de reacción que contenía en concentración final xantina 0.3 mM, EDTA 0.6 mM, NBT 150 μM , albúmina seria bovina 0.1%, sulfato de aluminio y carbonato de sodio 49 mM. Se colocaron 100 μl de la mezcla de reacción y se mantuvieron a 27°C. Posteriormente se adicionó 10 μl de homogenado e inmediatamente después la reacción inicio con la adición de solución de xantina oxidasa. Se preparó un blanco para cada muestra con los mismos reactivos pero en lugar de la solución de xantina oxidasa se adicionó agua. De manera simultánea se preparó un blanco de comparación el cual contenía xantina oxidasa pero sin la muestra, las muestras con la solución de reacción se incubaron por 30 min, al término de esta incubación se adiciono cloruro cúprico 0.8 mM y se leyó la densidad óptica a 560 nm los datos se expresaron en U de SOD/ μg de proteína. Una

unidad de SOD se define como la cantidad de SOD necesaria para inhibir en un 50% la reducción de NBT.

3.1.6 Actividad de Catalasa (CAT)

Para esta determinación se usó el método de Aebi; se adicionaron 5 μ l del homogenado a 80 μ l de la solución de reacción (amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 7.0 y peróxido de hidrógeno). Se mezcló con 725 μ l de peróxido de hidrógeno 7.7 mM en amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7.0. Se midió el cambio de absorbencia a 255 nm cada 15 seg durante 30 seg que es el periodo en que la descomposición de H₂O₂ sigue una cinética de primer orden (k) como unidad de actividad de la catalasa, la cual queda definida de acuerdo a la siguiente fórmula: $k = (1/t)(2.3 \times \log A1[A2])$ donde t = intervalo de tiempo medio, A1 y A2 son las absorbencias de H₂O₂ en los tiempos t₁ y t₂.

3.1.7 Actividad de Glutation peroxidasa (GPx)

Se empleó el método de Lawrence y Burk (1976). Con una solución de reacción con fosfato de potasio 50 mM pH 7.0, EDTA 0.6 mM, azida de sodio 1mM, NADPH 0.1 mM y glutatión reducido 1mM como blanco se utilizó agua destilada; de esta mezcla se adicionó 100 μ l a 5 μ l de muestra. Después de 5 min de incubación de la muestra con el amortiguador a temperatura ambiente, inmediatamente después se leyó la absorbencia a 340 nm cada minuto durante 3 minutos. Se realizó un inespecífico de cada muestra el cual contenía lo mismo que la mezcla de reacción excepto el NADPH; los datos se expresaron como U/ μ g de proteína una unidad de se define como los μ moles de NADPH oxidado en un minuto.

3.1.8 Actividad de Xantina oxidasa (XO)

La actividad de esta enzima se determinó en el pelet del homogenado resuspendido con AFK de 20 mM pH 7.0 y tris; se realizó una mezcla de reacción con Xantina oxidasa-xantina 0.3 mM , NBT 0.75 mM, albumina bovina 0.1%, EDTA y Na₂CO₃ 400

mM, además se preparó una solución inespecífica como control negativo para cada muestra que contiene todo lo anterior excepto XO-xantina oxidasa 0.3 mM; para la solución de reacción se tomaron 5 μ l de muestra y 100 μ l de mezcla de reacción y para el inespecífico se tomaron 10 μ l de muestra y 100 μ l de solución inespecífica; inmediatamente después se midió su absorbencia a 395 nm cada 15 segundos durante 2 min la solución inespecífica cuantifica la cantidad de $O_2^{\bullet-}$ en la muestra y la mezcla de reacción cuantifica la producida por XO; el NBT es reducido por el $O_2^{\bullet-}$ y así puede ser cuantificado.

3.1.9 Actividad de NADPH oxidasa

La actividad de esta enzima se cuantifico en el pelet del homogenado resuspendido con AFK 20 mM y tris al 5%; se realizaron dos tipos de mezclas para esta determinación la primera es una mezcla de reacción que contiene: EDTA 0.6 mM, NBT 0.75 mM, Na_2CO_3 , albumina bovina 0.1% y NADPH; la segunda mezcla contenía todo lo anterior excepto el NADPH; para la solución de reacción se tomaron 100 μ l y 10 μ l de muestra y para el inespecífico se tomaron 5 μ l de muestra y 100 de solución inespecífica inmediatamente después se midieron a 340 nm por 2 min cada 15 segundos; el NAPDH es el sustrato de la enzima de esta manera se lleva a cabo la reacción.

3.1.2 Lípidos oxidados

Se realizó por el método de del ácido Tiobarbitúrico, se basa en que alguno productos formados a consecuencia de la interacción de los radicales libres con moléculas celulares reaccionan con el TBA en condiciones de calentamiento y a pH bajo formando un cromógeno rosa. Se realizó una mezcla de TBA (TBA 25.32 mM, HCl 0.636 M, TCA 1487 M y DFO 1mM); se tomaron 10 μ l a las muestras y se le adicionaron 100 μ l de la mezcla de TBA y se agitaron en vortex. Se colocaron en un baño de ebullición durante 10 min y se midió la absorbencia a 532 nm.

3.1.3 Proteínas oxidadas

Se realizó por el método de cuantificación de carbonilos. Se realizó un tratamiento con sulfato de estreptomicina, a 50 μ l de muestra y después se colocan 66 μ l de sulfato de estreptomicina al 10% durante 24 horas a 4°C, se centrifugaron las muestras a 5000 rpm durante 10 min a 4°C. Se continuó con dos tubos, un blanco y otro la muestra; el blanco contenía 50 μ l de muestra y 200 μ l de HCl 2.5 mM; el tubo problema contenía 50 μ l de muestra y 200 μ l de DNPH 10 mM; se agitaron en vortex y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h en oscuridad. Transcurrido el tiempo se adicionaron 150 μ l de TCA al 20% se agitó en vortex e incubó a 4°C por 10 min, posteriormente se centrifugó durante 10 min a 4°C a 5000 rpm inmediatamente después se decantó el sobrenadante. El botón se resuspendió con 200 μ l de TCA al 10% a temperatura ambiente, inmediatamente después se centrifugó durante 10 min a 5000 rpm a 4°C. Una vez más se decantó el sobrenadante, se realizó un lavado con etanol-acetato de etilo 100 μ l, se centrifugó durante 10 min a 5000 rpm a 4°C, inmediatamente después se decantó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 500 μ l de guanidina. Se calibra con guanidina y se realizaron lecturas a 370 nm y a 280 nm. Se determinó la concentración de carbonilos con una curva de albúmina en guanidina 6 M.

4. Cortes histológicos

La papila de la encía se fijó en 500 μ l de formol al 10% en amortiguador de fosfatos salino (PBS) por 24 h y posteriormente se deshidrataron con 3 lavados de etanol absoluto de 1 h cada uno. Posteriormente, se trataron con tres lavados de xilol y luego con 3 lavados de parafina fundida a 60°C, las muestras se colocaron por separado en moldes para su inclusión en parafina. Una vez fría la parafina el bloque se desmoldo y se procedió a realizar cortes de 4 a 5 μ m con un citocromo de rotación Leica RM 2145. previamente se prepararon porta objetos esmerilados con una solución de γ -metacrillixipropiltrimetoxisilano (silano) al 5% en acetona. Se sumergieron 5 min en dicha solución y se dejaron secar por 12 h. Los cortes se colocaron en los portaobjetos silanizados y se incubaron por 15 min a 60°C, al finalizar este tiempo las muestras están listas para una tinción de hematoxilina y eosina (H&E) o una inmunohistoquímica.

4.1 Tinción de Hematoxilina y Eosina

Los cortes histológicos se desparafinarán con 3 lavados de 5 min de xilol y se rehidrataron con 3 lavados de 5 minutos de alcohol a concentraciones decrecientes hasta llegar a agua. Se tiñeron los tejidos con hematoxilina durante 5 min, se lavaron con agua y con una solución de HCl 1% en etanol al 70%. Luego se viro la hematoxilina con LiCO_3 al 0.1% y se tiñeron con eosina durante 15 segundos y se lavaron con lavados breves de etanol absoluto. Finalmente, los cortes ya teñidos se deshidrataron pasándolos por soluciones de etanol y xilol; se montaron para su observación con una resina soluble en xilol y un cubreobjetos esta tinción se utiliza para observar estructuras del tejido, la hematoxilina, tiñe de morado los núcleos y la eosina tiñe el citoplasma y las membranas de rosa.

4.2 Inmunohistoquímica

A partir de los cortes de encía previamente desparafinados e hidratados, se bloquearon los tejidos con albúmina sérica bovina al 3% por 30 min. Los tejidos se incubaron con un anticuerpo policlonal anti-CAT, anti SOD, anti- GPx, anti-NADPHoxidasas hechos en conejo; según sea el caso, diluido en 1:500 en albumina sérica bovina al 1% durante toda la noche, los tejidos se lavaron con PBS y se incubaron por 1 hora con anticuerpo secundario se utilizó una dilución 1:700 y al final de la incubación se lavaron los tejidos. Se reveló con 3,3'-diaminobencidina y los tejidos se contrastaron con hematoxilina. Los cortes se deshidrataron pasándolos por soluciones de etanol y xilol y se montaron para su observación con una resina soluble en xilol y un cubreobjetos. La reacción positiva se hizo evidente por una tinción café.

