

---

## EFFECTO DEL PROPÓLEO SOBRE LOS NIVELES DE ÓXIDO NÍTRICO EN LA PERIODONTITIS CRÓNICA.

Nuvia Sánchez<sup>1</sup>; Reynaldo Ortiz<sup>2</sup>; Anajulia González<sup>3</sup>; Belkis Quiñonez<sup>4</sup>; Eduvigis Solórzano<sup>1</sup>.

1. Grupo de Investigaciones Biopatológicas. Laboratorio Integrado de Biología Celular y Molecular. Facultad de Odontología. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.
2. Laboratorio del Departamento de Química. Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.
3. Centro de Investigaciones Odontológicas Facultad de Odontología. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.
4. Facultad de Odontología. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.
5. Grupo de Investigaciones Biopatológicas. Laboratorio Integrado de Biología Celular y Molecular. Facultad de Odontología. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.

**Autor Corresponsal:** Facultad de Odontología, Calle 23 entre avenidas 2 y 3, edificio La Casona de La Sierra, Departamento de Biopatología. Universidad de Los Andes (ULA), Mérida-Venezuela. Teléfonos:+274-2402381,+274-2402383.

**Email:** nuviasan@ula.ve, eduvigis@ula.ve.

## RESUMEN

El óxido nítrico (NO) es un gas de fácil difusión, con características de radical libre que participa en la etiopatogenia de ciertas enfermedades crónicas de la cavidad bucal como la enfermedad periodontal, cuya forma más frecuente es la periodontitis crónica asociada a placa bacteriana y cálculo dental. El tratamiento convencional de la periodontitis crónica incluye métodos mecánicos y químicos. En la actualidad existe la tendencia de combinar estas terapias con tratamientos naturales como el propóleo. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del propóleo sobre los niveles de NO en pacientes con periodontitis crónica. Se seleccionaron 20 pacientes con periodontitis crónica que se manejaron a boca partida, según las normas bioéticas derivadas de la declaración de Helsinki, se tomaron muestras de fluido crevicular gingival, se realizó el tratamiento periodontal inicial y se aplicó tintura de propóleo al 20% mediante irrigación subgingival dos veces por semana, durante 2 semanas, y del lado contra lateral se realizó sólo el tratamiento convencional más placebo. Se observó una disminución en los niveles de óxido nítrico en ambos grupos no siendo estadísticamente significativo ( $p=0,212$ ), en los casos tratados con propóleo con respecto al grupo control, de igual forma hubo disminución en los parámetros clínicos en ambos grupos luego del tratamiento.

**PALABRAS CLAVE:** periodontitis crónica, estrés oxidativo, óxido nítrico, propóleo.

## INFLUENCES OF PROPOLIS AS AN ANTIOXIDANT AGAINST NITRIC OXIDE IN CHRONIC PERIODONTITIS

### ABSTRACT

Nitric oxide (NO) is a gas easily disseminated, which features free radical involved in the pathogenesis of certain chronic diseases of the oral cavity such as periodontal disease, the most common form is chronic periodontitis associated with plaque and calculus dental.

Conventional treatment of chronic periodontitis includes mechanical and chemical methods. At present there is a tendency to combine these therapies with natural treatments such as propolis. The aim of this study was to evaluate the effect of propolis on NO levels in patients with chronic periodontitis. 20 patients with chronic periodontitis who managed to split-mouth, as bioethical standards relating to the declaration of Helsinki, samples of gingival crevicular fluid were taken were selected, initial periodontal treatment was performed and propolis tincture was applied to 20% by irrigation subgingival twice weekly for 2 weeks, and the contralateral side was performed only conventional treatment plus placebo. A decrease was observed in the levels of nitric oxide in both groups not being statistically significant ( $p = 0.212$ ) in patients treated with propolis compared to the control group, just as there was a decrease in clinical parameters in both groups after treatment .

**KEYWORDS:** Chronic periodontitis, oxidative stress, nitric oxide, propolis.

## INTRODUCCIÓN

La periodontitis crónica es la forma más frecuente de la enfermedad periodontal, posee alta incidencia a nivel mundial y es definida como una enfermedad infecciosa-inflamatoria, de etiología multifactorial, que afecta el aparato de inserción del diente (1). Como consecuencia de las reacciones hospedero-patógeno, produce pérdida excesiva del hueso alveolar y en algunos casos de los dientes, debido a la

migración del epitelio de unión y la formación de bolsas periodontales (2,3).

Durante los procesos inflamatorios y en este caso de inflamación de los tejidos periodontales, los neutrófilos liberan especies reactivas y radicales libres de oxígeno y nitrógeno, dentro de éstos el óxido nítrico (NO por su fórmula química) que actúa contra los patógenos, pero también contra los tejidos (4). En este sentido, en la periodontitis crónica existe sobreproducción de radicales libres

