

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA



SEGURIDAD PRE CLÍNICA Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE *Aphyllocladus spartioides weddell* EN
PROCESOS GINGIVOPERIODONTALES

Postulante: GABRIELA PAOLA CLAROS ROMAY

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA

La Paz – Bolivia
2007

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA



Postulante: GABRIELA PAOLA CLAROS ROMAY

Asesor: ROGER CARVAJAL SARA VIA, Ph. D.

Co asesores: SILVIA ZAMBRANA SANTANDER Msc.

Dra. MILET CURCUY LANZA

Dra GILDA MENACHO DELGADILLO

La Paz – Bolivia

2007

Dr. Walter Montaña
Jefe de carrera Bioquímica

Tribunales de la presente tesis:

Dra. Heidy Garcia
Dr. Franklin Palomeque
Dr. Lido Saravia

Ambiente de investigación:

Instituto de Servicio de Laboratorio y Diagnóstico en Salud, SELADIS
Facultad de Odontología
Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas.
Universidad Mayor de San Andrés
La Paz - Bolivia

Dedicatoria

A Dios....

A mis papás: Eduardo y Tina por todo el amor, apoyo, esfuerzo y comprensión, de quienes aprendí su ternura, nobleza y sobretodo su fortaleza para luchar en la vida, no existen palabras para decirles cuanto los quiero, que junto a mis hermanos Patricia, Eduardo y Gabriel son lo mas importante que tengo, tan solo me queda decirles que tienen todo mi amor.....

A Ivan por ser alguien especial en mi vida a quien quiero mucho.

Y aquellas personas que con su amistad, apoyo o compañía en tantos momentos de alegría y tristeza supieron ganarse todo mi cariño.... Silvia, Yolanda Marcelo, Miguel, Lili, Moisés, Alejandro, y Oscar.

AGRADECIMIENTOS:

A todo el personal docente y administrativo del Instituto de Servicios de Laboratorio, Diagnostico e Investigación (SELADIS) por su apoyo y cooperación en especial a los laboratorios de Biomedicina experimental y Virología

A la Facultad de Odontología, en especial la Catedra de Periodoncia y un reconocimiento especial a todos los estudiantes que me brindaron su ayuda y conocimiento.

Al Bioterio de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, en especial a mi amigo Juan...

Mi gratitud al Dr Roger Carvajal, por su apoyo y confianza y sobre todo por su valioso conocimiento que fueron importantes en la realización del presente trabajo.

Un especial reconocimiento a mi amiga y asesora Silvia Zambrana quien me brindo todo su apoyo amistad, dedicacion, esfuerzo y confianza a lo largo de toda la realización del presente trabajo.

A Patricia Terceros por toda la ayuda brindada y apoyo y aliento, que fueron valiosos para la culminacion de mi trabajo.

A las doctoras Milet Curcuy, Gilda Menacho por su dedicada colaboración y asesoramiento en la realización de mi tesis.

A la Dra. Raquel Calderon y Raquel Flores por su veliosa cooperacion y enseñanzas.

A oscar y miguel quienes a lo largo de toda la realización de mi trabajo me brindaron toda su colaboración, paciencia, y aliento .

A Maria Esther, Gabriela, Alvaro, Marina, Daniel, Wladimir, y a todos que de alguna manera hicieron que se hiciera realidad este trabajo.

Muchas gracias.....

TABLA DE CONTENIDO

	Pags
Resumen	1
Summary	2
I. Introducción	3
II. Planteamiento del problema	5
III. Antecedentes	6
IV. Justificación	12
V. Marco Teórico	15
A. Etiopatogenia de la enfermedad periodontal	
Principales microorganismos de la boca	
1. Enfermedad Gingival	
2. Enfermedad Periodontal	
B. Diagnostico	
1. Examen clínico gingival	
2. Examen clínico periodontal	
C. Tratamiento	
1. Bases microbiológicas para el control de las placas dentales	
2. Tratamiento Farmacológico	
a. Agentes antibacterianos	
1) Condiciones del agente	
2) Principales agentes utilizables	
3) Bloqueantes de la adhesión	
4) Eliminación mecánica de la placa	
D. Estudios Pre-clínicos	
1. Estudios de toxicidad	
a. Toxicidad	
b. Métodos alternativos	
c. Validación de los métodos alternativos	
2. Técnicas <i>in vitro</i>	
a. Modelos libres de células	
b. Ventajas de los modelos <i>in vitro</i>	
c. Cultivos celulares	
d. Cultivos primarios	
e. Líneas continuas	

VI. Objetivos 45

- A. Objetivo General
- B. Objetivos Específicos
- C. Hipótesis

VII. Diseño metodológico 46

- A. Preparación del extracto acuoso
- B. Cultivo celular
- C. Extracción de esplenocitos murinos
- D. Extracción de linfocitos humanos
- E. Estudio de inocuidad in vivo
- F. Estudio clínico en pacientes
- G. Estudio microbiológico

VII. Resultados 66

VI. Discusión 118

VII. Conclusiones 128

VIII. Recomendaciones 128

IX. Bibliografía 129

X. Anexos 149

RESUMEN

Las enfermedades gingivoperiodontales son procesos patológicos que alteran las estructuras de la encía y estructuras dentarias. El factor etiológico principal es la biopelícula de placa dental que se forma en las inmediaciones del surco gingival, cuando se desarrolla una gingivitis o una periodontitis en realidad lo que se produce es un desequilibrio entre la capacidad agresiva de los microorganismos y los mecanismos de defensa del hospedero; por tanto es una enfermedad silenciosa de gran porcentaje de morbilidad en el mundo y en nuestro país que provoca infecciones severas, pérdidas dentarias e inclusive enfermedades sistémicas como la endocarditis bacteriana.

En el presente trabajo se estudió el extracto acuoso de *Aphyllocladus spartioides weddell* el cual tiene amplio uso por la medicina tradicional de nuestro país; trabajando en sistemas de cultivos *in vitro*, en líneas celulares continuas y primaria determinando la Concentración citotóxica media (CC50) esta evaluación se llevo a cabo por el método de Exclusión del colorante Azul tripán y de reducción de la sal de Tetrazolium (MTT), donde el promedio de ambos ensayos presento una (CC50) de 0.1228 mg/mL también se realizo el estudio de toxicidad local *in vivo* en mucosa oral de animales de experimentación (conejos), evaluando los diferentes parámetros de la mucosa oral : linfocitos, eosinofilos, vasos congestivos, hiperplasia, queratinización, numero de capas de la mucosa en diferentes estratos, no se encontraron alteraciones significativas en la mucosa, sino un posible efecto de reepitelización a nivel del estrato intermedio de la mucosa, observando un aumento de mitosis. Por ultimo se evaluó el efecto terapéutico del enjuague bucal (Retamox al 0.03g/100mL), mediante el estudio clínico con 30 pacientes que cursaban gingivitis y periodontitis, realizando el estudio microbiológico y clínico de los signos gingivoperiodontal. El estudio clínico reporto una visible disminución de bacterias patógenas como: las *Fusobacterias*, *Espiroquetas* y *Streptococcus mutans spp* cambios en algunos signos gingivoperiodontales relacionados con la inflamación e infección como el cambio de color, pérdida de textura, disminución de las bolsas gingivales, con estos resultados obtenidos de puede decir que es una alternativa fitoterapeutica en el tratamiento de enfermedades periodontales.

Summary

The illnesses are pathological processes that alter the structures of the gum and dentaries structures; the etiologic factor essential is the biofilm of dental. When a gingivitis or a periodontitis is developed in fact what takes place it is an imbalance between the microorganisms and the mechanisms of defense of the hospedery; being a silent illness of great morbilidad percentage in the world and in our country. It provokes severe infections, dentary lost and inclusive systemic illnesses as the bacterial endocarditis. At the moment alternative therapies are investigated for the control of this illness.

In the present work was studied the watery extract of *Aphyllocladus spartioides weddell* in systems of cultivations in vitro, in cellular continuous lines and primaries, determining the half Citotoxica Concentration (CC50), the evaluation was carries out for the method of Exclusion of the coloring Blue tripan and of reduction of the salt of Tetrazolium (MTT), also carries out the study of local toxicity in vivo in mucous oral of experimentation animals, in different levels of the mucous oral, finally the therapeutic effect was evaluated of the dries buccal (Retamox to 0.03 g / mL) by means of the clinical study with 30 patients that have gingivitis and periodontitis, carrying out the study microbiologist and clinical of the signs gingivoperiodontales.

The extract of *Aphyllocladus spartioides weddell* presents a CC50 of 0.1228 mg / mL. In the study in vivo were not significant alterations in the mucous oral, but a possible reepitelization effect at level of the intermediate stratum of the mucous oral observing a mitosis increase.

The clinical study reports a visible decrease of patogens bactery like: Fusobacterias, Espiroquetas and Streptococcus mutans spp changes in some signs gingivoperiodontal related with the inflammation and infection. Proposing later studies that enlarge the sostenibility of the obtained results, to be able to consider an alternative fitoterapy in the treatment of periodontal illnesses.