5. Análisis estadístico

Los datos se analizaron con el programa Prism 3.02 (Graph Pad, San Diego, EUA) mediante ANOVA y comparaciones múltiples de Dunnett. Un valor $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

IX. RESULTADOS.

1. Determinación del ensayo

La encía de las ratas se extrajo y se expusieron a diferentes concentraciones de nicotina para determinar el ensayo (la concentración y el tiempo de exposición); para ello se midieron las especies reactivas: $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 y $\bullet OH$, en cada grupo y se graficaron para tomar el modelo más adecuado (Figura 1). Además se adicionó un grupo como control de daño con dicromato de potasio (DCrK) a una concentración de 100 μM .

Se evaluó el tejido expuesto por 2 y 3 h a las concentraciones de 0.000005 mM hasta 50 mM. En el tiempo de 2 h no hay cambios importantes en las concentraciones de especies reactivas de oxígeno respecto al control en ninguna de las concentraciones. En los grupos de 3 h y concentraciones de 0.05 μM y 0.5 μM , observamos aumento del anión superóxido (figura 1A), del radical hidroxilo (figura 1C) y peróxido de hidrógeno (figura 1B).

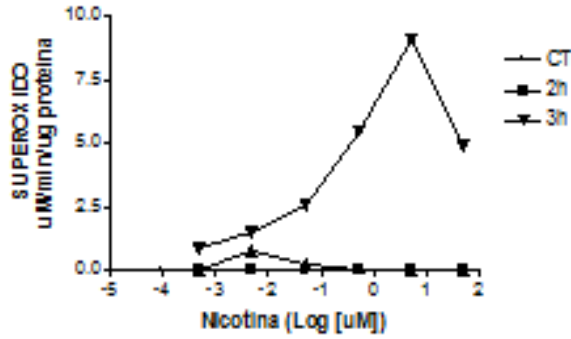
2. Especies reactivas de oxígeno

Se determinaron 3 especies reactivas $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 y $\bullet OH$. El $O_2^{\bullet-}$ se midió con el método de reducción de NBT. La cantidad de $O_2^{\bullet-}$ aumentó en el tejido conforme la concentración de nicotina aumentaba (ANOVA $P < 0.0001$; Dunnett * $P < 0.001$), siendo diferentes todos los grupos con respecto al control (Figura 2 A).

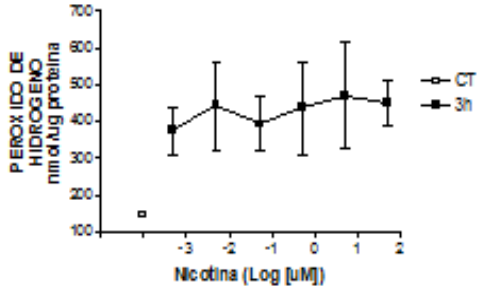
El H_2O_2 se midió con el método de FOX. En la encía expuesta a nicotina hubo diferencias entre los grupos con respecto al grupo control; y la tendencia que mantenía el peróxido de hidrógeno era aumentar conforme aumentaba la concentración de nicotina. (ANOVA $P < 0.0001$; Dunnett * $P < 0.001$) (Figura 2B).

El $\bullet OH$ se midió con el método de ácido tiobarbitúrico. La cantidad de $\bullet OH$ producido por la encía expuesta a nicotina presentó un comportamiento semejante, es decir aumentó al aumentar la concentración de nicotina siendo diferente con respecto al grupo control (ANOVA $P < 0.0001$; Dunnett * $P < 0.001$) (Figura 2C).

A



B



C

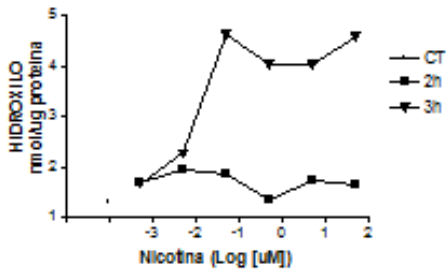
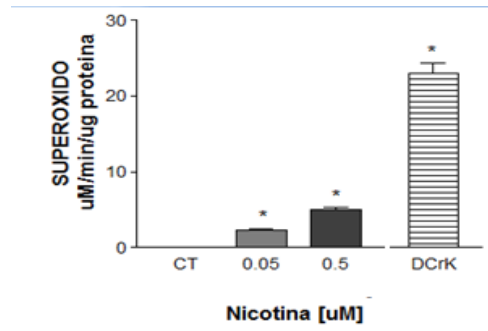
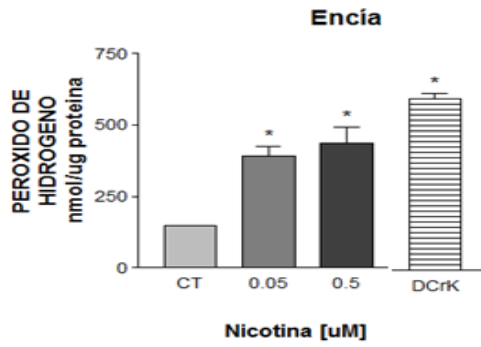


Figura 1. Encía de rata expuesta a nicotina por 2 y 3 horas, con diferentes concentraciones de nicotina, para determinar el ensayo de estudio. (A) anión superóxido, (B) peróxido de hidrógeno y (C) radical hidroxilo, CT – grupo control; 2h – dos horas de incubación, 3h – tres horas de incubación. Prom±EE, n=3.

A



B



C

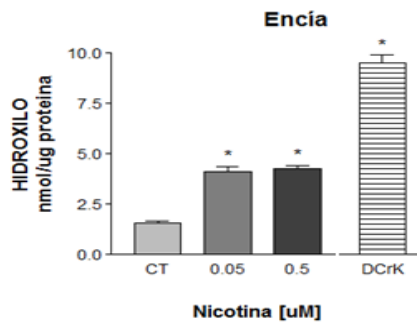


Figura 2. Especies reactivas de oxígeno en encía de rata expuesta a nicotina por 3h. (A) Anión superóxido, (B) Peróxido de hidrógeno, (C) Radical hidroxilo. CT: control; DCrK: dicromato de potasio 100uM. Prom±EE, n=3. ANOVA $P < 0.0001$; Dunnett * $P < 0.001$.

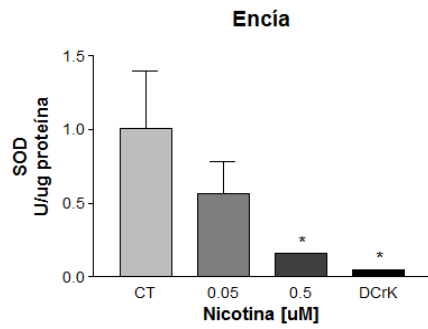
3. Actividad de enzimas antioxidantes.

Se determinaron las actividades de 3 enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx. La actividad de SOD se determinó por el método de disminución de NBT. El NBT es reducido por el $O_2^{\bullet-}$ y se convierte en formazan de NBT, las sales de tetrazolio son indicadores coloridos muy sensibles a reacciones enzimáticas. La actividad de la enzima SOD disminuye respecto al control en relación al aumento de concentración de nicotina siendo más evidente en los grupos de 0.5 μ M y de DCrK (ANOVA $P < 0.05$; Dunnett * $P < 0.05$) (Figura 3 A).

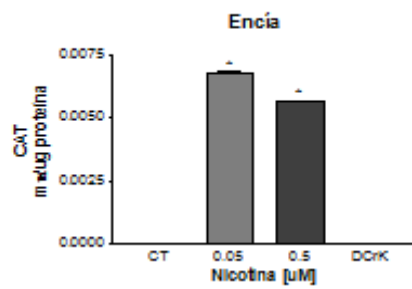
La actividad de la enzima catalasa se determinó mediante el método Aebi, donde el peróxido de hidrógeno, sustrato de la catalasa absorbe a 255 nm. La actividad de esta enzima en el grupo control no es perceptible y aumentó en los grupos expuestos a 0.05 y 0.5 μ M de nicotina y en el grupo de DCrK no se observó su actividad. (ANOVA $P < 0.05$; Dunnett * $P < 0.05$ vs. CT) (Figura 3B).

La actividad de la enzima GPx se determinó por el método de Lawrence y Burk; el ensayo se basa en la disminución de la densidad óptica producido por el consumo de NADPH en la reacción de regeneración de GSH. La actividad de GPx disminuye en los grupos de 0.05 y 0.5 μ M de [Nic] respecto al grupo control (ANOVA $P < 0.05$; * $P < 0.05$ vs. CT) (Figura 3C).

A



B



C

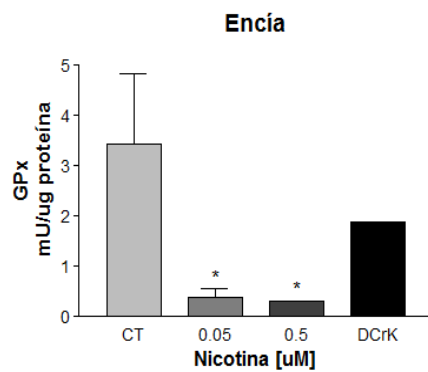


Figura 3. Actividad de enzimas antioxidantes de encía de rata expuesta a nicotina por 3h. (A) Actividad de la enzima SOD, (B) Actividad de enzima CAT y (C) Actividad de enzima GPx. CT: control; DCrK: dicromato de potasio 100 μ M. ANOVA $P < 0.05$; * $P < 0.05$ vs. CT.