y disminución de la capacidad antioxidante, proceso conocido como estrés oxidativo y nitrosativo que conduce a mayor destrucción del tejido que rodea al diente (5,6). El NO es un gas con propiedades de radical libre, funciona como un mensajero de gran inestabilidad y posee vida media corta (5-10 segundos). Interviene en la regulación del tono vascular, neuromodulación del sistema nervioso central, formación y resorción de hueso, inhibición de la agregación plaquetaria, inmunocitotoxicidad y transducción de señales (7-9). En los tejidos periodontales y en fluidos como la saliva y el fluido crevicular gingival (FCG) el NO, a bajas concentraciones actúa como parte de los mecanismos de defensa inespecífica; sin embargo, en altas concentraciones produce efectos nocivos en los tejidos. La relación entre el aumento de los niveles de NO, (tanto en saliva como en FCG) y la periodontitis ha sido reportada por diversos autores (10-12). Asimismo, se ha evidenciado una relación directamente proporcional entre las concentraciones de NO en saliva y la profundidad de las bolsas periodontales

en pacientes con periodontitis crónica moderada y avanzada (12). En contraste, Aurer y col., encontraron concentraciones menores de NO en saliva de pacientes con periodontitis rápidamente progresiva y pacientes con periodontitis del adulto, en comparación con individuos sanos (13). Sin embargo, este aumento en los niveles de NO en estadios avanzados de la periodontitis, muestran una disminución luego de la terapia periodontal (14). Los métodos convencionales de tratamiento de la enfermedad periodontal consisten en procedimientos mecánicos y químicos. Actualmente, existe la tendencia a recurrir a terapias alternativas que ofrecen las ventajas de ser menos costosas, más accesibles a la población y producir menos efectos colaterales; tal es el caso del propóleo, un producto apícola cuyo uso en la medicina popular data desde los 300 años a.C (15).

La composición del propóleo es muy variable y compleja. Entre sus componentes se encuentran: resinas, bálsamos, ceras de abeja, aceites esenciales, polen, materiales orgánicos, inorgánicos y minerales. La porción de

resinas y bálsamos agrupa la mayoría de compuestos biológicamente activos, principalmente polifenoles como los flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres, terpenos, esteroides y aminoácidos (16-18).

El propóleo es una sustancia útil en el tratamiento de enfermedades sistémicas (19, 20) y bucodentales (18, 21, 22). En el área de periodoncia se ha demostrado la efectividad del enjuague bucal a base de propóleo para reducir la gingivitis y la concentración de la biopelícula dental (23, 24). Asimismo, la irrigación subgingival con solución de propóleo, ha sido utilizada como coadyuvante del tratamiento convencional, mejorando tanto los parámetros clínicos como microbiológicos, en pacientes con periodontitis crónica (22). Con la aplicación de un gel a base de propóleo también se evidenció disminución de la profundidad de sacos periodontales y de la movilidad dentaria en pacientes con gingivitis y periodontitis crónica (25).

En los estudios previamente mencionados el efecto beneficioso del propóleo ha sido asociado principalmente con su actividad

antimicrobiana. Sin embargo, debido a la actividad antioxidante que posee, el propóleo podría disminuir los niveles de NO para favorecer el restablecimiento de la salud periodontal y bucal en los pacientes. No obstante, no se han hallado publicaciones que reporten el estudio de este efecto. Por ello, el propósito de esta investigación fue evaluar la acción antioxidante de la tintura de propóleo sobre los niveles de NO, en pacientes con periodontitis crónica de intensidad moderada y de extensión localizada, como terapia complementaria al tratamiento periodontal convencional. Por otra parte, se valoraron posibles cambios en los parámetros clínicos (índice gingival y profundidad de sondaje) luego del tratamiento.

## **METODOOGIA**

### **Selección de los grupos y criterios de inclusión**

Se seleccionaron 20 pacientes que acudieron a la consulta odontológica en la Cátedra de Periodoncia de la Facultad de

Odontología de la Universidad de Los Andes, Mérida; femeninos y masculinos, entre 18 y 55 años de edad, con diagnóstico clínico y radiográfico de periodontitis crónica moderada localizada que cumplieron con los siguientes criterios de inclusión: evidencia de inflamación gingival, presencia de bolsas periodontales con una profundidad de 4 a 6 mm y pérdida de inserción en uno o más sitios por lo menos en un diente por cuadrante y que no hayan recibido tratamiento periodontal en los últimos seis meses, Asimismo, se tomaron 20 sujetos periodontalmente sanos como patrón de normalidad para la validación de la técnica. En todos los casos se excluyeron aquellos pacientes con compromiso sistémico que presentaban: diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares, artritis reumatoideas, inmunosupresiones idiopáticas o farmacológicas, hábitos tabáquicos, con tratamiento sistémico, portadores de prótesis fijas o en mal estado en los dientes seleccionados para la toma de muestra, patologías pulpares, traumatismo bucal, mujeres embarazadas o en periodo

de lactancia, pacientes que refieran ser alérgicos al propóleo y pacientes que no desearon participar en el estudio. Aspectos bioéticos: Se consideraron los aspectos de orden bioético, descritos en la declaración de Helsinki para la investigación médica en seres humanos (26) y se realizó un proceso de consentimiento, que consistió en informarle a cada paciente con un lenguaje sencillo sobre cuáles son las condiciones, los beneficios y los riesgos del proceso de investigación. Aprobado por el Comité de Bioética del Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico, Tecnológico y de las Artes (CDCTHA). Para la recolección de la información clínica de los pacientes seleccionados, se empleó un formato diseñado especialmente para este estudio y validado por expertos, que incluyó parámetros que se consideraron fundamentales, siguiendo las pautas de la historia clínica odontológica de la Cátedra de Periodoncia de la Facultad de Odontología.