I.Introducción

El ser humano desde el inicio de su historia fue desarrollando conocimientos tanto en ciencia como arte; entre estos se encuentra el uso de las plantas medicinales cuyo aporte fue de gran valor para el manejo de la salud en cada época. Entre las principales culturas que aportaron a tal desarrollo podemos citar a la cultura China, Egipcia, Griega, Azteca, Aymará, Quechua, Maya, conocidas por el desarrollo de practicas medicas y la búsqueda de remedios en base a plantas originarias que alivian las diferentes dolencias o enfermedades.

La salud es el factor elemental para el normal desarrollo de las actividades cotidianas del organismo; un deterioro en la misma conduce a una disminución en el rendimiento físico y mental y condiciona a su vez un deterioro económico y social. Siendo este un acontecimiento cotidiano y frecuente a nivel mundial, cobra importancia su manejo y el despliegue de esfuerzos, estrategias y mecanismos, con fines terapéuticos y preventivos.

Entre los principales problemas en salud se encuentran a las enfermedades infecciosas de la cavidad oral, por cuanto la boca es uno de lo sitios del organismo mas expuestos a agresión externa. Los procesos patológicos de la cavidad oral más frecuentes: son las caries, gingivitis y periodontitis, procesos de evolución lenta, que al no ser tratadas adecuadamente, con el transcurso de los años conducen a una serie de complicaciones como: la destrucción y pérdida de piezas dentarias o enfermedades a nivel sistémico.

Las expresiones clínicas de la enfermedad periodontal la gingivitis y la periodontitis, representan un grupo de patologías infecciosas específicas que afectan a las estructuras que rodean el diente, tanto encía, como al ligamento periodontal. Entre los factores determinantes para el desarrollo de estas patologías, podemos citar: la deficiente o ausencia de aseo dental y una respuesta protectora o defensiva a nivel inmunológico. Cuando la gingivitis persiste, donde solo es afectada la encía, puede derivar a periodontitis, en la que se ven afectadas las estructuras dentarias y se observa la destrucción de los tejidos de soporte dentario, ligamento periodontal, cemento inclusive hueso alveolar.

Estudios recientes indican que la enfermedad periodontal es una enfermedad silenciosa que afecta a un 90% de personas adultas, siendo menos frecuente en la pubertad y en jóvenes de 20 años ^(4, 7, 10).

En nuestro país; el último censo nacional refiere que un 70% de los hogares bolivianos son considerados pobres, (51% urbanos y 94% rurales),⁽⁸⁴⁾ con falta de acceso a servicios básicos de educación, salud y vivienda, alimentación deficiente o baja en nutrientes esenciales; reportando notables índices de afecciones bucales en niños, adultos y ancianos. En las enfermedades periodontales diagnosticadas. Ante esto, una vez diagnosticadas, el tratamiento en un inicio consiste, de un curetaje odontológico, seguido de la utilización de antibióticos; sin embargo, en muchos casos el costo de este tratamiento se constituye en una limitante que provoca el abandono del mismo.

En respuesta a los problemas de salud, en los últimos años el tratamiento cobro mucha importancia por lo que se trató tratando de encontrar un bajo costo y fácil acceso para la población: Una de las estrategias fue la realización de procesos de validación científica de productos naturales para la generación de nuevos fármacos a partir de plantas medicinales. Entre algunas plantas medicinales estudiadas tenemos: a la *Chinchona spp*, droga utilizada en el tratamiento de la malaria, la *Artemisa annua* que es un conocido antimalarial, *La Vinca rosea* con actividad antitumoral en ciertas leucemias y otras. Entre las plantas utilizadas para las afecciones bucales tenemos a la *manzanilla*, *el llantén*, *el arrayán*, que son empleadas en el alivio de procesos infecciosos bacterianos. Asimismo se cuenta con productos conocidos mundialmente para el tratamiento de infecciones bacterianas en procesos gingivoperiodontales, como el *Kuwanon*, *Lanta camara* que demostraron tener actividad contra *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* y *Porphyromonas gingivalis*.^(16, 33, 70).

En el presente trabajo, se plantea realizar el estudio de las propiedades antibacterianas de la planta *Aphyllocladus spartioides weddell* en procesos gingivoperiodontales; planta originaria de los valles potosinos es utilizada en la medicina tradicional del lugar originaria en el alivio de las inflamaciones de las encías y que estudios previos han demostrado efectividad contra agentes bacterianos causantes de la enfermedad periodontal.^(13, 14)

II. Planteamiento del problema

Las enfermedades periodontales constituyen un problema en la mayoría de la población mundial, convirtiéndose en una pandemia silenciosa que afecta tanto niños y jóvenes, como adultos y ancianos, afectando principalmente a las encías en las que generan signos como sangrado, inflamación, aumento de la placa bacteriana, deterioro de la estructura propia del diente mostrando movilidad dentaria, incluso la pérdida de piezas dentarias lo que a su vez trae consecuencias tanto en la estética como en la fisiología y psicología del paciente^(9,8,32,39,104)

La enfermedad periodontal se presenta con elevada frecuencia en nuestra población, muestra de ello está en los registros de la Facultad de Odontología de la UMSA, donde en el año 2006 la Cátedra de Periodoncia atendió alrededor de 1000 pacientes que presentan alguna manifestación de enfermedad periodontal. Los casos van desde los más leves, son los que requieren una profilaxis, a casos avanzados donde el único tratamiento consiste en una intervención quirúrgica, que representan un alto costo, por esta razón en su mayoría las personas de bajos recursos abandonan el tratamiento.

Entre los productos disponibles para el tratamiento de estos procesos se tienen antibióticos o químicos terapéuticos que inhiben la proliferación bacteriana, en la placa dental. Sin embargo, se ha reportado que con el uso de estos agentes existe irritación en los tejidos circundantes, mostrando trastornos en la cicatrización y reparación tisular o afectando a la estructura de la pieza dentaria, además de reacciones adversas al tratamiento antibiótico como náuseas, vómitos, manchas en los dientes, hipersensibilidad, diarreas, fotosensibilidad, neutropenias y granulocitosis^(8,12,19,26,33,51,75,103). La falta de manejo de estos problemas que puede conducir a la generación y así no pudiendo evitar las complicaciones como la dermatitis, nefritis, artritis y endocarditis bacteriana. Estas y otras patologías son causadas por el desequilibrio de la placa bacteriana, que favorecen a los microorganismos la capacidad para producir alteraciones en los mecanismos de defensa del aparato inmune,

permitiendo así cambios patológicos que van desde infecciones endógenas hasta procesos auto inmunes por liberación de antígenos bacterianos, que forman complejos inmunes que se depositan en diferentes tejidos^(104,106,122)

En investigaciones recientes^(104,157,163,) mediante cultivos sanguíneos se verificó, que a los 30 segundos después de realizada una extracción dentaria o de un curetaje o de una tartrectomía o de una limpieza bucal o de cirugía periodontal, se producen bacteremias en un 100% de los casos, (diseminación de las bacterias orales hacia la sangre) por lo que, en menos de un minuto luego los microorganismos; que alcanzan el corazón y pulmones y otros órganos esto se realiza a través de capilares periféricos sanguíneos y de linfáticos de la cavidad oral.

Ante tales evidencias, en nuestro país debido al bajo estado nutricional de la población, se reportan frecuentes casos que convierten a este hecho en un problema de salud, en el que la profilaxis antibiótica se ha transformado en una regla en pacientes con enfermedad periodontal.

Ante la necesidad de encontrar un recurso terapéutico que pueda ser accesible, de bajo costo y de fácil administración, se reporta el uso de remedios caseros de origen natural como métodos alternativos. En esta línea nuestro laboratorio está en desarrollo un agente terapéutico de origen natural que sea efectivo a concentraciones no tóxicas que no produzca efectos adversos al paciente y que sea de un accesible costo al paciente.

III. Antecedentes

Las infecciones odontogénicas son patologías ampliamente distribuidas en la población, estos se encuentran relacionados a la boca y tejidos circundantes, donde habitan diferentes especies de microorganismos, como bacterias, virus y hongos, distribuidos en diferentes proporciones según la zona: mucosa, dorso de la lengua, superficies dentales, surco^(7,12,33,53,75,107) gival, saliva, placas dentales. Sin embargo el desequilibrio de la dieta

proporciona ya de una cantidad de padecimientos infecciosos como la caries dental, gingivitis y periodontitis.