4. Actividad de enzimas pro-oxidantes

Se determinó la actividad enzimática de 2 enzimas pro-oxidantes xantina oxidasa y NADPHoxidasa. La enzima de la Xantina oxidasa se midió mediante la oxidación del NBT y la presencia de xantina; se utilizó una reacción blanco para evaluar la reducción no dependiente de xantina. La actividad de la Xantina oxidasa aumenta con respecto al grupo control en el grupo expuesto a 0.5 uM de nicotina y en el de DCrK (ANOVA $P < 0.05$; Dunnett* $P < 0.05$) (Figura 4A).

La actividad de la enzima NADPH oxidasa aumenta en el grupo expuesto con 0.05 uM de concentración de nicotina mostrando una diferencia significativa con respecto al control (ANOVA $P < 0.05$; Dunnett * $P < 0.05$ vs. CT) (Figura 4B).

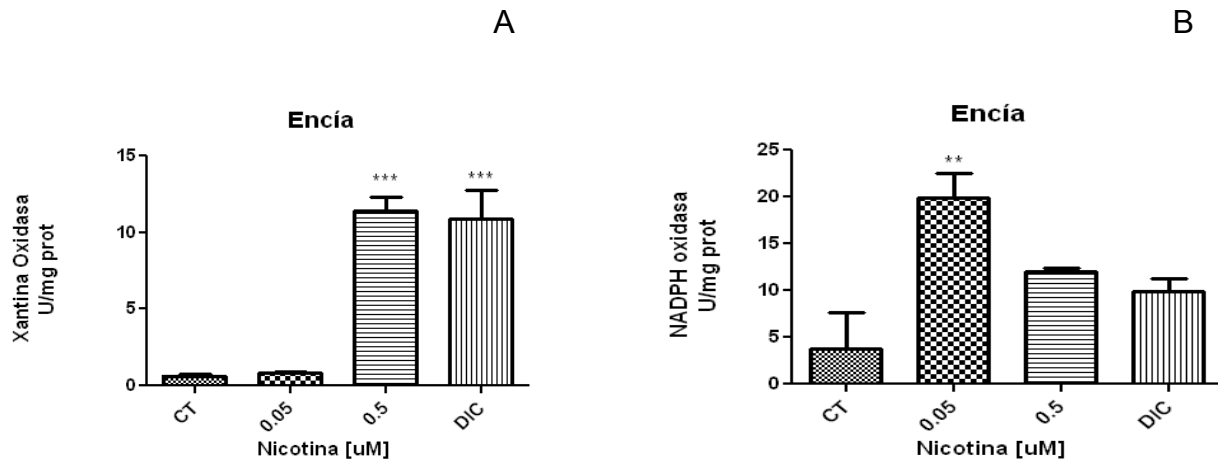
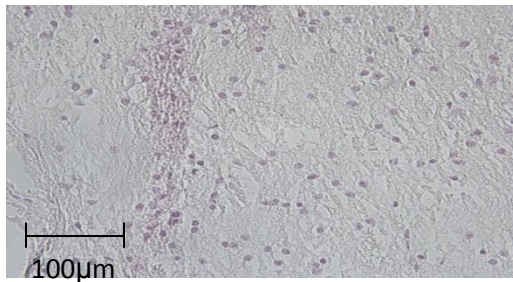


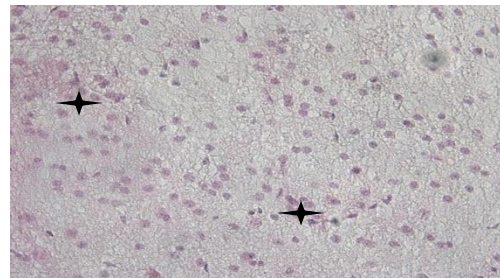
Figura 4.. Actividad de enzimas pro-oxidantes de encía de rata expuesta a nicotina por 3h. (A) actividad de la enzima Xantina Oxidasa, (B) actividad de la enzima NADPHoxidasa. CT: control; DCrK: dicromato de potasio 100uM. ANOVA $P < 0.05$; Dunnett * $P < 0.05$.

5. Tinción de hematoxilina y eosina (H&E)

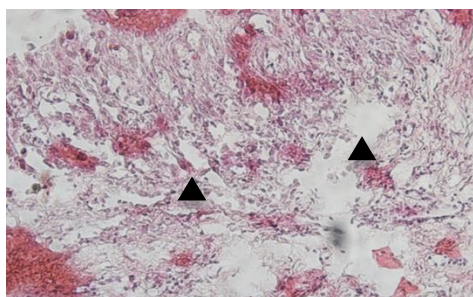
Se realizaron estudios histológicos para determinar el daño estructural de la encía (Figura 5). Se realizó la tinción de H&E y se tomaron micrografías a 200X. Se observó el cambio estructural conforme la concentración de nicotina aumentaba. Se encontró presencia de tejido dañado, fibras de colágeno más laxas y presencia de células polimorfonucleares (Figura 5).



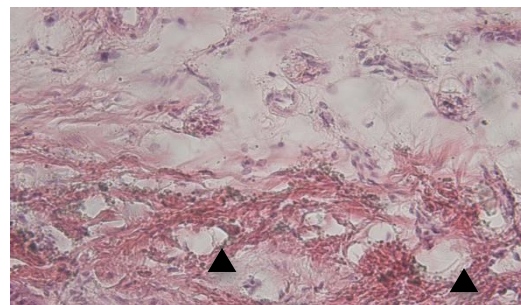
(A)



(B)



(C)

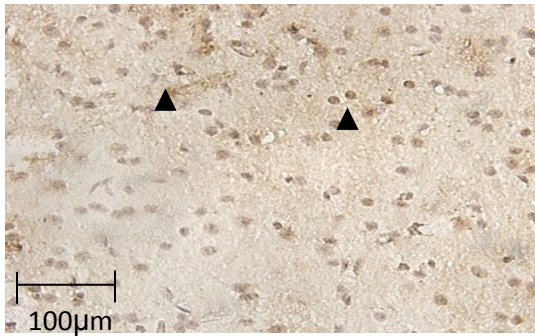


(D)

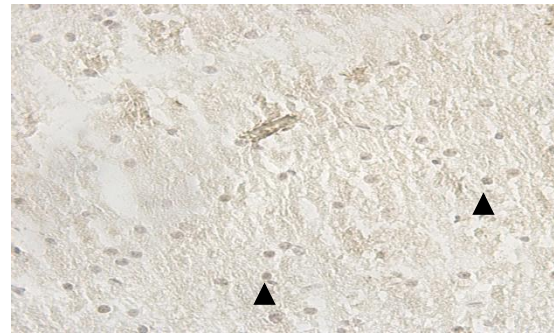
Figura 5. Estudio histológico de la encía de rata expuesta a nicotina y DCrK por 3h. Tinción con Hematoxilina y Eosina (H&E). 200X (A) Control. (B) Encía de rata expuesta a [0.05μM] de nicotina. (C) encía de rata expuesta a [0.5 μM] de nicotina. (D) Encía de rata expuesta a [100 μM] de DCrK. Se observa tejido desorganizado (▲) células polimorfonucleares (→).

6. Inmunohistoquímica

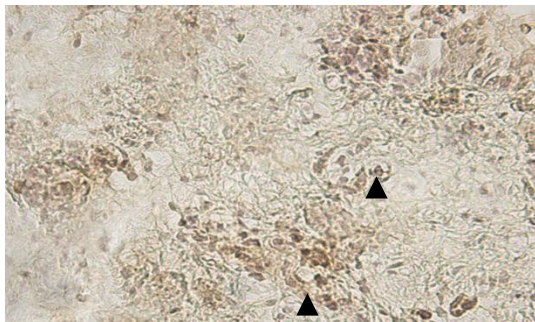
Se observó la inducción de las enzimas SOD (Figuras 6 y 7), CAT (Figuras 8), GPx (Figuras 9) y NADPH oxidasa (Figuras 10) en la encía expuesta a las diferentes concentraciones de nicotina y 100 uM de DCrK; y se tomaron micrografías representativas de cada una de ellas a 200X.



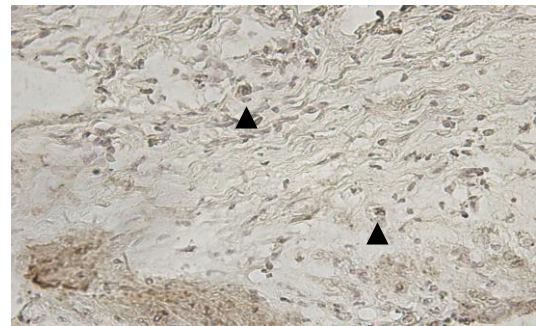
(A)



(B)

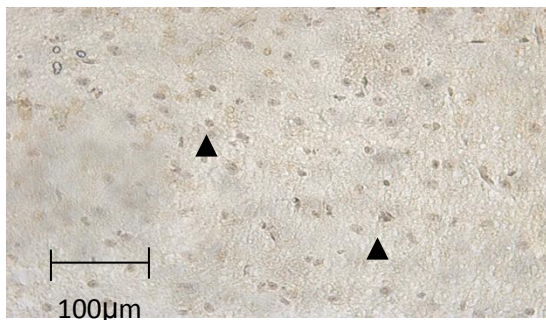


(C)

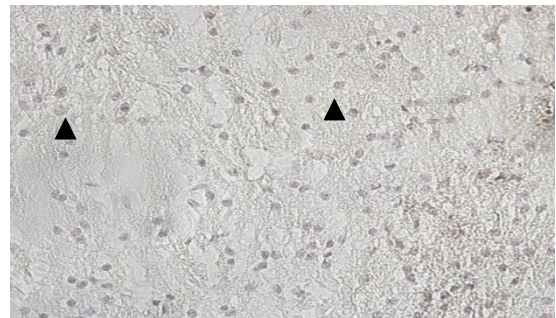


(D)

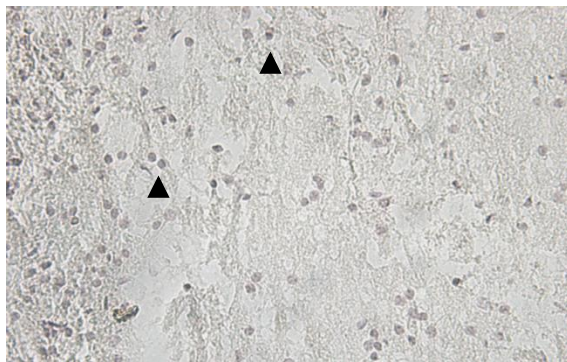
Figura 6. Inmunohistoquímica para Cu-Zn SOD. 200X. Tinción positiva (▲). (A) Control. (B) Encía de rata expuesta a [0.05µM] de nicotina. (C) encía de rata expuesta a [0.5 µM] de nicotina. (D) Encía de rata expuesta a [100 µM] de DCrK.