Para el registro de las características clínicas relacionadas con el estado

inflamatorio de la encía y profundidad de sondaje, se seleccionó un diente por cuadrante tanto del lado derecho como izquierdo (estudio a boca partida), ambos con similares condiciones periodontales. Luego, para la medición de las características clínicas relacionadas con el estado inflamatorio de la encía, se empleó el índice gingival de Løe y Sillnes. En cuanto a profundidad de sondaje, se utilizó una sonda periodontal calibrada, modelo Williams (Hu-Friedy®). Se realizó el sondaje en tres sitios del diente (mesial, medio y distal) tanto de la superficie vestibular como de la superficie palatina o lingual (1). La determinación de la pérdida de inserción del tejido periodontal se realizó siguiendo el mismo procedimiento antes mencionado (1, 2). Se evaluó la condición de los tejidos gingivales y los cambios en los sacos periodontales de los dientes seleccionados, al iniciar y finalizar el tratamiento.

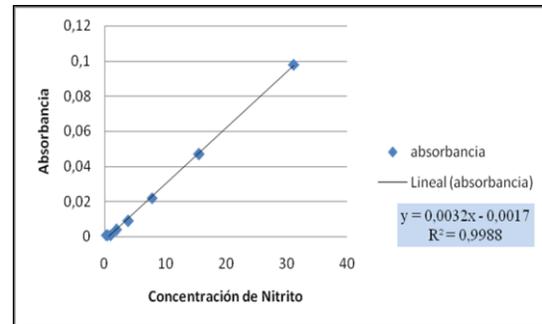
### **Determinación del óxido nítrico**

La medición de los niveles NO se realizó de manera indirecta a través de las

concentraciones de nitrito en FCG, tanto en dientes con periodontitis como en dientes sanos, se empleó la reacción de Griess acoplada a espectrofotometría. Esta reacción consiste en la formación de un cromóforo mediante la diazotización de la sulfanilamida con ácido nitroso, seguido de su unión con una amida bicíclica (27, 28).

Se descongelaron las muestras y se centrifugaron a 800 rpm durante 40 min con centrífuga minispin plus Eppendorf®, para separar el fluido crevicular gingival del periopaper quedando aproximadamente un volumen de 50 µL. El volumen de FCG se determinó pesando las puntas de papel antes y después de la toma de la muestra en una balanza analítica (KER ALJ 220-4), la diferencia de los valores obtenidos en gramos fue convertido en unidades de volumen (µL) considerando el valor de la densidad =1 (29). El método analítico que se utilizó para determinar el NO (nitrito) en FCG, fue la reacción de Griess modificada acoplada a espectrofotometría UV-visible (30), que consistió en agregar a la muestra 100 µL de dapsone [4-109

Aminophenylsulfone, 97% FW - 248,3 (Aldrich®, Milwaukee, USA) 14 nM, en 2 N HCl], 100 µl de NED [N-(1Naphthyl) ethyl-endiminedihydrochloride, FW 259,2 (Sigma®, Milwaukee, USA) 4 nM en H<sub>2</sub>O)], 50 µl de la muestra de FCG y 750 µl de buffer (KCl-HCl) pH (1,5). Se sometió a agitación por 5 s, en un vortex y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Pasado este tiempo, la absorbancia de las muestras fue determinada en el espectrofotómetro (PharmaciaBiotech® ultrospec 2000) a una longitud de onda de 540 nm, colocando 500 µl de las muestras en una cubeta de cuarzo y trasladándolas al interior del aparato para el análisis de la absorbancia de luz, usando como blanco agua destilada. Seguidamente, se construyó una curva de calibración, partiendo de una concentración de nitrito 31,5 µM y con diluciones sucesivas hasta alcanzar 0,24 µM; midiendo los correspondientes valores de absorbancia, los cuales arrojaron una línea de tendencia con un valor de R<sup>2</sup>=0,9988 (figura 1).



**Figura 1. Curva de Calibración, según concentración de nitrito y valores de absorbancia.**

### Recolección de muestras de fluido crevicular gingival

Para la toma de muestra de FCG se siguió el protocolo de Güncü y col., (31) llevando la tira de papel (periopaper N° 593525) a 1 mm en el surco gingival durante 30 s, por vestibular en un solo punto por diente, es decir mesial, medio o distal; luego se agregó 60 µL de agua destilada y se almacenó en microtubos Eppendorf® de 1,5 ml a -20 °C, hasta su procesamiento y análisis.

### Aplicación de tratamiento

Como plan de tratamiento se siguió un esquema de cinco citas control dos veces por semana durante dos semanas, en la primera cita se realizó la explicación

detallada del estudio a cada paciente, se registraron los datos personales y las características clínicas en el instrumento de recolección de datos. Seguidamente se comenzó con la fase inicial de tratamiento periodontal, que consistió en motivar al paciente en el control de placa, técnicas de cepillado, tartrectomía y la aplicación de la tintura de propóleo del lado experimental y el placebo del lado control. En todos los casos, al cuadrante derecho se le aplicó, mediante irrigación subgingival, 1 ml de la tintura de propóleo al 20% que correspondió al grupo experimental y en el cuadrante izquierdo o contralateral, se realizó irrigación subgingival con 1 ml de una solución placebo de agua destilada (grupo control). Para la irrigación subgingival se hicieron modificaciones a las agujas de la jeringa de 3 ml, mediante instrumentos rotatorios, y posterior esterilización en autoclave, de esta forma las agujas de aplicación tenían puntas romas y así se evitó lesionar los tejidos periodontales.