La enfermedad periodontal incluye una serie de procesos patológicos inflamatorios que afectan a las estructuras de la cavidad oral desde las papilas ínter dentarias hasta las propias estructuras del periodonto (ligamento periodontal). Esta producida por el desequilibrio de la interacción entre la respuesta inmunitaria del huésped y la flora de la placa dental marginal que coloniza el surco gingival. Estas patologías pueden agruparse en dos grandes grupos: procesos que afectan a la encía (gingivitis) y los que se extienden al resto de las estructuras del periodonto (periodontitis).^(142,143)

La gingivitis es la etapa más temprana de las enfermedad periodontal, se caracteriza por inflamación que afecta los tejidos blandos que rodean al diente, principalmente la encía caracterizándose por un sangrado consecuente al simple cepillado dental, por la destrucción de las papilas interdentes y a menudo del borde gingival, lo que produce un intenso dolor. Su génesis esta implicada a factores: orales como la falta de higiene, tabaquismo, sistémicos como el estrés, factores hormonales, carencias nutricionales inclusive un déficit de consumo de vitamina C y sobre todo una dieta rica en carbohidratos residuos adheridos al surco gingival que son utilizados como sustrato para la proliferación de bacterias de la cavidad oral. Entre las diversas bacterias tenemos: *Espiroquetas*, *bacilos fusiformes*, *Leptotrichia buccalis*, *selenomonas spp* y *Prevotella melaninogénica*. *Treponema denticola*, *Actinomicetes*, *actinomicetocomitans*, *Streptococcus mutans*.^(1,2,3,4,33,106)

La periodontitis se puede definir como la inflamación de los tejidos de soporte del diente, que usualmente muestra cambio progresivo, con pérdida de hueso y del ligamento periodontal; por extensión de la inflamación de la encía son lesiones con características inflamatorias causadas por una infección por placa bacteriana, la cual provoca procesos de hipersensibilidad inmunológica que causa serio daño tisular local.

La Periodontitis no tratada, o tratada inadecuadamente, es la principal causa de pérdida de piezas dentarias en adultos La alta incidencia de esta patología en la población local de

nuestro país se expresa en el hecho que la lo Facultad de Odontología de la UMSA, Cátedra de Periodoncia atiende alrededor de 1000 pacientes con diferentes tipo de enfermedad en el transcurso de un año.El registro de pacientes que acudieron a consulta odontológica muestra el siguiente perfil.

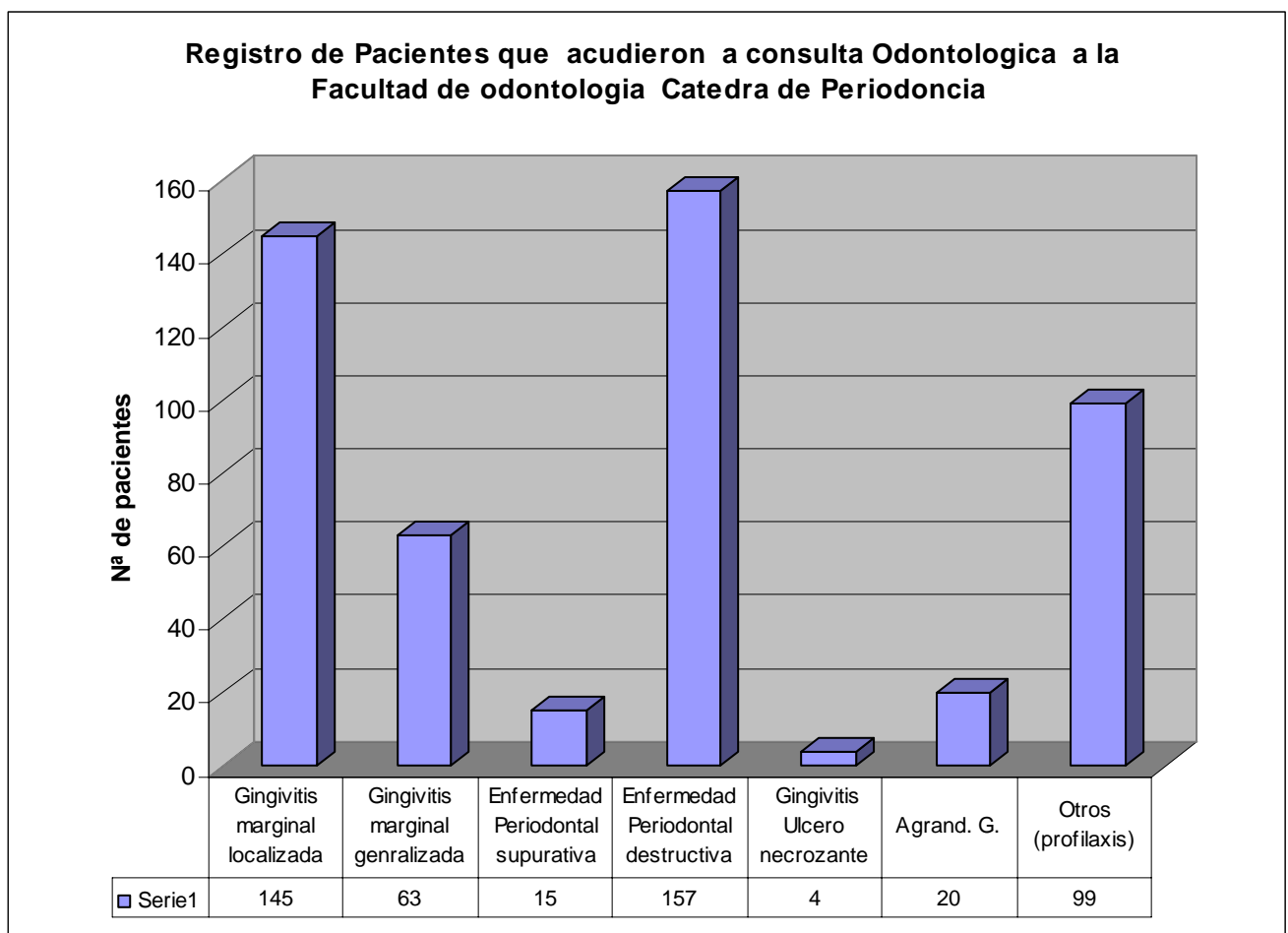


Figura No1. Bolivia: Numero de pacientes según enfermedad peridontal que acudieron a realizarse tratamiento a la facultad de odontología Cátedra de Periodoncia de neumonías en personas de 15 a 60 años de Febrero a Noviembre del 2006. Fuente: Libro de registro de Cátedra de Periodoncia.

Según la información disponible un 28,8% de los pacientes presenta GML (gingivitis Marginal Localizada), un 12,5% presenta GMG (gingivitis marginal generalizada) un 2,9% presenta EPS (enfermedad periodontal severa), un 31,2% EPDC (enfermedad periodontal destructiva crónica), un 0,8% GUNA (gingivitis ulcero necrozante aguda) y el resto acuden por profilaxis bucal. Siendo el 52,4% de los pacientes fueron del sexo femenino y 47,6% del sexo masculino los cuales oscilaban entre 21 a 30 años de edad.

La enfermedad periodontal es la causante de sangramiento, dolor y pérdida de piezas dentarias; su terapia y prevención es importante para revertir estos signos y poder preservar las piezas dentarias como sea posible, retardando, deteniendo o revirtiendo la destrucción periodontal. Un tratamiento exitoso no solo está basado en el mejoramiento de los parámetros clínicos, e idealmente en la regeneración de las estructuras perdidas y la recuperación de la función normal, sino también, en cambios cualitativos y cuantitativos dentro de la microbiota subgingival, la supresión de los focos infecciosos subgingivales a través del desbridamiento mecánico, la remoción de la placa bacteriana y el cálculo adherido supra y subgingival, pulido radicular, la instrucción en higiene oral, la eliminación de factores de retención de placa, y la regeneración de la estructura dentaria mediante la cirugía periodontal. En algunos casos la pérdida del nivel de inserción periodontal es continua, persistiendo los sacos profundos; esto convence al profesional odontólogo a definir una estrategia antimicrobiana local y sistémica combinada para la eliminación de las bacterias patógenas específicas sean eliminadas mediante los antibióticos como la clindamicina, tetraciclina, metronidazol y otros de tipo sistémico como los de la familia de las penicilinas. Estos penetran y afectan todos los nichos ecológicos de los microorganismos de la cavidad oral en forma total, de sitios enfermos y sanos, siendo una ventaja en situaciones donde los periodontopatógenos están distribuidos a través de la totalidad de la boca.

Estos tratamientos son costosos y en su mayoría, tóxicos en varios niveles debido a su prolongado uso se ven reacciones adversas como náuseas, vómitos, diarreas,

hipersensibilidad, fotosensibilidad, y aun peor la resistencia antimicrobiana, por eso hoy en día existe una búsqueda continua de nuevas alternativas terapéuticas La medicina

tradicional de diferentes regiones del mundo, reporta diversas plantas antibacterianas usadas en el tratamiento periodontal contra algunas bacterias periodontopatógenas.