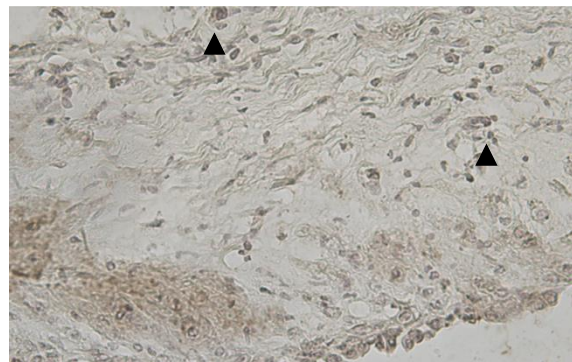
(A)



(B)

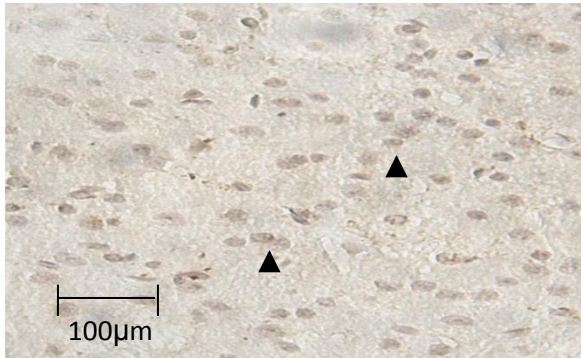


(C)

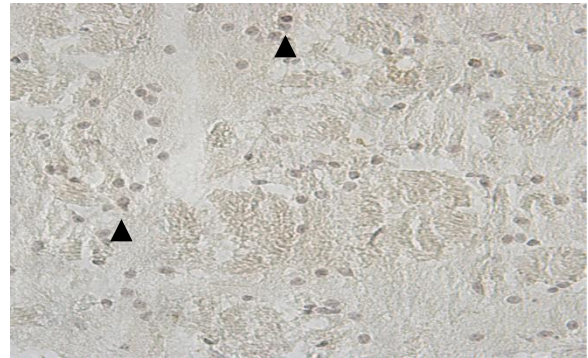


(D)

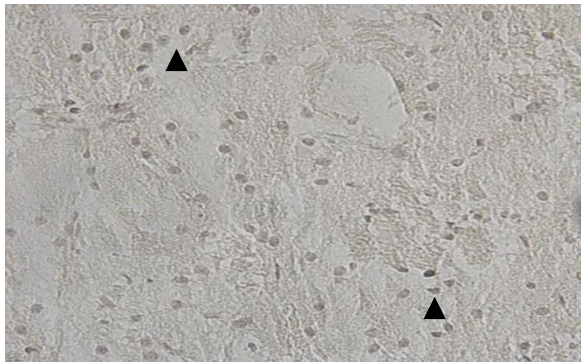
Figura 7. Inmunohistoquímica para Mn SOD. 200X. Tinción positiva (▲). (A) Control. (B) Encía de rata expuesta a [0.05µM] de nicotina. (C) encía de rata expuesta a [0.5 µM] de nicotina. (D) Encía de rata expuesta a [100 µM] de DCrK.



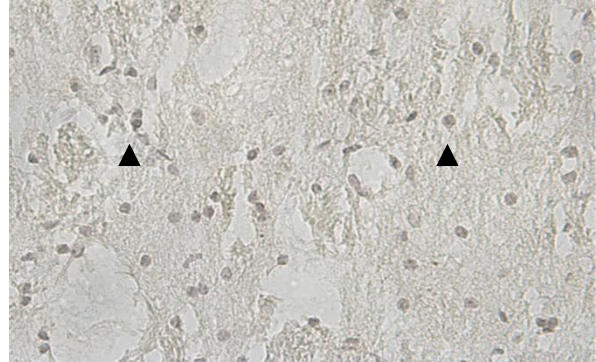
(A)



(B)

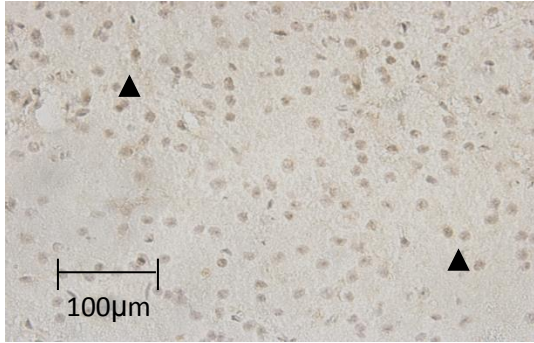


(C)

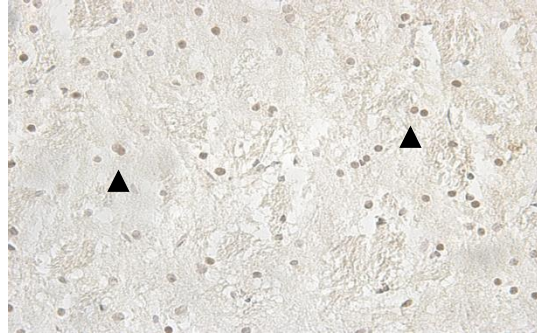


(D)

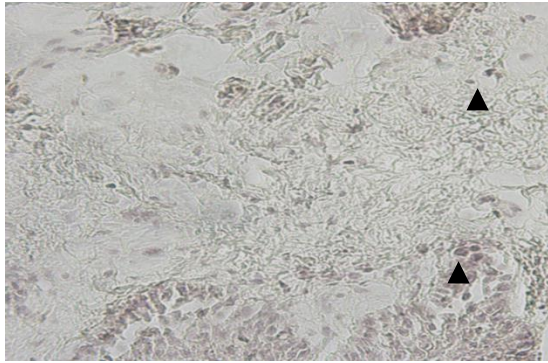
Figura 8. Inmunohistoquímica para CAT. 200X. Tinción positiva (▲). (A) Control. (B) Encía de rata expuesta a [0.05 μM] de nicotina. (C) encía de rata expuesta a [0.5 μM] de nicotina. (D) Encía de rata expuesta a [100 μM] de DCrK.



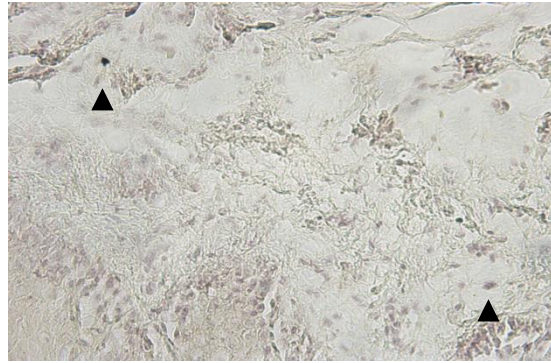
(A)



(B)

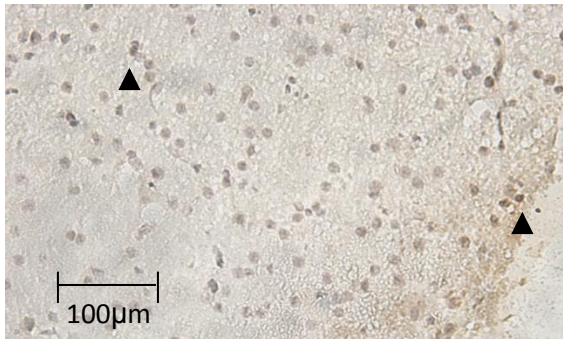


(C)

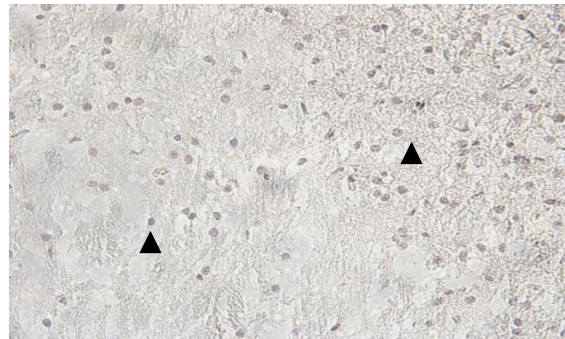


(D)

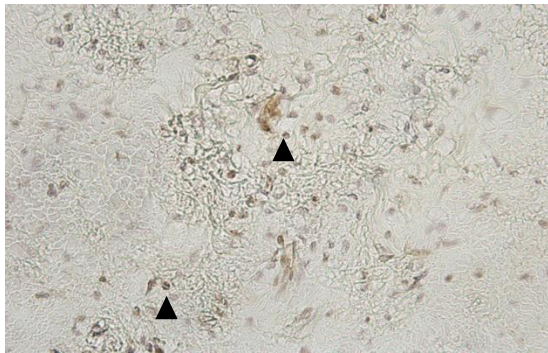
Figura 9. Inmunohistoquímica para GPx. 200X. Tinción positiva (▲). (A) Control. (B) Encía de rata expuesta a [0.05 μ M] de nicotina. (C) encía de rata expuesta a [0.5 μ M] de nicotina. (D) Encía de rata expuesta a [100 μ M] de DCrK.