En la segunda cita se eliminó la placa dental supragingival y nuevamente se realizó aplicación del tratamiento en

ambos cuadrantes, así sucesivamente en la tercera y cuarta cita; además en esta última se realizaron los raspados y alisados radiculares. Finalmente en la quinta cita, se procedió a la segunda toma de muestra de FCG con periopaper, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente y se almacenaron las muestras hasta su procesamiento y análisis.

### **Análisis estadístico**

Para el análisis de los datos, primero se realizó el análisis estadístico descriptivo presentando las distribuciones de frecuencias para las variables categóricas y medidas de tendencia central y dispersión para las variables cuantitativas. Luego se procedió con el análisis estadístico inferencial utilizando modelos estadísticos para diferencia de medias, a través de la prueba t de Student para muestras relacionadas, con un nivel de confianza del 95%; mediante el programa SPSS versión 17.0

## RESULTADOS

### Características descriptivas de los sujetos

De los 20 pacientes que conformaron la muestra 12 pacientes fueron del género femenino que corresponde al 60% y 8 del sexo masculino(40%), en edades comprendidas entre 20 y 55 años; con un promedio de edad de 39,65 años y desviación estándar de  $9,696 \pm$  años.

### Nivel de NO antes del tratamiento periodontal en el grupo experimental y control

En la Tabla I se muestra el promedio de concentración de nitritos por cada grupo de paciente antes del tratamiento, el valor promedio de nitritos fue de  $2,530 \pm 0,265$

$\mu\text{M}$  para ambos grupos. Tomando en cuenta que los dientes tanto del grupo experimental como del grupo control tenían la misma condición periodontal ( $p=0,304$ ).

Como se indicó en la metodología, se manejó un grupo de 20 sujetos cuyo promedio de nitritos fue de  $1,343 \pm 0,422 \mu\text{M}$ ; valor que sólo se utilizó para validar la técnica.

Tabla I. Nivel promedio de NO antes del tratamiento en grupo experimental y grupo control

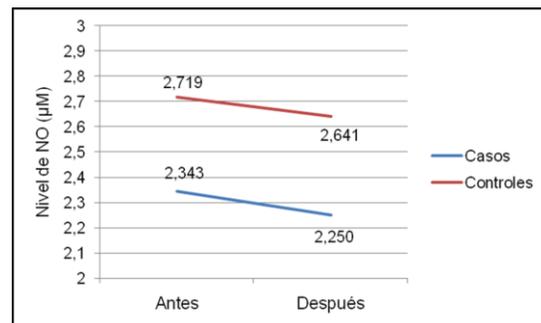
Grupos de estudio	n	Media (µM)	Desviación estándar
Experimental	20	2,343	0,783
Control	20	2,719	1,412
Experimental/Control	40	2,530	0,265
Sano(*)	20	1,343	0,422

(\*): patrón de normalidad.

**Nivel de NO después del tratamiento periodontal en el grupo experimental y control**

En la Fig. 2, se muestran los niveles de nitrito en FCG, antes y después de la aplicación del tratamiento en el grupo experimental y en el grupo control. Al comparar los valores promedios de nitritos en ambos grupos después del

tratamiento se observó que no existen diferencias significativas ( $p = 0,212$ ).



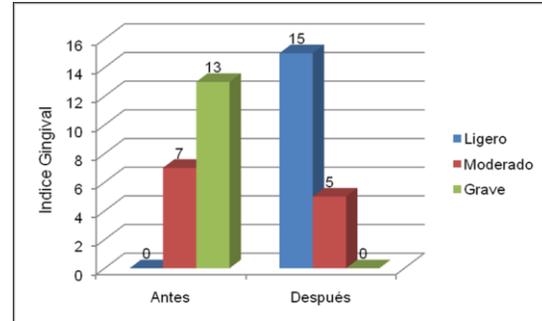
**Figura 2. Niveles promedio de NO en FCG de pacientes con periodontitis crónica moderada antes y después del tratamiento (valores expresados en  $\mu\text{M}$ ).**

Posteriormente, al comparar los valores promedio del grupo experimental antes y después del tratamiento se encontró que no existe diferencia significativa ( $p = 0,720$ ).

De igual forma, luego de comparar los valores promedio del grupo control antes y después del tratamiento se encontró que no existe diferencia significativa ( $p = 0,774$ ), entre los niveles de nitritos en FCG antes y después de tratamiento periodontal convencional.

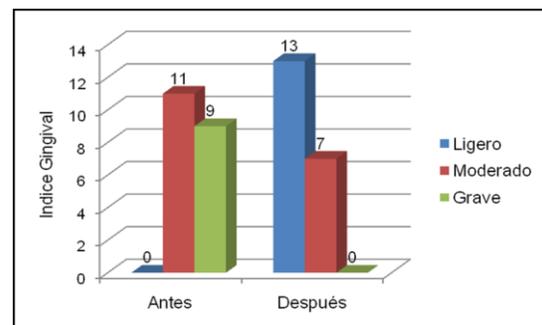
**Parámetros clínicos: índice gingival y profundidad de bolsas periodontales.**

En la Fig. 3 se describe el estado inicial y final de los tejidos gingivales del grupo experimental. Los resultados demuestran la mejoría en el índice gingival respecto a la condición inicial del grupo.