Entre las investigaciones recientes, realizadas en latinoamérica, en el Brasil se testaron 25 plantas medicinales de diferentes regiones de su país, de las cuales extrajeron 49 extractos donde *Jatropha elliptica*, *Schinus terebinthifolius* y *eritrina mulungu*, *Caesalpinia pyramidalis*, *Serjania lethalis* y *Lafoensia pacari* las mismas que presentaron un poder antibacteriano sobre *Staphylococcus aureus*. Otras plantas ubicadas en región del África y Madagascar son: la *Hurungana madagascariensis*, planta utilizada como antibacteriana tópica, en productos de higiene bucal, la *Mikania glomerata* y *Mikania laevigata*, las cuales se encuentran en áreas tropicales de África, Asia y América con más de 200 especies donde estudios de diferentes fracciones e cromatográficas, demostraron actividad antibacteriana sobre bacterias patógenas orales en especial sobre *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus cricetus*, el *Kunamon G*, conocida planta de la medicina coreana en estudios de screening antimicrobiano, presenta una significativa inhibición en el crecimiento de bacterias cariogénicas como *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguis* y *Porphyromonas gingivalis* que son causantes de la periodontitis. En la India se examinan alrededor de 61 plantas medicinales de 33 familias diferentes; y donde se encontró *Dorema ammoniacum*, *Sphaeranthus indicus*, *Dracaena cinnabari*, *Mallotus philippinensis*, *Jatropha gossypifolia* entre otras tienen una significativa inhibición sobre *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus*, *Candida albicans*, *Aspergillus Níger*, *Pseudomonas aurigosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*.^(15,49,57,60,81,112)

Al *Rubus* conocido popularmente como mora es también utilizado en afecciones bucales, principalmente contra algunas bacterias como *Bacillus subtilis*, *Bacillus sp*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

La manzanilla (*chamomilla*) es considerada una planta medicinal y su eficacia curativa se conoce desde la antigüedad. Estudios realizados con una pasta dental con aceite de manzanilla presentaron dismunición sobre *Streptococcus mutans*, *Pseudomona*, *Klebsiellas* y *Candidasy* mas aun sobre el indice gingival formado en la gingivitis⁽¹⁰⁷⁾

Entre otras plantas de gran importancia en el tratamiento terapéutico de enfermedades periodontales tenemos a la *Sanguinaria mexicana (Polygorum Aviculare L.)* que es utilizada como enjuague bucal contra la gingivitis, especialmente en la considerable reducción de la placa bacteriana. También el *Propolis (Apis mellifera)* es extraído a partir de la resina y exudados de varias plantas como un producto elaborados por las abejas; tiene una amplia distribución mundial, su actividad biocida *in vitro* de pro polis frente a *S. mutans*, fue recientemente estudiada; se determinó el efecto sobre diferentes microorganismo patógenos orales, entre los cuales se incluyó *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Cándida albicans*, *Porphyromonas gingivalis*.^(68,162)

En nuestro país debido a su gran riqueza biológica se reportan innumerables plantas utilizadas por diferentes comunidades para las dolencias bucales, entre ellas se encuentra, *la Salaya, Arrayan, Chillca. Llantén*. Entre estas plantas curativas se reporta la *akhana (Aphyllocladus spartioides weddell)* una planta que se encuentra en los valles potosinos que es muy usada por los habitantes del sur del país en forma de infusión en inflamaciones y enfermedades de la encía, quienes reportan efectos terapéuticos en el tratamiento de estas dolencias. En trabajos anteriores se investigaron sus propiedades fitoquímicas en las que se observo que presentan compuestos como flavonoides y taninos las que podrían estar involucrados en la acción biológica; también se realizaron estudios *in vitro* sobre bacterias obtenidas del surco gingival y se concluyo que presenta actividad sobre microorganismos anaerobios causantes de la enfermedad periodontal como *Fusobacterias, Treponemas, S. mitis, S. mutans, Staphylococcus aureus*. También se determino la actividad del extracto en *pacientes in vivo* en pacientes demostrando una disminución significativa en *Bacilos fusiformes* y *Espiroquetas* utilizando una solución de e enjuague al 5% así como también

una, disminución en signos de inflamación , coloración , dolor y sangrado de las encías, constituyendo de este modo un recurso fitofarmacológico de amplias perspectivas en el manejo de procesos gingivoperiodontales para lo cual se necesita realizar estudios preclínicos sobre todo de toxicidad , para tener una seguridad clínica efectiva de la planta y sobre todo para realizar una validación científica de la planta, en procesos de investigación clínica .

IV. Justificación

En este ultimo tiempo con el objetivo de realizar un mayor aprovechamiento y de la actividad biológica de las plantas medicinales, está siendo estudiada a nivel mundial en diferentes áreas. En este marco la Organización Mundial de la Salud (OMS) realiza recomendaciones sobre la realización de estudios preclínicos toxicológicos exhaustivos de los componentes de la herbolaria medicamentosa tradicional, en varios niveles del organismo: somático, celular y genético^(83,115,154).

En nuestro medio desde varios años se han estado estudiando diferentes, plantas medicinales de la herbolaria tradicional con la finalidad de obtener la validación científica, como se menciona antes en el mundo y en nuestro país, miles de personas sufren dolencias bucales siendo las de mayor frecuencia: las caries, la gingivitis y la periodontitis, las cuales afectan a gran parte de la población . Estos procesos infecciosos de la cavidad bucal, en especial las enfermedades periodontales (causadas fundamentalmente por bacterias que habitan normalmente en la placa dental de la cavidad oral), aumentan debido a una deficiente higiene bucal, mala alimentación, un excesivo consumo de hidratos de carbono, déficit de vitaminas , estrés, depresión . Todo lo anteriormente mencionado va relacionado con los factores socioculturales de los habitantes: pobreza, analfabetismo, falta de educación y orientación. Se sabe personas que presentan los primeros síntomas de la enfermedad periodontal no prestan mayor importancia y no acuden a un centro de salud para su atención; es por todo esto que hoy en día se reportan enfermedades sistémicas como: endocarditis, bacteremias, neumonías bacterianas, dermatitis, nefritis, artritis y

diabetes mellitus en pacientes que cursaron enfermedades periodontales en ocasiones anteriores.

Para aliviar estas enfermedades infecciosas e inflamatorias además de la higiene bucal constante y eliminación de la placa bacteriana o el curetaje, se utiliza también medicamentos ya sea sustancias químicas antibióticos, tanto a nivel local y sistémica, entre estos son frecuentes la clorhexidina, la penicilina, la vancomicina, la eritromicina, el metronidazol e inclusive quinolonas de tercera generación como la ciprofloxacina entre otros antisépticos orales como la combinación de yodo povidona, compuestos como el otro eugenol, timol, etilaminoetanol, salicilato de metilo que, según indicaciones evitan la irritación e inflamación en las encías. Sin embargo se sabe que estos poseen muchos efectos adversos en el tratamiento con estos como ser: náuseas, vómitos, diarreas fotosensibilidad, hipersensibilidad y sobre todo manchan los dientes; mas aun se demostró tanto un efecto toxico a nivel sistémico e inmunosupresor de ciertos antibióticos como la resistencia antibiótica por ciertas bacterias periodontopatogenas y efectos irritativos sobre células de la mucosa oral, pudiendo interferir sobre procesos de reparación como efecto de lo anterior, hoy en día se da mayor importancia a la utilización de enjuagues bucales debido a que esta sustancia permanece por lo menos un minuto en contacto con la encía o sacos parodontales formados en la enfermedad periodontal y al expulsar el enjuague arrastra a varias bacterias no causando así efectos no deseados en los pacientes. Queda claro entonces que las desventajas mencionadas anteriormente en el tratamiento odontológico que utilizan los profesionales odontólogos justifican de sobremanera la investigación y desarrollo de un agente terapéutico de origen natural. ^(12,20,24,29,33,61,68)

Simultáneamente al desarrollo tecnológico de la industria farmacéutica, se ha desplegado un gran interés de parte de los investigadores por estudiar sustancias naturales que posean algunas propiedades farmacológicas con efecto antimicrobiano. Se debe destacar que los fármacos con base en derivados de productos naturales presentan una inmensa ventaja respecto a los tratamientos químicos. En las plantas los principios activos siempre están biológicamente equilibrados por la presencia de sustancias complementarias que van a

potenciarse biológicamente entre sí, de forma tal que, en general, no se acumulan en el organismo y sus efectos indeseables están limitados.

En Estados Unidos se calcula que entre un cuarto y la mitad de todos los productos farmacéuticos que se venden, tienen un origen natural o han sido obtenidos a partir de sustancias naturales, pero una escasa cantidad son usadas como antimicrobianas, desde la aparición de los antibióticos convencionales en la década de 1950. La fitoterapia, nombre que se aplica al uso medicinal de derivados de plantas, nunca ha dejado de tener vigencia. En el ámbito odontológico, el importante crecimiento mundial de la fitoterapia dentro de programas preventivos y curativos ha estimulado la investigación, con el fin de avalar la actividad antimicrobiana de distintos derivados de plantas para ayudar en el control de la placa bacteriana, y por consiguiente, en la disminución de la incidencia de caries dental y enfermedad periodontal.