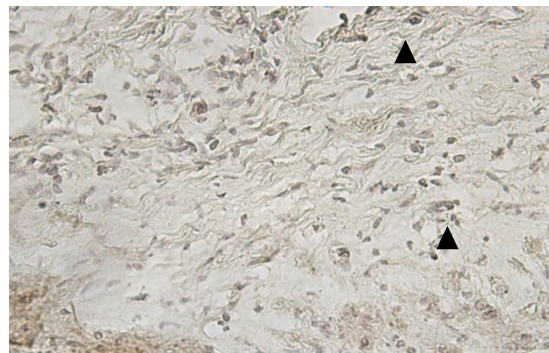
(A)



(B)



(C)



(D)

Figura 10. Inmunohistoquímica para NADPHoxidasa. 200X. Tinción positiva (▲). (A) Control. (B) Encía de rata expuesta a [0.05μM] de nicotina. (C) encía de rata expuesta a [0.5 μM] de nicotina. (D) Encía de rata expuesta a [100 μM] de DCrK.

7. Marcadores de daño por estrés oxidante

Se evaluaron 2 marcadores de daño por estrés oxidante: lípidos oxidados y proteínas oxidadas. El método de ácido tiobarbitútrico (TBA) se basa en que algunos productos de la lipoperoxidación pueden reaccionar con el TBA en ebullición y a pH bajo formando un cromógeno rosa. Los resultados obtenidos muestran que la oxidación lipídica aumenta con respecto al grupo control dependiente de la concentración de nicotina en los grupos 0.05, 0.5 uM y DCrK (ANOVA $p < 0.05$; Dunnett * $p < 0.05$) (Figura 11 A).

La evaluación de proteínas oxidadas se realizó por el método de contenido de carbonilos. Los carbonilos son producidos en las cadenas laterales de los aminoácidos, especialmente en los residuos de prolina, arginina, lisina y treonina los cuales son oxidados a derivados aldehídos o cetonas. Este tipo de modificaciones se producen habitualmente por el ataque del radical hidroxilo. El contenido de carbonilos aumento en los grupos de 0.5 uM y DCrK con respecto al grupo control (ANOVA $P < 0.05$; Dunnett * $P < 0.05$) (Figura 11B).

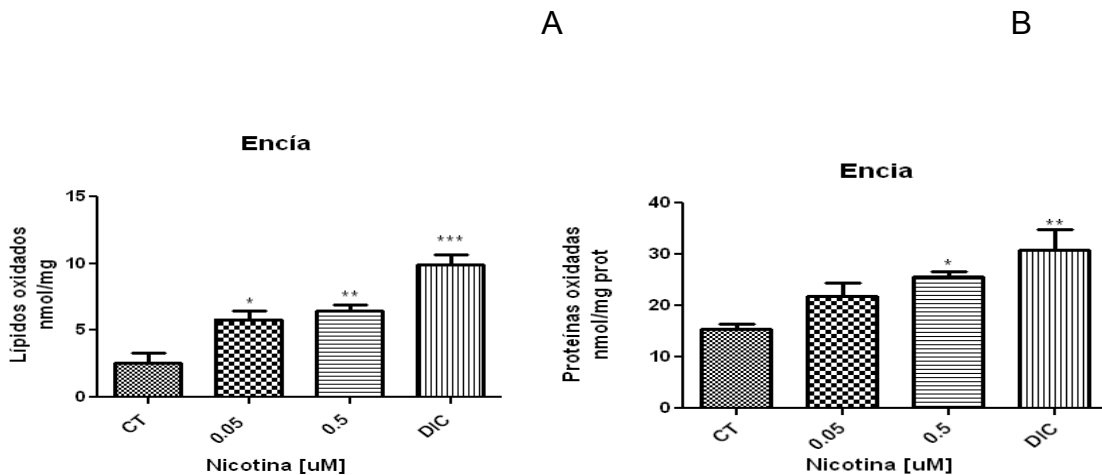


Figura 11. Encía de rata expuesta a nicotina por 3h. CT: control; DCrK : dicromato de potasio 100uM. ANOVA $P < 0.05$; * $P < 0.05$ vs. CT. (A) Oxidación de lípidos, (B) Oxidación de proteínas.

X. DISCUSIÓN

En esta tesis se buscó establecer un modelo para imitar las condiciones de la encía de un fumador leve a moderado. Se utilizó el dicromato de potasio como control de daño para comparar su efecto al generar estrés oxidante.

Las concentraciones que se evaluaron de nicotina son superiores a las encontradas en tejido de fumadores, sin embargo, este es un modelo ex – vivo de encía por lo que solo se consiguen tiempos cortos de exposición y se comenzó con concentraciones altas del tóxico. Las concentraciones de 0.05 mM y 0.5 mM se eligieron debido a que se encontró; que a esta toxicidad la concentración de las especies reactivas evaluadas ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 y $\bullet OH$) mostraron un aumento significativo en su producción.

La nicotina es un compuesto tóxico muy potente que en lapsos cortos de tiempo logró que la concentración de radicales libres como son: $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 y $\bullet OH$ aumentaran hasta diez veces; y su incremento de las 3 ERO fue conforme la concentración de nicotina aumentaba. Las 3 ERO mostraron este mismo patrón y esto puede ser debido a que los sistemas pro-oxidante y antioxidante se han modificado.

El aumento de las concentraciones de $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 y $\bullet OH$ puede ocasionar que se presenten alteraciones en las células del tejido y provocar la muerte, generando daño funcional y estructural irreversible. Estos resultados son apoyados con los obtenidos por Graziano Colombo et., al (2012) que observó que en fibroblastos de encía humana expuestos a humo de cigarro había estrés generado por ERO.

Los métodos que existen para determinar ERO no son determinantes, es decir algunos de ellos no evalúan una sola especie reactiva sino un conjunto de ellas. Aunque hay métodos semi-específicos, algunos de ellos no se pueden llevar a cabo en muestras biológicas. Las ERO son moléculas altamente reactivas que son capaces de reaccionar en cuestión de segundos y nanosegundos; y otras son captadas por el complejo sistema antioxidante de la célula, lo que hace difícil su medición.

Las enzimas antioxidantes evaluadas SOD, CAT y GPx; mostraron un cambio significativo en su actividad. Tomando en cuenta que el sustrato de la enzima SOD es el anión superóxido y observando su comportamiento, se puede dilucidar que la enzima SOD disminuye su actividad conforme la concentración de nicotina aumenta, es decir, es inhibida. Existen reportes en los que el comportamiento de SOD disminuyó en sangre de pacientes fumadores; sin embargo en el tejido gingival no fue significativo (Grang et al., 2006). Este patrón en la actividad disminuida también se presentó en la enzima GPx; sin embargo la enzima CAT aumentó su actividad lo que indica que esta enzima es inducida por la presencia de la nicotina y esto se puede explicar por el aumento paulatino del peróxido de hidrógeno el sustrato de esta enzima; al generarse estrés la enzima CAT es muy sensible a este estado, lo que explica el aumento en su actividad; estos datos concuerdan con los experimentos realizados en pacientes fumadores tanto en la encía como en la sangre (Grang et al., 2006). Otras investigaciones observaron que la enzima hemoxigenasa-1 es inducida en fibroblastos de encía humana y en queratinocitos (Hwa-Jeong et al., 2005) expuestos a nicotina, y que esta enzima puede estar sobre expresada en tejido gingival de fumadores (Chang Y-C et., al, 2005).

Las microfotografías obtenidas de los estudios histológicos permitieron establecer que la toxicidad por nicotina en la encía de rata induce el daño estructural en lapsos cortos de tiempo; las muestras control no se observó daño aparente, sin embargo en las concentraciones más elevadas había poca continuidad del tejido y presencia de células

polimorfonucleares, las cuales indican presencia de un proceso inflamatorio. A medida que la toxicidad era mayor el tejido estaba más desorganizado y la cantidad de células presentes era menor estos resultados concuerdan con lo obtenidos por Kang et al., (2011) que refiere que la exposición a nicotina reduce la viabilidad celular de los fibroblastos de encía humana. Estas observaciones histológicas son complementarias a los datos obtenidos de los marcadores de estrés.

Las enzimas pro-oxidantes evaluadas fueron XO y NADPH oxidasa, estas enzimas son generadoras de ERO, principalmente activas ante la presencia de un agente inductor. La encía presentó una mayor actividad de Xantina oxidasa a una concentración de 0.5 uM de nicotina; por otro lado la enzima NADPH oxidasa mostró una mayor actividad a una concentración de 0.05 uM de nicotina, lo que nos indica que estas enzimas son inducidas por la presencia de la nicotina. Sin embargo, la diferencia que hay en la actividad de cada una de ellas en respuesta a diferentes concentraciones de nicotina nos podrían hablar de diferente sensibilidad de ambas para responder a la toxicidad por nicotina.