**Figura 3. Índice gingival en el grupo experimental al inicio y final del tratamiento**

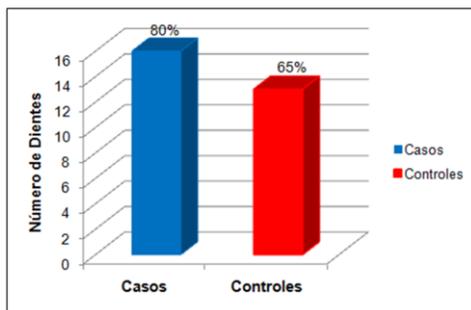
De igual manera se evaluó el índice gingival para el grupo control, donde también se observó mejoría luego del tratamiento convencional (Fig. 4).



**Figura 4. Índice gingival en el grupo control al inicio y final del tratamiento**

En cuanto a los cambios en las bolsas periodontales, se calculó el porcentaje de dientes que disminuyeron su profundidad a menos de 4 mm luego del tratamiento

(convencional y coadyuvante). El número de dientes en total que mostró mejoría luego del tratamiento fue de 29 que corresponde a un 72,5% en total. De modo similar, se obtuvo el porcentaje para cada uno de los grupos, resultando en un 80% (16 dientes) para el grupo experimental y de 65% para el grupo control (13 dientes), ver Fig.5.



**Figura 5. Disminución en la profundidad de los sacos periodontales.**

## DISCUSIÓN

Los resultados de diferentes estudios indican que en la periodontitis crónica la sobreproducción de radicales libres favorece la destrucción del tejido

periodontal, debido probablemente a un desbalance entre el sistema oxidante y el antioxidante (5, 32-36). En tal sentido, son muchas las investigaciones sobre mediciones del NO, de forma indirecta a través de sus metabolitos nitritos y nitrato (11,12, 14) así como, la determinación de la sintasa de óxido nítrico inducible (NOSi), en casos con periodontitis crónica (37,38). Es importante resaltar que en la literatura no existe una unificación de criterios en cuanto a los métodos de análisis y concentraciones de los metabolitos de la vía L-arginina/NO que permitan realizar comparaciones absolutas entre los resultados de diferentes autores, sugiriendo la necesidad de estandarizar las técnicas e intervalos de concentraciones que sean universalmente aceptadas como métodos de referencia, para hacer estudios que puedan ser comparables; por tal motivo, los resultados obtenidos se compararon en valores relativos con los de otros estudios, considerando aumento o disminución en los niveles de nitritos. Asimismo, existen otros factores pre-analíticos y no analíticos que pudieran influir en las

determinaciones como son: dieta (ingesta de nitritos y nitratos), uso de muestras contaminadas, técnicas de centrifugación, condiciones de almacenamiento, productos químicos materiales y disolventes, ritmo circadiano y el ejercicio físico (39), que influyen en las determinaciones y fueron controlados en nuestro estudio. Sin duda alguna la terapia periodontal convencional es clínicamente efectiva para el control de la periodontitis crónica; no obstante, investigaciones sobre el uso de terapias complementarias como coadyuvante a las convencionales, han demostrado beneficios en el proceso de recuperación de los tejidos periodontales. Sustentadas en el conocimiento de marcadores bioquímicos e inmunológicos, generados durante el proceso inflamatorio de la periodontitis crónica, que requieren la aplicación de tratamientos locales en los dientes afectados, para permitir el ataque directo contra los factores agravantes de la enfermedad. La presente investigación consistió en evaluar las concentraciones de NO medido indirectamente a través de los nitritos en el FCG de pacientes

diagnosticados con periodontitis crónica de intensidad moderada y de extensión localizada, antes y después del tratamiento periodontal, empleando como coadyuvante la tintura de propóleo mediante irrigación subgingival para el grupo experimental y sólo tratamiento periodontal convencional para el grupo control. En la literatura consultada se encontraron pocos trabajos que determinan los niveles de NO en FCG de pacientes con periodontitis crónica de intensidad moderada y de extensión localizada, siendo más común el análisis directamente en saliva y en casos de periodontitis generalizada, debido probablemente a la poca cantidad de la muestra recolectada y a la complejidad en la toma de muestra. No obstante, es importante destacar que las mediciones de NO en este estudio, se realizaron en muestras de FCG considerando lo propuesto por algunos autores (9,40) que expresan el almacenamiento en las glándulas salivales de aproximadamente un 25% de nitratos obtenidos de la dieta mediante la circulación entero-salival, que en presencia de la enzima nitrato