Diversos estudios *in vitro* con diferentes antibióticos extraídos de plantas medicinales muestran la existencia de una considerable actividad antibacteriana en los productos naturales. Entre algunas se puede citar al extracto de *té Verde*, que inhibe el crecimiento de *Streptococcus mutans*. La *sanguinaria* que es un alcaloide extraído de la raíz del canadensis de *Sanguinaria*, que presenta un amplio espectro antimicrobiano contra una variedad de bacterias orales. La raíz de alba de *Morus* ha sido usada tradicionalmente en los países asiáticos para estos propósitos medicinales debido a su poder antiinflamatorio y actividad antibacteriana especialmente en bacterias como *Staphylococcus*, *Bacillus subtilis*. El *Kuwanon* es una de las plantas mas populares vendida en los mercados de Corea de esta se reportan investigaciones de sus propiedades antibacterianas basados en estudios de concentración mínima inhibitoria que demostraron resultados contra el *S. mutans*, *S. sanguis*, *Porphyromonas gingivalis*. La bibliografía también reporta *S. Propoleon* que es también ampliamente utilizada en Norteamérica, Australia y Brasil se reportan estudios *in vitro* relacionados con su actividad antibacteriana sobre bacterias orales como *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* *Prevotella* El *propolis* o *propóleos* un compuesto resinoso y pegajoso, elaborado por la abeja tiene efecto importante sobre *Porphyromonas gingivalis*^(23,116,121)

Por su parte, gran parte de la población en Bolivia por sus bajos recursos y por factores culturales tiene elevada preferencia a la medicina tradicional por estar más al alcance de las clases menos favorecidas y porque presenta reconocidos precedentes en el efectivo uso terapéutico de plantas medicinales tales como la *manzanilla*, *salaya*, *llantén*, *arrayán*, *chillca*, *urtica dioica*, *Andrographis Panicula*, entre otras conocidas entre la población boliviana.

En nuestro país se evidencio en estudios preliminares en nuestro laboratorio que *Aphyllocladus spartioides weddell* planta utilizada utilizada como medicina tradicional para el manejo de las inflamaciones de las encías o sangramiento, tal efecto se verifico con el extracto acuoso de la planta tanto *in vitro* como *in vivo* en enjuagues, donde tiene la capacidad de inhibir ciertas bacterias tales como *Fusobacterias*, *Treponemas*, *Estreptococos* en cultivo. Estudios piloto realizados con pacientes que mostraron gran mejoría de síntomas gingivoperiodontales.

En este marco se ha seleccionado a la Akhana con base tanto en el conocimiento popular, como en los antecedentes de estudios anteriores, para proseguir con los estudios de seguridad pre-clínica, que permita para la validación de su uso como agente terapéutico.

Estos estudios se los realizo evaluando al extracto a diferentes concentraciones para determinar su efecto toxico *in vitro*, para así poder conocer a las concentraciones a las cuales tendrá inocuidad el extracto para luego realizar estudios en pacientes que cursen las enfermedades periodontales y así poder realizar un seguimiento clínico que evidencie la efectividad del extracto *in vivo*.

V.Marco Teórico.

Las enfermedades gingivoperiodontales son procesos infecciosos cuyo factor etiológico esencial es la biopelícula de placa dental bacteriana. No obstante, estas se encuentran condicionadas por una cantidad de factores no clarificados en su totalidad.

Entre las causas de la enfermedad periodontal (EP) podrían encontrarse procesos intrínsecos al ser humano, como la respuesta del portador. Se han señalado, entre los factores asociados a tomarse en cuenta: están la edad, estado nutricional, situación económica y la biología de la placa; estos factores asociados se confirman como factores de riesgo. No obstante, resulta premonitorio encuadrar a las enfermedades gingivoperiodontales por tales factores, los cuales no siempre son una constante en periodontitis. En las últimas décadas se ha discutido la importancia relativa de las bacterias, de los factores locales que facilitan su desarrollo, como así también las influencias sistémicas en la etiología de la enfermedad periodontal. (1,2,4,7,53,106)

A. ETIOPATOGENIA DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL

1. Principales microorganismos de la boca

Normalmente existe en los tejidos que rodea el surco gingival un proceso leve inflamatorio sin manifestaciones clínicas, que es consecuencia de la interacción entre los microorganismos que lo colonizan habitualmente y los sistemas de defensa del surco que evitan el ingreso de los gérmenes a los espacios titulares. La ruptura de este equilibrio es la que produce el estado de enfermedad. Con las reservas necesarias, se habla de una microbiota subgingival normal en la que predominan entre otros: *Streptococcus sanguis*, *Actinomyces viscosus*, *Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium spp.*, *Prevotella spp* y *Veillonella spp*. También existe en el surco gingival sano, un pequeño número de células tales como leucocitos polimorfos nucleares, macrófagos, linfocitos y células plasmáticas que provienen de la trasudación del tejido que rodea al surco. Esta es una zona de permanente enfrentamiento entre los elementos de agresión del entorno, que se acumulan en un sitio apto para esto y la defensa que sale al encuentro. Esta generalmente se impone, si las condiciones de higiene evitan la sobre acumulación de los microorganismos y la formación de la placa bacteriana. Si se sobrepone el componente agresor, por acumulación *in situ* sobreviene la destrucción por el propio hospedero como producto de una reacción

inflamatoria (hipersensibilidad), con liberación de enzimas líticas que causa destrucción del tejido conectivo. (4,7,12,29,33,36,141,)

La placa subgingival ejerce su efecto sobre los tejidos periodontales en función de una serie de etapas que a menudo se interrelacionan entre si:

a) - Colonización: o llegada, entrada, establecimiento y multiplicación de los microorganismos en el surco gingival, favorecida por las condiciones anaerobias del surco y los sistemas nutricionales. La presencia de bacterias con adhesinas contribuirá al proceso de colonización mediante fenómenos de adhesión al esmalte, agregación y coagregación, con lo que se estructura un autentico nuevo microecosistema

b) - Penetración: o capacidad de los microorganismos, o los productos por ellos elaborados, para atravesar el epitelio y alcanzar el tejido conectivo y hueso alveolar.

No se conocen bien los mecanismos por los que los microorganismos atraviesan el epitelio; sin embargo se postulan teorías como el poder invasivo inherente de las exotoxinas de naturaleza enzimática como las colagenasas, las fibronolisinas, la hialuronidasa, las keratinazas y otras, que destruirán la matriz extracelular y el cemento intracelular para formar una penetración activa.

c) – Destrucción tisular. Puede ser directa microbiana o indirecta a través del hospedero, mediante la destrucción directa del limite epitelial. Esto habitualmente se debe a la elaboración de diversas sustancias por parte de las bacterias, o a la presencia de elementos estructurales. Se cita entre estos:

Exotoxinas:

- Epitelio- toxinas que favorecen el avance microbiano.
- Leucotoxinas, con gran actividad sobre leucocitos polimorfo nucleares, que comprometen los mecanismos defensivos en el surco gingival.

Elementos estructurales:

- *Endotoxinas:* Posee una serie de actividades biológicas, que son consecuencia de acciones directas en el proceso de la inflamación. Los efectos mas importantes a nivel periodontal son los siguientes :
- Produce de forma directa neutropenia al activar células que liberan mediadores, los cuales estimulan moléculas de adherencia leucocitarias y endoteliales.
 - Agrega las plaquetas
 - Activa el factor XII del sistema de coagulación (factor importante en el proceso de la inflamación).
 - Activa el complemento por vía alterna
 - Tiene efecto citotóxico sobre los fibroblastos.
 - Inhibe el crecimiento de los fibroblastos.
 - Induce la reabsorción ósea, por activación de los osteoclastos del hueso alveolar que a su vez secretan colagenasas y fosfatasa.
 - Determina la liberación de procolagenasas, prostaglandinas (PGE₂), interleucina 1, factor de necrosis tumoral y factor de crecimiento transformable *B e ta* especialmente por los macrófagos.
 - Activa de forma policlonal los linfocitos B
 - Ejerce una acción toxica sobre los macrófagos e induce la liberación de enzimas líticas.
 - Tiene capacidad para penetrar a través del epitelio

Todas las bacterias gramnegativas localizadas en el surco gingival están dotadas de endotoxinas, que son lipopolisacáridos de la pared, que son estructuras muy parecidas entre los diferentes microorganismos.