En otros modelos tanto *in vitro* como *in vivo* que se han realizado asociados al cigarro o a la nicotina, no se han evaluado ambos marcadores, o se opta por evaluar daño al DNA por estrés, en donde se ha observado que a concentraciones de 1 μ M el daño al DNA es crítico para la viabilidad celular (Argentin y Cicchetti, 2003); o se elige uno de los antes ya mencionados. Sin embargo, nosotros evaluamos proteínas oxidadas y lípidos oxidados, observando que el daño por estrés también ocurre en las proteínas. El daño ocasionado por el desbalance redox debido a la presencia de la nicotina estableció daño lipídico y este fue aumentando de acuerdo al aumento de la concentración de nicotina, lo que es acorde con lo reportado por Grang en donde los niveles de lipoperoxidación eran elevados en comparación con su grupo control de personas no fumadoras; tanto en encía como en sangre (Grang et al., 2006). De igual forma la oxidación de proteínas fue aumentando dependiente de la concentración de nicotina. Esto nos sugiere que el daño estructural observado en la histología es debido al desbalance redox, es decir a la presencia de estrés oxidante, la pobre presencia de células en concentraciones más elevadas de nicotina nos sugiere que los lípidos son

un blanco idóneo para los radicales libres, principalmente para el radical hidroxilo, generando poros en la membrana lipídica de la célula y provocando un desbalance osmótico que muy probablemente lleve a la muerte celular. En encía expuesta a nicotina 0.05 uM encontramos presencia de células inflamatorias, o inflamación, esto puede ser debido a que la lipoperoxidación genera radicales lipoperóxilos los cuales pueden generar endoperoxidos cíclicos, los cuales constituyen el punto de partida de alguna prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos.

La presencia de proteínas oxidadas nos sugiere un daño irreversible tanto funcional como estructural. Una proteína que es modificada en alguno de sus aminoácidos, tiene un cambio estructural y esto a su vez se ve reflejado con pérdida de función, el colágeno es una proteína estructural que está presente en la encía principalmente tipo I. Un cambio o modificación por oxidación nos sugeriría un desorganización importante del tejido, como se ve reflejado en las microfotografías a concentraciones a partir de 0.05 [Nic] uM, 0.5 [Nic] uM y 100 uM de DCrK.

Diversas investigaciones concluyen en el efecto tóxico que la nicotina infiere ya sea sobre el tejido gingival o en fibroblastos de encía humana. Ya sea provocando apoptosis por la activación de P38 y estimulando la apoptosis por la activación CASp3 (Kang et al., 2011); también se ha establecido que hay un agotamiento de GSH y que este podría ser un mecanismos de citotoxicidad inducida por el humo de cigarro (Graziano Colombo et al., 2012). Sistémicamente se ha evaluado el efecto crónico de la administración de nicotina libre de humo y se ha observado que este causa estrés oxidante en el endotelio debido al aumento de anión superóxido (Shimosato et al., 2011). Las investigaciones realizadas por diversos métodos concluyen que la nicotina aumenta la concentración de ERO y que este a su vez causa estrés oxidante.

Determinar los sistemas oxidantes, antioxidantes y pro-oxidantes en un sistema *in vivo* es muy importante ya que la mayoría que son referentes a tejidos bucales se lleva acabo *in vitro*, los tejidos y órganos de rata han sido utilizados como modelo de estudio en diversas investigaciones teniendo resultados satisfactorios y de provecho para la ciencia. Los resultados obtenidos del estudio de la encía de rata en esta investigación proporcionaron datos interesantes relacionados con el comportamiento de esta,

sometida a estrés por nicotina, sin embargo fue necesario realizar los experimentos ex vivo, lo que es una limitante ya que el tiempo de exposición fue muy corto; sin embargo diversos autores refieren que la ratas al ser inyectadas con nicotina no muestran cambios estructurales ni funcionales en la encía; y que además sería factible realizar más experimentos en modelos murinos relacionados al estrés oxidante y el hábito de fumar (Milanezi de Almeida et al., 2011).

La nicotina es un agente deletéreo muy potente y el único que causa dependencia de los 4500 componentes del humo del cigarro, si bien se ha caracterizado que el humo de cigarro es una fuente importante ERO, en este estudio solo se utilizó la nicotina ya que es uno de los componentes más tóxicos y que se encuentra en más abundancia.

Los resultados mostrados en esta investigación muestran un panorama importante de lo que sucede a la encía en un modelo murino cuando es expuesta a la nicotina, sería importante evaluar estos mismos parámetros pero con la administración previa de un antioxidante que sea capaz de generar un efecto protector sin interferir con la función de los componentes de este tejido.

XI. CONCLUSIONES

La nicotina es capaz de cambiar los sistemas pro-oxidantes y antioxidantes en la encía de rata expuesta a este tóxico en concentraciones moderadas. En lapsos cortos de tiempo (3h), se observó que los radicales libres como el anión superóxido, peróxido de hidrógeno e hidroxilo aumentaron hasta 10 veces su producción; por lo tanto se genera un desequilibrio evidente en los sistemas pro-oxidantes y antioxidantes en la encía de rata. Las enzimas antioxidantes como SOD y GPx son inhibidas en la encía de rata; y la catalasa es inducida. Las enzimas pro-oxidantes como XO y NADPH oxidasa, son inducidas. El daño provocado a los lípidos (lipoperoxidación) y las proteínas (oxidación de proteínas) es debido al desbalance redox y dependiente de la concentración de nicotina. Estos resultados concuerdan con las micrografías de tejido, en donde se

puede observar el daño estructural causado por la nicotina en las concentraciones de 0.05, 0.5 y 100 de dicromato de potasio.

XII. BIBLIOGRAFÍA

Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer [IARC] (2004).

Ames BN. (1999). Micronutrient deficiencies. A major cause of DNA damage. *Ann NY Acad Sci* 889: 87–106.

Ames BN. (2001). DNA damage from micronutrient deficiencies is likely to be a major cause of cancer. *Mutat Res* 475: 7–20.

Apple FS, Hyde JE, Ingersoll-Stroubos AM, Theologies A. (1993). Geographic distribution of xantine oxidase, free radical scavengers, creatine kinase and lactate dehydrogenase enzyme systems in rat heart and skeletal muscle. *Am J Anat* 192:319-323.

Ashok S, Jayashree G, Pankaja N. (2012). Effect of Free Radicals & Antioxidants on Oxidative Stress. *J Dental & Allied Sci* 1(2):63-66.

Babior BM. (1997). Superoxide: a two-edged sword. *Bras J Biol Res.* 30(2): 141-55.

Barthomeuf CM, Debiton E, Barbakadze VV, Kemertelidze EP. (2001). Evaluation of the dietetic and therapeutic potential of high molecular weight hydroxycinnamate-derived polymer from *Symphytum asperum* Lepech. Regarding its antioxidant, antilipoperoxidant, antiinflammatory, and cytotoxic properties. *J Agric Food Chem* 49: 3942-3946.

Beneujee KK, Marimuthu P, Sarkar A, Chaudhuri RN. (1998). Influence of cigarette smoking on vitamin C, glutathione and lipid peroxidation status. *Indian J Public Health* 42(1):20-3.

Bergstrom J, Floderus Myrthed B. (1983). Co-twin control study of the relationship between smoking and some periodontal disease factors. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 11: 113-116.

Bergstrom J, Preber H. (1990). Effect of cigarette smoking on periodontal healing following surgical therapy. *J Dentistry* 5: 324-328.

Bhagwat SV, Vijayasathy C, Raza H, Mullick J, Avadhani NC. (1998). Preferential effects of nicotine and 4-(N-methyl-N-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone on mitochondrial glutathione S-transferase A4-4 induction and increased oxidative stress in the rat brain. *Biochem. Pharmacol.* 56, 831–839.

Boveris A, Oshino N, Chance B. (1972). The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* 128: 617-630.

Brigeliuus-Flohé R. (1999). Tissue specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med* 27: 951-965.

Brody AL, Mandelkern MA, London ED, Olmstead RE, Farahi J, Scheibal D, Jou J, Allen V, Tiongson E, Chefer SI, et al, (2006). Cigarette smoking saturates brain $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors. *Archiv General Psych.* 63(8):808–16.

Brunnemann KD, Fink W, Moser F. (1980). Analysis of volatile N-nitrosamines in mainstream and sidestream smoke from cigarettes by GLC-TEA. *Oncology* 37(4):217–22.

Brunnemann KD, Hoffmann D. (1975). Chemical studies on tobacco smoke. XXXIV: gas chromatographic determination of ammonia in cigarette and cigar smoke. *Journal of Chromatographic Science.* 13(4):159–63.

Cadenas E, Sies H. (1998). The lag phase. *Free Radic Res* 28: 601–609.

Calonius PEB. (1962). A cytological study on the variation of keratinization in the normal oral mucosa of young males. *J West Soc Periodontol* 10:69-74.

Chance B, Sies H, Boveris A. (1979). Hydrogen peroxide metabolism in mammalian organs *Physiol Rev* 59: 527-606.