reductasa producida por las bacterias anaerobias facultativas bucales, se transforma en nitrito el que a su vez, mediante la reducción de la vitamina C y los polifenoles, se transforma en NO; por lo que en saliva es factible obtener valores de NO alterados debido a factores diferentes a la lesión periodontal. Asimismo, es interesante considerar que no se hallaron trabajos sobre la evaluación de la actividad antioxidante del propóleo frente al NO en esta patología bucal. Por lo antes mencionado, los resultados de esta investigación se confrontarán con los resultados de investigaciones sobre NO medido en la periodontitis crónica, así como los efectos del propóleo en la periodontitis crónica. En los resultados de esta investigación el valor promedio de los niveles de nitritos antes del tratamiento periodontal fue de  $2,530 \pm 0,2651 \mu\text{M}$  para ambos grupos, tomando en cuenta que tenían la misma condición periodontal al iniciar el tratamiento. Se destaca el manejo de un grupo de 20 sujetos sanos cuyo promedio de nitritos fue de  $1,343 \pm 0,422$ , que fueron tomados como patrón de

normalidad lo que nos garantiza la efectividad de la técnica y confirma la sobreproducción de NO en la periodontitis crónica, coincidiendo con otros estudios (11,12, 14). Estos resultados concuerdan con hallazgos como el de Tozüm y col., (41), quienes evaluaron los niveles de óxido nítrico y mieloperoxidasa en FCG y FSPI (fluido del surco peri-implantario) en implantes dentales y dientes naturales de 21 pacientes. Los niveles de nitrito en condiciones de gingivitis fueron de  $0,053 \pm 0,008 \text{ nmol}$ ; en periodontitis  $0,052 \pm 0,011 \text{ nmol}$  y en sanos  $0,050 \pm 0,010 \text{ nmol}$ . A pesar de que las unidades de concentración del NO difieren al presente estudio, se puede observar aumento en los niveles de nitrito en los casos de periodontitis. Asimismo, Rodríguez (30) encontró diferencia estadísticamente significativa en los niveles de NO (nitritos) en relación con la severidad de la enfermedad periodontal, al medir la concentración de nitrito con el método de Griess en FCG. La muestra estuvo conformada por 10 dientes de pacientes rehabilitados con prótesis fija

(casos) que presentaban gingivitis moderada y 10 dientes sin prótesis fija (controles) que mostraban gingivitis leve, el valor promedio de los niveles de nitritos en los casos fue de  $711,404 \pm 157,742 \mu\text{M}$  mientras que en los controles fue de  $447,048 \pm 90,243 \mu\text{M}$ ; ( $p=0,0361$ ) Mediante la determinación de nitrito en saliva, también se ha corroborado la relación directa entre los niveles de NO y la profundidad de las bolsas periodontales. En tal sentido, en pacientes con periodontitis crónica moderada y profundidad de bolsa de 4-6mm, las concentraciones de nitritos fueron de  $7,78 \mu\text{M}$  y en pacientes con periodontitis crónica avanzada y profundidad de bolsa  $\geq 6$  mm, los valores duplicaron el valor anterior con  $15,79 \mu\text{M}$ , a diferencia de los pacientes sanos cuyas concentraciones de nitrito fueron de  $5,86 \mu\text{M}$ . De igual forma en esta investigación, se observó un promedio mayor de nitrito en los casos de periodontitis crónica moderada con profundidad de sondaje de 4 a 6 mm con respecto al valor promedio presentado por el grupo sano que se utilizó para validar

la técnica (12). Otros investigadores también han reportado niveles de nitritos en saliva, tal es el caso de Parwani y col.,(14) quienes evaluaron los niveles de NO en muestras de saliva de 90 sujetos de los cuales 30 presentaban gingivitis, 30 periodontitis y 30 sanos; y encontraron aumento de NO en los casos de gingivitis ( $430,60 \pm 67,97 \mu\text{g}$ ) y periodontitis ( $537,67 \pm 80,06 \mu\text{g}$ ) en comparación con los controles ( $241,10 \pm 83,72 \mu\text{g}$ ); con disminución de NO luego de la terapia periodontal en los casos de gingivitis y periodontitis. Estos resultados coinciden con el presente estudio (aunque no fue estadísticamente significativo) en cuanto a la disminución de los niveles de NO luego de la terapia periodontal convencional y con propóleo. En contraste, Ozer y col.,(42) evaluaron los niveles de NO, arginasa y ornitina descarboxilasa en muestras de saliva de 9 pacientes con gingivitis, 15 con periodontitis crónica y 11 sujetos sanos, antes y después del tratamiento periodontal no quirúrgico. Los valores de nitritos previos al tratamiento fueron de

94,2 ± 10,1 μmol /g en individuos con gingivitis, en periodontitis 23,9 ± 6.3 μmol /g y en sanos 58,5 ± 13,1 μmol /g; los autores hallaron luego de la cuarta semana de tratamiento periodontal convencional disminución en los niveles de nitrito en los casos de gingivitis y aumento en los casos de periodontitis.

Por otra parte, en los resultados obtenidos en esta investigación, no se observaron diferencias significativas ( $p = 0,212$ ) en los niveles de nitritos de los pacientes tratados con propóleo, como coadyuvante del tratamiento periodontal, y aquellos a los que sólo se les aplicó el tratamiento periodontal convencional. Se infiere que esto pudo ocurrir por cualquiera de las siguientes causas: poco efecto residual del propóleo en los sacos periodontales, por lo cual se pueden sugerir otros métodos de aplicación más efectivos que permitan la liberación prolongada, aumento en la concentración del extracto de propóleo y purificación de los compuestos activos para unificar la eficacia biológica entre los extractos de diferentes regiones geográficas. No obstante, se logró demostrar una leve mejoría en cuanto a

los parámetros clínicos (índice gingival y profundidad de sondaje) en poco tiempo luego de dos semanas de tratamiento, en aquellos dientes que recibieron la terapia periodontal más propóleo con respecto a los que recibieron sólo la terapia convencional.