- *Mureina:* Induce distintos tipos de respuestas del hospedero, tales como la activación del complemento por la vía alterna, la estimulación de la reabsorción ósea, la inducción de los macrófagos para que produzcan (PGE₂) y colágenas

- *Cápsula*: Ejerce una acción antiopsonizante por la que se constituye en un mecanismo de evasión de la respuesta inmune del hospedero, hasta el momento solo
- en P gingivales se ha reconocido la existencia de un material capsular que podría tener esta acción.
- Fimbrias y otras adhesinas. Gracias a ellas las bacterias periodontopatogenas se favorecen, hasta cierto punto, en su avance.
- Flagelos y estructuras relacionadas: La movilidad bacteriana asociada a flagelos, podría también ir ligada al avance tisular bacteriano en los tejidos periodontales

Enzimas

- Asociadas con la destrucción tisular.
 - Colagenasas que actúan sobre el colágeno no modificado del tejido conectivo subepitelial, ligamento periodontal y hueso alveolar afectando su arquitectura y alternando su función.
 - Tripsinas que actúan sobre el colágeno alterado.
 - Estimuladores de la liberación de pro-colagenasas por los neutrofilos, fibroblastos y macrófagos.
 - Hialuronidasa, que favorece la difusión tisular microbiana por el tejido conectivo al degradar el cemento intercelular (ácido hialuronico).
 - Fosfatasa ácida y alcalina que determinan perdida de hueso alveolar.
 - Condroitinsulfatasa que ataca al condrotin sulfato B, presente en el tejido conectivo con lo que promueven su destrucción.
 - Otras, como gelatinasa, aminopeptidasas, ADNasa, Ranaza, Keratinasa y fibrinolisinias, producidas por diversas bacterias periodontopatogenas.
- Moléculas asociadas con alteración de los mecanismos defensivos del hospedero.
 - Neuroaminidasas, que hidrolizan glucoproteinas sericas.

- Proteasas que provocan destrucción de inmunoglobulinas y fracciones del complemento; los microorganismos elaboran numerosas enzimas que actúan sobre otras proteínas plasmáticas que intervienen en la respuesta inflamatoria.
- Leucocidinas, que modifica el funcionamiento de los glóbulos blancos involucrados en la defensa tisular.
- Fosfolipasa A; Entre la que destaca la FLA₂ citosólica que actúa como generador del precursor de las prostaglandinas, y la FLA₂ secretoria, que es responsable de la lisis celular.

Metabolitos

Muchas bacterias periodontopatógenas producen una amplia gama de productos metabólicos finales, que pueden ser tóxicos para los tejidos del hospedero: indol, sulfhídrico, amoníaco, aminas como cadaverina y putrescina.

Citotoxicidad

Sobre los neutrófilos, linfocitos y monocitos actúa la leucotoxina de *A. actinomycetemcomitans*. También debe destacarse que bacterias como *A. viscosus* y *Capnocytophaga spp.* poseen factores que inhiben la proliferación de fibroblastos y por tanto la síntesis de colágeno interfiriendo con la reparación tisular.

Activación Policlonal de los linfocitos B

Al producirse esta activación por la endotoxina (LPS) de la pared de bacterias gramnegativas, las células plasmáticas forman anticuerpos no relacionados con el agente inductor, se producen inmunocomplejos que activan el complemento y los linfocitos liberan citocinas proinflamatorias con las consecuencias de daño a nivel periodontal. ^(33,39, 53,140,142)

Activación de los linfocitos T citotóxicos/supresores (T₈)

El número de estas células puede ser particularmente importante por su capacidad para retardar o reducir la respuesta inmunitaria humoral o celular especialmente en los inicios de la periodontitis.

Inhibición quimiotáctica de los neutrófilos

Producida por factores no tóxicos, que al evitar que los neutrófilos sean atraídos al foco son impedidos de llevar a cabo sus funciones fagocíticas, permitiendo la inflamación de focos infecciosos en el periodonto. Estas son elaborados por *P. gingivalis*, *A. actinomycetocomitans*, *Captocytophaga spp.* y *Fusobacterium spp.*

Todos estos factores actúan como mediadores de la evasión de la respuesta inmune, hecho que favorece el eventual proceso infeccioso. De esta forma, los microorganismos que tienen mayor capacidad de evasión serán los más patogénicos en este proceso.

FACTORES LOCALES DEL HOSPEDERO

La mayor parte de los componentes orgánicos relacionados con las placas supra y subgingival son antihigiénicos y por tanto, desencadena una respuesta por parte del hospedero. Estos hechos explican en buena medida no solo la patogenia de la periodontitis, sino también la de las gingivitis.

La reacción local se lleva cabo mediante la inflamación; esta se caracteriza por un aumento de la permeabilidad de los vasos y una reducción de la velocidad del flujo sanguíneo en los tejidos afectados. Los mediadores liberados son muy variados: histamina, prostaglandinas, materiales lisosómicos, citocinas, calicreina y otros. En la segunda línea defensiva, superada la barrera mecánica estructural del periodonto, se produce una reacción vascular y una reacción celular que se traduce en una acumulación de leucocitos y macrófagos, atraídos por factores quimiotácticos, que derivan de las células, tejidos y de los propios

productos bacterianos. El proceso fagocítico, puede aislar el daño local en el tejido afectado, eliminar al agente agresivo y producir la curación.^(53,140,142)

Si esto no ocurre (inmunidad inespecífica) se pone en marcha una tercera línea defensiva, que sería la producción de anticuerpos (reacción humoral) y de linfocitos (reacción celular) o de ambas, simultáneamente (inmunidad específica). De estos últimos fenómenos surgen reacciones de hiperrespuesta, de las que puede derivarse protección o daño local, alternativamente puede haber o una falta de respuesta que igualmente puede conducir a un efecto lesivo.^(1,2,7,8,33,36)

RESPUESTA NORMAL

Reconocida como respuesta defensiva o protectora, se produce cuando existe integridad de las estructuras del periodonto, una adecuada reacción vascular y celular en la segunda línea defensiva y cuando los elementos contenidos en el líquido gingival son capaces de neutralizar la agresión microbiana con ella se aísla el tejido dañado, se eliminan las bacterias y se reparan las lesiones producidas y finalmente se lleva a cabo la curación. Se asume que la carga microbiana de agresión está limitada por las medidas higiénicas con lo que el hospedero mantiene su homeostasis y su inmunoregulación. Por esto, la condición fisiológica normal es un adecuado equilibrio con su entorno (nutrición, oxigenación, ausencia de contaminantes, fatiga, etc.)⁽⁵⁶⁾

HIPERRESPUESTA

En las periodontitis primarias asociadas a la placa puede intervenir las hipersensibilidades tipo I, III y IV. Estas conllevan la hiperactivación del complemento por la vía alterna y a las células fagocíticas que, de forma independiente, llevan a cabo una fagocitosis excesiva, dentro de un proceso de inflamación que puede conducir al daño tisular, mediado también por la liberación de enzimas líticas (PLA₂, proteasas, etc.)

ANAFILAXIA O HIPERSENSIBILIDAD TIPO I

Se produce cuando la inmunoglobulina E (IgE) dirigido contra antígenos de la placa se fija a los mastocitos provocando la degranulación celular y la liberaron de diversos compuestos entre los que destacan la histamina, factores quimiotacticos de neutrofilos y eosinofilos, metabolitos del ácido araquidonico, (leucotrienos prostaglandinas y tromboxanos), factor de agregación plaquetaria y heparina. Todos ellos están implicados de alguna forma en el proceso inflamatorio o anafiláctico a nivel periodontal. ^(140,142)

REACCIÓN POR INMUNOCOMPLEJOS O HIPERSENSIBILIDAD TIPO III

Los elementos antigénicos bacterianos de la placa subgingival, en el surco, y penetran especialmente en el tejido conjuntivo subepitelial y activan a los macrófagos, en el proceso de inflamación con daño tisular y reabsorción ósea, siempre en el supuesto caso de que los mecanismos reguladores no controlen estos fenómenos. A nivel extravascular se forman complejos antígeno-anticuerpo que fijan el complemento por la vía clásica, que inducen una vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular, mediante sus fracciones C_{3a} y C_{5a}. De esta forma se liberan nuevamente PGE₂, radicales de oxígeno, enzimas lisosómicas, citocinas y otros mediadores de la inflamación, Toda esta secuencia de acontecimientos determina, cuando tienen carácter repetitivo, inflamación local, destrucción tisular y reabsorción ósea.

REACCIÓN CELULAR O HIPERSENSIBILIDAD TIPO IV

El papel de los macrófagos es tan importante como en la hipersensibilidad tipoIII: en este caso, los antígenos son procesados por los macrófagos y presentados junto con los determinantes CMH de clase II, a los linfocitos T₄ que, activados, producen citocinas, entre las que destacan Interleucina 2, Interleucina 3, Interleucina 4, Interferón gamma, Factor de

necrosis tumoral *B*, Factor inhibidor de la migración de los macrófagos. La acción de estos mediadores lleva a la acumulación de células fagocíticas, liberación de mediadores como PGE_2 , y citocinas de macrófagos y linfocitos, radicales de oxígeno y enzimas lisosómicas, lo que determina, en definitiva, inflamación, daño tisular y reabsorción ósea. Este último fenómeno es la consecuencia de la aparición de osteoclastos, como efecto de la activación de los macrófagos por linfocinas^(29,33,39,53,)

RESPUESTA INSUFICIENTE

Cuando la respuesta del hospedero se encuentra por debajo de los límites normales existe una falta o deficiencia del control microbiano y de todos sus factores de virulencia; esto determina una mayor agresividad de las bacterias y una progresión más rápida de los procesos. Tal situación se produce a consecuencia de que ciertas bacterias que evaden la respuesta inmunitaria o por causas específicas de los hospederos, tanto locales como sistémicos.