Chang YC, Lai CC, Lin LF, Ni WF, Tsai CH. (2005). The up-regulation of heme oxygenase-1 expression in human gingival fibroblast stimulated with nicotine, *J periodont Res* 40:252-257.

Chang YC, Huang FM, Tai KW, Yang LC, Chou MY. (2002). Mechanisms of cytotoxicity of nicotine in human periodontal ligament fibroblast cultures in vitro. *J Periodontal Res* 37(4):279–85.

Charpie JR, Webb RC. (1993). Vascular myocyte-derived nitric oxide is an autocrine that limits vasoconstriction. *Biochem Biophys Res Commun* 194: 763-768.

Chaudhury S, Sarker PK. 1993. Stimulation of tubulin synthesis by thyroid hormone in the developing rat brain. *Biophys Acta* 763: 93-98.

Chung Ho YC, Chang YC. (2006). Regulation of nicotine-induced cyclooxygenase-2 protein expression in human gingival fibroblasts. *Acta, Pharmacol. Sin.* 27(4):409-13.

Clarke NG, Shephard BC, Hirsch RS (1981). The effects of intra-arterial epinephrine and nicotine on gingival circulation. *Oral Surg, Oral Med. Oral Pathol.* Dec; 52(6):577-82.

Comporti M. (1989). Three models of free radical-induced cell injury. *Chem Biol* 72: 1-56.

Crane FL, Sun IL, Clark MG, Grebing C, Low H. (1985). Transplasma-membrane redox systems in growth and development. *Biochim Biophys Acta* 811: 233-264.

Cross CE, Traber M, Eiserich T. (1999). Micronutrient antioxidants and smoking. *Br Med Bull* 55(3):691-709.

Cross AR, Segal AW. (2004). The NADPH oxidase of professional phagocytes prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochim Biophys Acta*, 1657: 1-22.

Davis KJ. (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *J Biol Chem* 262: 9895–9901

DeCoursey TE, y Ligeti E. (2005). Regulation and termination of NADPH oxidase activity. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 2173–2193.

Diaz A. Rangel W. (2001). Molecular and kinetic study of catalase-1, a durable large catalase of *Neurospora crassa*. *Free Rad Biol. Med.* 31: 1323-1333.

Dinger B, He L, Chen J, Liu X, Gonzalez C, Obeso A, Sanders K, Hoidal J, Stensaa L, Fidone S, (2007). The role of NADPH oxidase in carotid body arterial chemoreceptors. *Respire Physiol Neurobiol* 157: 45-54.

Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, Lipsky PE. (1998). Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 12: 1063–1073.

Duncan CJ, Rudge MF. (1988). Are lysosomal enzymes involved in rapid damage in vertebrate muscles? A study of separate pathways leading to cellular damage. *Cell Tissue Res* 253: 447-455.

Eley BM, M Soory, SD Manson. (2011). *Periodoncia* pp. 1-19. 6a ed. Ed. Elsevier.

Finkel T, Holbrook NJ. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408: 239-247

Finney LA, O'Halloran TV. (2003). Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors. *Science* 300: 931-936.

Freeman BD, Crapo JD. (1982). Biology of disease: Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47: 412-426.

Fridovich I. 1975. Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 44: 147-159.

Fridovich I. 1978. Superoxide dismutases. *Science* 201: 875-880.

Garg N R, Dixit J A, Tewari V. (2006). Levels of lipid peroxides and antioxidants in smokers and non smokers. *J Periodont Res*. 41: 405-410.

Gomes DA, Pires JR, Zuza EP, Muscara MN, Herrera BS, Spolidorio LC, Toledo BE, Spolidorio DM. (2009). Myeloperoxidase as inflammatory marker of periodontal disease: experimental study in rats. *Immunol Invest*. 2009;38(2):117-22.

Gómez ME FA, Campos M. (2010). *Histología, Embriología e Ingeniería de Tejidos Bucodentales*. 3ª ed. Editorial: Panamericana.

Gonzalez C, Agapito MT, Rucker A, Gonzalez-Martin MC, Vega-Agapito V, Gomez-Niño A, Rigual R, Castañeda J, Obeso A. (2007). Chemoreception in the context of the general biology of ROS. *Respir Physiol Neurobiol* 157: 30-44.

Graziano C, Dalle-Donne I, Orioli M, Giustarini D, Rossi R, Marco Cleric, Luca Regazzoni, Giancarlo Aldini, Aldo Milzani, D, Butterfield A, Gagliano N. (2012). Oxidative damage in human gingival fibroblasts exposed to cigarette smoke; *Free Radi Biol. Med*. 52: 1584–1596.

Gulesserian T, Engidawork E, Fountoulakis M. (2001). Antioxidant proteins in fetal brain: Superoxide dismutase-1 (SOD1) protein is not overexpressed in fetal Down syndrome. *J Neural Transm Suppl*, 61: 71-84.

Halliwell B. 1981_a in *Age Pigments* (Sohal, RS, ed.), pp 1-62, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.

Halliwell B, Gutteridge JM. (1986). Oxygen free radicals and iron relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arc Biochem Biophys*, 246:501-514.

Halliwell B, Aruoma OI. (1991). DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett* 251: 9-19.

Halliwell, Gutteridge JMC. (1992). Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update *FEBS Lett* 307: 108-112.

Halliwell B. Aruoma OI. (1992). DNA damage by oxygen-derived species: its mechanism, and measurement using chromatographic methods. En *Molecular biology of free radical scavenging systems*; Scandalios JG, Ed. CSHL: New York, pp23-27,47-58.

Halliwell B, Gutteridge JM. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*, third edition. Oxford University Press, Midsomer Norton, Avon, England.

Halliwell B, Gutteridge JMC. (1999). *Free radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed, Oxford University Press, New York.

Halliwell B. (2000). Why and how should we measure oxidative DNA damage in nutritional studies? How far have we come? *Am J Clin Nutr* 72: 1082–1087.

Hansberg W, de Groot H, Sies H. (1994). Reactive oxygen species associated with cell differentiation in *Neurospora crassa*. *Free Radic. Biol. Med.* 14:287-293.

Hansberg W. (2002). *Neurospora crassa* catalases, singlet oxygen and cell differentiation. *Biol. Chem.* 383:589-575.

Hansberg W. (1999). La biología del dioxígeno en singulete. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, FES Zaragoza, UNAM 2:47- 55.

Harrison R. (2002). Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic Biol Med*, 33: 774-797.

Harrison R. (2004). Physiological roles of xanthine oxidoreductase. *Drug Metab. Rev* 36: 363-375.

Heishma SJ, Taylor C, Henningfield JE. (1994). Nicotine and smoking: A review of effects on human performance. *Experimt Clinical Psychopharmacology*, 2(4): 345-395.

Henoinen IM, Mayer AS, Frankel EN. 1998. Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. *J Agric Food Chem* 46: 4107-4112.

Hille R. (2005). Molybdenum-containing hydroxylases. *Biochem Biophys* 433(1): 107-116.

Hiller R. (2006). Structure and function of xantine oxidase *European J of inorganic Che*, 1905-2095.

Hwa-Jeong Lee , Han-Young Guo, Sun-Kyung Lee, Byung-Hun Jeon, Chang-Duk Jun, Suk-Keun Lee, Myung-Hee Park, Eun-Cheol Kim. (2005). Effects of nicotine on proliferation, cell cycle, and differentiation in immortalized and malignant oral keratinocytes. *J Oral Phatol Med*. 34(7): 436-443.

International World Workshop in Clinical Periodontics 1999.

Jiang Z-Y, Hunt JV, Wolff SP. (1992). Ferrous ion oxidation in the presence of the xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide ion Low-density lipoprotein. *Anal Biochem* 202: 384-389.

Kang SW, Park HJ, Ban JY, Chung JH, Chun GS, Cho JO. (2011). Effects of nicotine on apoptosis in human gingival fibroblasts, archive. *Oral Boil*. 56: 1091 – 1097.

Kaufmann PA. (2000). Coronary heart disease in smokers: vitamin C restores coronary microcirculatory function. *Circulation*; 102(11):1233-8.

Klotz MG, Klassen GR y Loew PC. (1997). Physiogenetic relationships among prokaryotic and euj=kariotic catalases. *Mal. Biol Evol*. 14: 951-958.

Kohen R, Nyska A. (2002). Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicol Pathology*. 30: 620–650.

Kodama M, Kaneko M, Aida M, Inoua F, Nakajamat T. (1997) Free radical chemistry of cigarette smoke and its implications in human cancer. *Anticancer Res*; 17(1 A):433-7.

Konigsberg FM. (2008). Radicales libres y estrés oxidativo aplicaciones médicas. El manual moderno pp 169-181.

[Konopka T](#), [Król K](#), [Kopeć W](#). (2006). Influence of tobacco smoking and periodontitis on selected factors of oxidative stress. *Wiad Lek*; 59(7-8):463-70.

Lahmouzi, Jamila, Simain-sato, Franklim, Defrense, Marie- Paule et al. (2000). Effect of nicotin on rat gingival fibroblast *in vitro*. *Conenective tissue research*, 41(1), 69-80.

Laughlin MH, Simpson T, Sexton WL, Brown OR, Smith JK, Korthuis RJ. (1990). Skeletal muscle oxidative capacity, antioxidant enzymes and exercise training. *J Appl Physiol* 68: 2337-2344.

Lee HL, Halliwell B. (2001). Antioxidant & prooxidante habilities of foods and beverages *Methods Enzimol* 335: 181-190.

Lleidas Hansburg W y Rangel P. (1998). Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J Biol. Chem* 237: 10630-10637.