En este sentido, los resultados clínicos son similares, a los reportados por Gebara y col., (22) quienes evaluaron el efecto antibacterial de una solución hidroalcohólica de propóleo al 20%, mediante irrigación subgingival para el control clínico y bacteriano en 20 pacientes con diagnóstico de periodontitis crónica. Los autores concluyeron que en el grupo tratado con propóleo hubo disminución en el conteo de bacterias anaerobias y la presencia de levaduras y presentó una profundidad de sondaje menor o igual a 3 mm, así como disminución en la hemorragia al sondaje; sin embargo, no observaron diferencias significativas en cuanto a índice de placa dental e índice gingival entre los grupos tratados.

De igual forma, Amaral y col., (25) evaluaron la actividad

antimicrobiana de un gel de propóleo al 10%, en 4 pacientes diagnosticados con gingivitis y periodontitis crónica, la aplicación del gel se realizó durante cinco semanas, los resultados arrojaron disminución importante de la gingivitis y reducción de la profundidad de los sacos periodontales con regresión de la periodontitis a gingivitis.

Los resultados obtenidos en este estudio indican que los niveles de NO en el FCG del grupo experimental, no presentaron diferencias significativas después del tratamiento periodontal convencional empleando como coadyuvante el propóleo con respecto al grupo control, al cual sólo se le aplicó el tratamiento convencional más placebo. Además, se observó que hubo una mejoría en el índice gingival y profundidad de los sacos periodontales para ambos grupos luego de las dos semanas de tratamiento, siendo levemente mayor en el grupo experimental. Esto sugiere que el propóleo podría ser útil como coadyuvante en el tratamiento de la periodontitis crónica. Por consiguiente, se recomienda realizar futuras

investigaciones donde se valoré el efecto del propóleo como tratamiento coadyuvante al tratamiento periodontal convencional, en las diferentes etapas de la periodontitis crónica (leve, moderada y severa); así como, mayor número de individuos, periodos de tiempo más prolongados para tratamiento y evaluación de cambios clínicos, mayor concentración y el empleo de sistemas de liberación prolongada para la administración del propóleo.

#### AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen al Consejo de Desarrollo Científico Humanístico, Tecnológico y de las Artes por su financiamiento del proyecto N° (O-260-10-07-B) para la realización de este trabajo.

#### REFERENCIAS

1. Carranza F. Periodontología Clínica. 9ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2004.
2. Lindhe L. Periodontología Clínica e Implantología. 5ª Ed. tomo II. Bogotá: Panamericana; 2009.

3. Merchant A, Pitiphat W. Researching periodontitis: challenges and opportunities. *J Clin Periodontol* 2007; 34 (12):1007-1015.
4. Sahingur S, Cohen R. Análisis de las respuestas del huésped y riesgo de progresión de la enfermedad. *Periodontol 2000* 2005; 9: 57-83.
5. Ogino K, Wang D. Biomarkers of oxidative/nitrosative stress: an approach to disease prevention. *Acta Med Okayama* 2007; 61(4): 181-189.
6. Mariano S, Campanelli P, Nociti J, Mattos-Graner R, Gonçalves R. Antimicrobial peptides and nitric oxide production by neutrophils from periodontitis subjects. *Braz J Med Biol Res* 2012; 45 (11):1017-1024.
7. Calcerrada P, Peluffo G, Radi R. Nitric oxide-derived oxidants with a focus on peroxynitrite: molecular targets, cellular responses and therapeutic implications. *Curr Pharm Des* 2011;17 (35): 3905-3932.
8. Jiang H, Parthasarathy D, Torregrossa A, Mian A, Bryan N. Analytical techniques for assaying nitric oxide bioactivity. *J Vis Exp* 2012;18(64):e3722-e3727.
9. Lundberg J, Weitzberg E, Gladwin M. The nitrate–nitrite–nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev* 2008; 7:156-167.
10. Ozmeric N. Advances in periodontal disease markers. *Clin Chim Acta* 2004; 343 (1-2): 1-16.
11. Khorsavi M, Poorsattar A, Kashiri M, Gujeq D. Introducing cut-points for salivary nitric oxide to distinguish periodontitis from the normal periodontium. *Minerva Stomatol* 2012; 61(10):443-448.
12. Reher V, Zenóbio E, Costa F, Reher P, Soares R. Nitric oxide levels in saliva increase with severity of chronic periodontitis. *J Oral Sci* 2007; 49(4): 271-276.
13. Aurer A, Aleksic J, Ivic-kardum M, Aurer J, Čulo F. Nitric oxide synthesis is decreased in periodontitis. *J Clin Periodontol* 2001; 28(6): 565-568.