FACTORES LOCALES SOBREAÑADIDOS DEL HOSPEDERO

Son todos aquellos que alteran los mecanismos locales de respuesta del hospedero en el periodonto o tejidos circunvecinos, además de la etiología bacteriana, por ejemplo, se reconoce el traumatismo por oclusión que según la OMS es la "Lesión del periodonto, causada por sobrecarga de los dientes originada directa o indirectamente por los dientes del maxilar opuesto". También debe citarse la disposición de los dientes que pueden generar espacios adecuados para la retención de alimentos y contaminación. Asimismo, puede considerarse la hipoxia tisular por disfuncionamiento de las reacciones vasculares o por compresión, hecho que genera trastornos en el potencial redox local con las consecuentes fallas en el funcionamiento celular.^(82,142,107)

FACTORES SISTÉMICOS DEL HOSPEDERO

Se trata de enfermedades generales que, de alguna forma, repercuten en la respuesta del hospedero en el periodonto; tenemos como ejemplo: a la Diabetes, Síndrome de Down, enfermedad de Addison, SIDA, y otros. El estrés y la medicación no controlada, puede predisponer a través de trastornos vasculares (espasmos sostenidos) que determinan como se estableció antes hipoxia tisular o trastornos consecuentes a la inmunosupresión e inmunodisregulación que generan.

2. Enfermedad Gingival.

La gingivitis es la etapa más temprana de la enfermedad periodontal, se caracteriza por una inflamación que afecta los tejidos blandos que rodean al diente, fundamentalmente la encía, presentando procesos infecciosos e inflamatorios como respuesta al crecimiento de la placa dental sobre la superficie dentaria. ^(1,3,143)

TIPOS DE ENFERMEDAD GINGIVAL

GINGIVITIS INESPECÍFICAS ASOCIADAS A PLACA

Denominada también gingivitis crónica o gingivitis simple, constituye la mayoría del total de este tipo de enfermedades y desde el punto de vista epidemiológico la gingivitis afecta prácticamente a toda la población, siendo un cuadro clínico reversible, que evoluciona en brotes de intensidad y duración variables. Las gingivitis inespecíficas constituyen la mayoría del total de ellas y su causa es el control inadecuado de la placa bacteriana mediante las medidas de higiene oral, si una persona no realiza un control de placa todos los individuos llegan a presentar gingivitis entre 1 y 3 semanas. Es de origen multimicrobiano y esta relacionada con la placa supragingival más próxima a la unión dentogingival: Son las bacterias de la misma, facilitadas por el tártaro (material compuesto por polisacáridos, bacterias y sales calcicas precipitadas conformando una matriz orgánica

mineral con que alberga un microsistema bacteriano) y sus productos las que inducen el proceso inflamatorio. Desde el punto de vista clínico, como todas las gingivitis, se caracterizan por una hemorragia gingival espontánea o producida por estímulos como el cepillado.

GINGIVITIS INESPECÍFICAS ASOCIADAS A PLACA

Denominada también gingivitis crónica o gingivitis simple constituye la mayoría del total de este tipo de enfermedades y desde el punto de vista epidemiológico la gingivitis afecta prácticamente a toda la población, siendo un cuadro clínico reversible, que evoluciona en brotes de intensidad y duración variables. Las gingivitis inespecíficas constituyen la mayoría del total de y su causa es el control inadecuado de la placa bacteriana mediante las medidas de higiene oral, si una persona no realiza un control de placa todos los individuos llegan a presentar gingivitis entre 1 y 3 semanas. Es de origen multimicrobiano y esta relacionada con la placa supragingival más próxima a la unión dentogingival: Son las bacterias de la misma, facilitadas por el tártaro (material compuesto por polisacáridos, bacterias y sales calcicas precipitadas conformando una matriz orgánica mineral con que alberga un microsistema bacteriano) y sus productos las que inducen el proceso inflamatorio.

Desde el punto de vista clínico, como todas las gingivitis, se caracterizan por una hemorragia gingival espontánea o producida por estímulos como el cepillado^(142, 143)

GINGIVITIS ESPECÍFICAS

Reconocen un microorganismo como Ejemplo Herpes simple, angina, la sífilis, candidiasis, actinomicosis, histoplasmosis, etc.

GINGIVITIS ULCERATIVA NECROZANTE AGUDA (GUNA)

Se refiere a una enfermedad inflamatoria aguda destructiva de la encía, se conoce también como infección de Viniste o gingivitis fusospiroquetal. Se caracteriza por la destrucción de las papilas interdetales y a menudo del borde gingival, que producen intenso dolor. En

su génesis se han señalado diversos factores, entre estos los orales, como falta de higiene o el tabaquismo y sistémicos como el estrés o enfermedades debilitantes y carencias nutricionales. Desde el punto de vista microbiológico se implican diversas asociaciones bacterianas, con un predominio de Espiroquetas y bacilos fusiformes, (treponemas, *Fusobacterium nucleatum* spp. *Leptotrichia*, *selemonas* spp. y *Prevotella melaninogenica*)

GINGIVITIS DEL SIDA

Tiene una tendencia evolutiva más agresiva que la GUNA hacia la destrucción periodontal grave, implicándose en estos casos otros microorganismos. Su gravedad y evolución se asocia a la diferencia inmunológica para controlar la penetración microbiana.

GINGIVITIS INDUCIDA POR HORMONAS ESTEROIDEAS

Se manifiesta como gingivitis puberal, gingivitis del embarazo y gingivitis asociada a control de la natalidad y terapia esteroidea.

ENFERMEDAD PERIODONTAL

Cuatro estructuras en forma colectiva, el periodoncio, revisten a los dientes y los sostienen en sus relaciones funcionales entre si: Ellas son 1) el hueso alveolar, que esta formando por el alveolo que rodea la raíz del diente en desarrollo; 2) el cemento que es una matriz calcificada depositada sobre la raíz del diente por células diferenciadas del ligamento (o membrana) periodontal 3) el ligamento periodontal propiamente dicho, que tiene fibras colágenas transversales que anclan el diente por inclusión respectivamente en el hueso alveolar y en el cemento; y 4) la encía, que en estado de salud forma un apretado mango alrededor del cuello del diente^(1,29,33,53)

El periodoncio esta sujeto a una diversidad de patologías, denominadas en forma colectiva aunque imprecisa, *enfermedad periodontal*. Lo que se quiere decir en general por el termino sin modificar de enfermedad periodontal es un proceso inflamatorio crónico, de avance lento y destructor, que afecta a uno o mas de los cuatro componentes del periodoncio;

literalmente, una periodontitis crónica. Emplearemos gingivitis para la inflamación fácilmente reversible que comprende la encía marginal y periodontitis para la inflamación que se extiende más profundamente en el periodoncio.

Los rasgos principales de este síndrome son:

1. Aparición con mayor frecuencia en personas aparentemente saludables.
2. Acumulación en el margen gingival de placa bacteriana, que se mineraliza para formar tártaro subgingival progresivo.
3. Inflamación crónica de la encía y el ligamento periodontal, con degeneración de la sustancia fundamental y las fibras colágenas del tejido conectivo.
4. Migración apical del manguito epitelial.
5. Formación de bolsas periodontales, en las que se acumula mayor cantidad de bacterias y restos acompañados de un exudado purulento.
6. Reabsorción del hueso alveolar y en menor medida del cemento, con pérdida de anclaje de las fibras colágenas periodontales y consiguiente movilidad y eventual salida del diente.

3. Enfermedad periodontal

La periodontitis es una enfermedad infecciosa que presenta lesión celular y tisular avanzada, con daño en la estructura del periodonto prácticamente irreversible; en su avance se manifiesta por la inflamación de los tejidos del periodonto, determinando la destrucción de la inserción y el soporte de las piezas dentarias. Involucra diversas regiones anatómicas y crea deformaciones estructurales severas en la unidad dentogingival y en la unidad dentó alveolar. ^(140,142)

Procesos periodontales primarios asociados a la placa: patógena

Como se ha señalado, las gingivitis inespecíficas están inducidas por microorganismos de la placa supragingival más próxima a la unión dentogingival. Sin embargo, no todos los

individuos con gingivitis progresan a una periodontitis. Para que esto ocurra es preciso que intervengan una serie de factores: los externos como la placa, el cálculo y los factores locales o internos, propios del hospedero a nivel del periodonto, en forma de hiperrespuesta.

Formas clínicas de periodontitis primarias asociadas a la placa

Las distintas formas de periodontitis son:

Periodontitis del adulto

Puede tener un comienzo en la adolescencia o más adelante, la prevalencia y gravedad aumentan con la edad y esta directamente relacionada con la presencia de placa y cálculo. Su evolución suele ser lenta y no parece tener predilección por ningún sexo. La destrucción ósea y de periodonto es vertical más que horizontal, la movilidad dentaria tiende a ser más intensa.