Lynch M, Kuramitsu H: Expression and role of superoxide distmutase (SOD) in pathogenic bacteria. *Microbes Infect*, 2: 1245-1255.

Marin J, Rodriguez-Martinez MA. (1995). Nitric oxide, oxygen-derived free radicals and vascular endothelium, *J Autom Pharmacol* 15: 279-307.

Marnett LJ, Plastaras JP. (2001). Endogenous DNA damage and mutation. *Trends in Genetics* 17:214-221.

Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini, C. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathionerelated enzymes. *J Nutr Biochem*, 16: 577–586.

Mates JM, Perez-Gomez C, Castro IN. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem.*, 32, 595–603.

Matesanz P, Matos R, Bascones A. (2008). Enfermedades gingivales: una revisión de la literatura. *Periodon Implantol.* 1: 11-25.

Maxwell SRJ. (1995) Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs* 49: 345-361.

McCutchan HJ, Schappach JR, Enquist EG, Walden DL, Terada LS, Reiss OK, Leff JA, Repine JE. (1990). Xantine oxidase-derived H_2O_2 contributes to reperfusion injury of ischemia skeletal muscle. *Am J Physiol* 258:H1415-H1419.

Meral A, Tuncel P, Surmen-Gur E, Ozbek R, Ozturk E, Gunay U. (2000). Lipid peroxidation and antioxidant status in beta-thalassemia. *Pediatr Hematol Oncol* 17: 687–693.

Milanezi de Almeida J, Basco AF, Bonfante S, Theodoro L. H, Nagata MJ, Garcia VG. (2011) Nicotin induced damage effects gingival fibroblast in the gingival tissue of rats. *J. Periodontology* 82(8) 1206-1211.

Miller D M, Aust S D, Buettner G R. (1990). Transition metals as catalysts of “autoxidation” reactions. *Free Radic. Biol. Med.*, 8: 95–108.

Mitchell D, Tyml K. (1996). Nitric oxide release in rat skeletal muscle capillary. *Am J Physiol* 270: H1696-H1703.

Mohazzab-H KM, Wolin MS. (1994). Sites of superoxide anion production detected by lucigenin in calf pulmonary artery smooth muscle. *Am J Physiol* 267: L815-L822.

Mujahid A, Akiba Y, Warden CH, Toyomizu M. (2007). Sequential changes in superoxide production, anion carriers and substrate oxidation in skeletal muscle mitochondria of heat-stressed chickens *FEBS Lett* 581:3461-3467.

Muller FL, Van Remmen H, Liu Y. (2004). Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.*, 279, 49064–49073.

Muraoka, Toshiaki, Miura (2004). Inhibition of xantine oxidase by phytic acid and its antioxidative action. *Life sciences* 1691-1700.

Murrant CL, Reid MB. (2001). Detection of reactive oxygen and reactive nitric species in skeletal muscle. *Microse Res, Tech.* 55: 236-248.

Nath KA, Norby SM. (2000). Reactive oxygen species and acute renal failure. *Am J Med* 109: 665-678.

Nourooz-Zadeh J, Wolff SP. (1994). Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. *Anal Biochem* 220: 403-409.

Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmandi J, Birlouez- Aragon I, Wolff SP. (1995). Measurement of hydroperoxides in edible oils the ferrous oxidation in xylenol orange assay *J Agric Food Chem* 43: 17-21.

Ohlric EJ, Cullinan MP, Seymour GJ. (2009). The immunopathogenesis of periodontal disease *Australian Dental J.* 542.

Okabe E, Kato Y, Kohno H, Hess ML, Ito H. (1985). Inhibition by free radical scavengers and by cyclooxygenase inhibitors of the effect of acidosis on calcium transport by masseter muscle sarcoplasmic reticulum. *Biochem Pharmacol* 34: 961-968.

Panus PC, Radi R, Chumley PH, Lillard RH, Freeman BA. (1993). Detection of H₂O₂ release from vascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 14: 217- 223.

Pitillo MR. (2000) Cigarette smoking, endothelial injury and cardiovascular disease. *Int J Exp Pathol*; 81(4):219-30.

Pleschke JM, Kleczkowska HE, Strohm M y Althaus FR (2000). Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins. *J. Biol Chem.* 275:40974-40980.

Pryor WA, Stone K. (1993). Oxidants in cigarette smoke: radicals hydrogen peroxides peroxyxynitrate and peroxyxynitrite. *Annals NY Acad Sci*; 686:12-28.

Rae, TD, Schmidt PJ, Pufahl R A, O'Halloran TV. (1999). Undetectable intracellular free copper: The requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science*, 284, 805–808.

Remacle J, Renard P. (1996). Role of oxidative stress in aging. *Path Biol* 44:65-76.

Riberia J, Marsal J, Casasovas A, Hulkkanen M, Tarabal O, Esquerda JE. (1998). Nitric oxide synthase in rat neuromuscular junctions and in nerve terminals of Torpedo electric organ: its role regulator of acetylcholine release. *J Neurosci Res* 51: 90-102.

Rice-Evans CA, Miller NJ. (1996). Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochem Soc Trans* 24: 790-795.

Rockville MD. (2010). How to tobacco smoke causes disease: The biology and behavioral basis for smoking-attributable disease. Department of Health and Human

ServicesCenters for Disease Control and Prevention National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion USA. pp 29-77

Rosen GM, Freeman BA. (1984). Detection of superoxide generated by endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci* 81: 7269-7273.

Sas K, Robotka H, Toldi J, Vécseci L. (2007). Mitochondria, metabolic disturbances oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorder *J Neurol Sci* 257: 221-239.

Satue-Garcia MT, Heinonen IM, Frankel EN. (1997). Anthocyanins as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome systems. *J Agric Food Chem* 45: 3362-3367.

Semlali A, Witoled C, Alanazi M, Rouabhia M. (2012). Whole cigarette smoke increased the expression of TLRs, HBDs, and proinflammatory cytokines by human gingivalepithelial cells through different signaling pathways. *J. Plos One* (12): e52614.

Shimosato T, Geddawy A, Tawa M, Imamura T, Okamura T. (2011). Chronic Administration of Nicotine-Free Cigarette Smoke Extract Impaired Endothelium-Dependent Vascular Relaxation in Rats via Increased Vascular Oxidative Stress. *J Pharmacol Sci* 118, 206 – 214

Souto GR, Segundo TK, Costa FO, Aguiar MC, Mesquita RA. (2006). Effect of smoking on Langerhans and dendritic cells in patients with chronic gingivitis. *J Periodontol*; 82(4):619-25.

Stadtman ER. (1986). Oxidation of proteins by mixed-function oxidation systems, implication in protein turnover, aging and neutrophil function. *Trends Biochem Sci* 11: 11–12.

Stamler JS, Jia L, Eu JP, McMahon TL, Demchenko IT, Bonaventura J, Gernert K, Paintadosi CA. (1997). Blood flow regulation by S-nitrosohaemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science* 276: 2034-2037.

Stocker A, Azzi A (2000). Tocopherol-binding proteins: Their function and physiological significance. *Antioxid Redox Signal* 2: 397–404

Suzuki K, Sato H, Kikuchi T, Abe T, Nakaji S, Sugawara K, Totsuka M, Sato K, Yamaya K. (1996). Capacity of circulating neutrophils to produce reactive oxygen species after exhaustive exercise. *J Appl Physiol* 81: 1213-1222.

Tang Bo, Zhang Li, Hua Ji-Xi Ping, Zhang Hui, Zhao Yan-Xiu. (2004). Indirect detection of superoxide anion radical in the plant of red sage based on vanillin-8-aminoquinoline with fluorescence. *Anal Chim Acta* 502: 125-131.

Taurang A. (1999). Molecular evolution of thyroid peroxidase. *Biol Che.* 81:557-562.

The American Academy of Periodontology. Proceedings of the World Workshop in Clinical Periodontics (1999). Chicago: The American Academy of Periodontology: I/23-I/24.

Vadea V, Doina PB, Amoreiri PC, Nica C, Bucor L. (2010). Salivary 8-hidroxi-2-deoxy guanosine as oxidative stress biomarker for the disgnosis of periodontal disease. *Farma* 58:660-670.

Valko, Moncol. (2007). Frees radicals and antioxidants in normal pphysiological functions and human disease. *The international J of Bioch. And Cell biology* 39: 44-84.

Van Klaveren RJ, Nemery B. (1999). Role of reactive oxygen species in occupational and enviromental obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Pulm Med*; 5(2):118-23.

Vizi-Adam V. (2005) Production of reactive oxygen species in brain mitochondria; contribution by electron transport chain and non electron transport chain sources antioxidant. *Red Sig*; 7: 1140-1149.

Wie W, Kinm Y. (1994). Boudreau S. Association of smoking with serum and dietary levels of antioxidants in adults. NHANES III. *Am J Public Health* 2001;91(2):258-64.

Wright SC, Zhong J, Zheng H, Larrick JW. (1993). Nicotine inhibition of apoptosis suggests a role in tumor promotion. *J FASEB*, 7: 1045-1051.

Wetscher GJ, Bagchi M, Bagchi D, Perdakis G, Hinder PR, Glaser K, Hinder RA. (1995). Free radical production in nicotine-treated pancreatic tissue. *Free Radic. Biol. Med.* 18, 877-882.

Yuldiz D. Ercal N., y Anstrong DW. (1998). Nicotin enantiomers and oxidative stress. Toxicology 130: 155-165.