14. Parwani S, Chitnis P, Parwani R. Salivary nitric oxide levels in inflammatory periodontal disease - A case-control and interventional study. *Int J Dent Hyg* 2012; 10: 67-73.
15. Ramírez M, Villalobos E, Villafuerte A, Andrade F. Propóleos: ¿una alternativa en la terapéutica médica y odontológica?. *Rev Med Oral* 2001; 3(2): 91-94.
16. Santos V, Gomes R, de Mesquita R, de Moura M, França E, de Aguiar E, Naves M, Abreu J, Abreu S. Efficacy of Brazilian propolis gel for the management of dentur stomatitis: a pilot study. *Phytother Res* 2008; 22 (11): 544-547.
17. Sforcin JM, Bankova V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *J Ethnopharmacol* 2011; 133: 253-260.
18. Bankova V. Chemical diversity of propolis makes it a valuable source of new biologically active compounds. *J Api Prod ApiM Sci* 2009; 1(2): 23-28.
19. Farooqui T, Farooqui A. Beneficial effects of propolis on human health and neurological diseases. *Front Biosci* 2012; 4: 779-793.
20. Khalil M. Biological activity of bee propolis in health and disease. *Asian Pac J Cancer Prev* 2006; 1: 22-31.
21. Santos F, Bastos E, Uzeda M, Carvalho M, Farias L, Moreira E braga F. Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. *J Ethnopharmacol* 2002b; 80: 1-7.
22. Gebara E, Pustigliani A, Lima L, Mayer M. Propolis extract as an adjuvant to periodontal treatment. *Oral Health Preven Dent* 2003; 1(1): 29-35.
23. Koo H, Cury J, Rosalen P, Ambrosano G, Ikegaki M, Park Y. Effect of a mouth rinse containing selected propolis on 3-day dental plaque accumulation and polysaccharide formation. *Caries Res* 2002; 36(6): 445-448.
24. Rita E, Cândido J, Freitas F, Passos M, Ferreira E, Medeiros T, Rodrigues V. Clinical evidence of the efficacy of a mouthwash containing propolis for the control of plaque and

- gingivitis: a phase II study. *Eviden Bas Complem Altern Medic* 2011; 1-7.
25. Amaral R, Gomes R, Santos W, Rago S, Santos V. Periodontitis treatment with Brazilian green propolis gel. *Pharmacology online* 2006; 3: 336-341.
26. Manzini J. Declaración de Helsinki: Principios éticos para la investigación médica sobre sujetos humanos. *Acta Bioethica* 2000; 6(2):321-334.
27. Tsikas D. Methods of quantitative analysis of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in human biological fluids. *Free Radic Res* 2005; 39(8): 797-815.
28. Green L, Wagner D, Glogowski J, Skipper P, Winshnok J, Tannebaum S. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 126: 131-138.
29. Huerta L, Chirino E, González M, Noriega N, Tapia O. Actividad de la lactato deshidrogenasa en fluido crevicular gingival y saliva en fumadores con periodontitis crónica. *Avan Period* 2009; 21(1): 21-26
30. Rodríguez F. Niveles de óxido nítrico en el fluido gingival de pacientes rehabilitados con prótesis fija. [Tesis de especialidad no publicada] Mérida: Universidad de Los Andes; 2004.
31. Güncü G, Tözüm T, Güncü M, Yamalit N. Relationships between implant stability, image-based measures and nitric oxide levels. *J Oral Rehabil* 2008; 35: 745-753.
32. Sawamoto Y, Sugano N, Tanaka H, Ito K. Detection of periodontopathic bacteria and an oxidative stress marker in saliva from periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol* 2005; 20(4): 216-220.
33. Borges I, Moreira E, Filho D, Oliveira T, da Silva M, Fröde T. Proinflammatory and oxidative stress markers in patients with periodontal disease. *Mediators of inflamm* 2007. 2007:1-5.
34. Sculley D, Langley-Evans S. Periodontal disease is associated with lower antioxidant capacity in whole saliva and evidence of increased protein oxidation. *Clin Sci* 2003; 105: 167-172.

35. Chapple I. Role of free radicals and antioxidants in the pathogenesis of the inflammatory periodontal disease. *J Clin Pathol Mol Pathol* 1996; 49: M247-M255.
36. Panjamurthy K, Manoharan S, Ramachandran CR. Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with periodontitis. *Cell Mol Biol Lett* 2005; 10: 255-264.
37. Daghigh F, Borghaei R, Thornton R, Bee J. Human Gingival fibroblasts produce nitric oxide in response to proinflammatory cytokines. *J Periodontol* 2002; 73(4):392-400.
38. Menaka B, Ramesh A, Thomas B, Kumari S. Estimation of nitric oxide as an inflammatory marker in periodontitis. *J Indian SocPeriodontol* 2009; 13(2): 75-78.
39. Tsikas D. A critical review and discussion of analytical methods in the L- arginine/nitric oxide area of basic and clinical research. *Anal Biochem* 2008; 379(2): 139-163.
40. Sato E, Choudhury T, Nishikawa T, Inoue M. Dynamic aspect of reactive oxygen and nitric oxide in oral cavity. *J Clin Biochem Nutr* 2008; 42: 8-13.
41. Tözüm T, Akman A, YamalikN, Tulunoglu I, Turkyilmaz I, Karabulut E, Kilinic K, Cehrelci M. Analysis of the inflammatory process around endosseous dental implant and natural teeth myeloperoxidase level and nitric oxide metabolism. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2007; 22: 969-979.
42. Ozer L, Elgun S, Ozdemir B, Pervane B, Ozmeric N. Arginine-nitric oxide-polyamine metabolism in periodontal disease. *J Periodontol* 2011; 82(2): 320-328.