Periodontitis rápidamente progresiva

Aparece en poblaciones adultas jóvenes y típicamente desde los 20 a los 30 años. Se caracterizan por presentar una evolución rápida, con dolor, hemorragias y proliferación de la encía marginal. Las lesiones son generalizadas y afectan a casi todos los dientes en etapas avanzadas con rápida pérdida de tejido conectivo y hueso alveolar. Hay una mayor incidencia en las mujeres que en los varones. Los pacientes suelen tener otra patología asociada, como otitis media, infecciones de las vías respiratorias y de la piel.

Periodontitis juvenil

Tiene su comienzo alrededor de la pubertad. Se observa una discrepancia entre la gravedad de la destrucción periodontal y la escasez en la cantidad de placa y signos de inflamación. En las mujeres, que son las principales afectadas suele haber otras patologías asociadas. En la forma localizada se muestra como microorganismo predominante a *A.*

actinomycetocomitans con gran diferencia sobre los demás, frente al que hay tasas elevadas de anticuerpos. Cuando el proceso se generaliza, se detectan niveles mas bajos de anticuerpos, excepto frente a *P. gingivalis* y una microbiota periodontal abundante muy similar a la periodontitis rápidamente progresiva^(1,2,3, 142,143)

Periodontitis postjuvenil

Se trata de una entidad clínica todavía no perfectamente definida. Afecta a individuos entre los 20 y 35 años, preferentemente mujeres y puede ser el resultado de una disminución en la tasa de destrucción periodontal característica de las periodontitis rápidamente progresivas y juveniles, mostrando entonces una afectación más compatible con las periodontitis del adulto. Se trataría de una forma transicional, tanto desde el punto de vista microbiológico como inmunológico.

Periodontitis prepuberal

Es una situación rara, que se caracteriza por presentarse en niños de menos de 12 años. Cursa con una inflamación gingival grave, rápida pérdida de hueso, movilidad y pérdida dentaria.

PERIODONTITIS ASOCIADAS A ENFERMEDADES SISTÉMICAS

Tratamiento mielo supresor

Los pacientes afectados de leucemias y con tratamiento inmunosupresor muestran un alto riesgo de presentar periodontitis, con formación de abscesos, especialmente en los periodos en que existe granulocitopenia.

Esta asociado a la disminución de la capacidad del hospedero para controlar procesos infecciosos locales, particularmente en zonas como esta, altamente expuesta a una sobrecarga bacteriana.

Neutropenia

Los pacientes con neutropenia crónica o cíclica de origen genético muestran frecuentemente periodontitis generalizadas progresivas.

Diabetes

Los pacientes con diabetes tipo I muestran un alto riesgo de padecer periodontitis, como consecuencia de la alteración secundaria de los neutrófilos. Los pacientes con diabetes tipo II también tienen, aunque en menor grado, riesgo de padecer periodontitis^(33,102)

Síndrome de papillon-lefevre

Raro proceso hereditario con carácter autosómico recesivo, caracterizado por hiperqueratosis difusa palmo plantar y periodontitis rápidamente progresiva.

Sida

Los pacientes con esta enfermedad muestran una elevada tendencia a padecer periodontitis rápidamente progresivas con pérdidas completas de inserción ósea de 3 a 6 meses. También se manifiestan frecuentemente como periodontitis ulceronecrotantes.

Periodontitis refractaria

Se refiere a ciertas localizaciones que presentan algunos pacientes, que continúan mostrando pérdida de inserción, después de un tratamiento aparentemente apropiado. Estas localizaciones presumiblemente continúan infectadas por bacterias periodontopatógenas.

B. Diagnóstico. Los rasgos principales de la enfermedad gingivoperiodontal son:

Examen clínico gingival

- Enrojecimiento gingival
- Sangramiento y edema
- Cambios en el contorno gingival
- Cambios de tamaño y posición
- Flujo aumentado de fluido gingival crevicular
- Respuesta inflamatoria a la acumulación de bacterias sobre la superficie dentaria.

Examen Clínico Periodontal: Signos de la inflamación

- Cambio de color
- Aumento de volumen
- Pérdida de la textura
- Agrandamiento Gingival
- Pérdida del bisel
- Dolor, ulceración y pérdida de la función

Características Clínicas

- Formación de la bolsa o saco periodontal.
- Sangramiento, edema y supuración.
- Pérdida de inserción en relación a la unión cemento-esmalte.
- Recesión del margen gingival.
- Movilidad dentaria.

Formación de la bolsa o saco periodontal

- Acumulación de la placa bacteriana supragingival
- Inflamación y respuesta inmune del huésped
- Destrucción de la inserción de tejido conectivo
- Migración apical del epitelio de unión
- Aumento de la placa bacteriana subgingival
- Destrucción de hueso alveolar.

Los niveles de hueso alveolar se evalúan mediante:

- Examen clínico
- Examen radiográfico
- Por sondeo :
 - Altura y contorno de los huesos vestibulares
 - Arquitectura de hueso interdental.

Características radiográficas

- Pérdida de hueso alveolar
- Defectos óseos verticales y horizontales
- Lesiones de furcación
- Ensanchamiento del espacio del ligamento
- Presencia de cálculo

Existen muchos otros signos de enfermedad periodontal, los que destacan son:

- Las encías sangran al cepillarse los dientes
- Encías rojas, inflamadas o dolorosas.
- Encías flojas y sueltas
- Halitosis persistente
- Pus entre los dientes y las encías

- Dientes sueltos o que estén separados
- Cambios en la mordida
- Cambios en la adaptación de las dentaduras parciales.

C. Tratamiento

1. BASES MICROBIOLÓGICAS PARA EL CONTROL DE LAS PLACAS DENTALES

Debido a que las enfermedades de la cavidad oral, con mayor prevalencia caries, gingivitis y periodontitis, tienen su origen en la existencia de una placa previa, se han realizado grandes esfuerzos para encontrar la forma de prevenirla y eliminarla. Los distintos métodos utilizados para encontrar la forma de prevenirla y eliminarla. Pueden clasificarse en tres grupos de procedimientos: antibacterianos, bloqueadores de la adhesión y mecánicos^(7,12,29,33,61)

2. Tratamiento Farmacológico

a.AGENTES ANTIBACTERIANOS

1. CONDICIONES DEL AGENTE

Aunque es difícil que exista alguno que reúna todas las características que a continuación se citan, se intentara que cumplan la mayor parte de los siguientes requisitos:

- Deben tener un cierto requisito de especificidad sobre los microorganismos de las placas.
- Deberán penetrar en la placa y quedar retenidos en el ambiente oral durante largo tiempo.
- Debe ser bactericida para evitar fenómenos de resistencia.
- No tendrán en efecto toxico ni alérgico para el hospedero.
- Deben ser estables para que ejerzan una acción prolongada.

- Deben tener un sabor aceptable, bien por si mismos, o por una combinación con otros agentes.
- Su costo será bajo y fácil su producción
- Por ultimo, no deben interferir a los procesos de reparación tisular.

2. PRINCIPALES AGENTES UTILIZABLES

- Antibióticos: entre los más empleados se encuentran la penicilina, la vancomicina, la kanamicina, las tetraciclinas, ciprofloxacina, metronidazol, quinolonas de cuarta generación. Si estos agentes suponen un tratamiento continuo, su costo será muy elevado y podrían sensibilizar al hospedador. Sin embargo, lo más grave es que contribuirá a crear una progresiva resistencia bacteriana, sin aportar ningún beneficio evidente con respecto a otros compuestos. ^(74,148)
- Antisépticos: Como las Biguanidinas. De ellas la más utilizada es la clorhexidina, a dosis elevadas se comporta como bactericida, alterando la permeabilidad de la membrana citoplasmática bacteriana. A bajas concentraciones es bacteriostática, interfiriendo el mecanismo de acción de la fosfoenolpiruvato fosfotransferasa. Sin embargo, su acción en la cavidad oral se ejerce, más que por su actividad antibacteriana secundaria, por su efecto inhibitorio primario de algunos mecanismos de adhesión a superficies epiteliales y dentales. Se han reportado efectos irritantes sobre células lo que podrían interferir en la reparación tisular.
- Floruros. Su uso está ligado a su capacidad para disminuir la solubilidad del esmalte, más que a su efecto antiplaca y antibacteriano. Aunque, considerado como un agente de segundo orden, el fluor tópico tiene una acción antimicrobiana significativa.
- Fosfatos: Diversas formas de fosfatos pueden ser útiles. Además de su acción beneficiosa sobre el esmalte, impiden la caída del pH de la placa y proporcionan compuestos a las bacterias que economizan los que podrían sustraer del esmalte, o porque al reaccionar con lípidos o proteínas superficiales bacterianas bloquean mecanismos de agregación y co-agregación.

3. BLOQUEANTES DE LA ADHESIÓN

Además del flour y la clorhexina que se ha visto, interfieren en el proceso de adhesión para tal fin pueden también utilizarse:

- Vacunas: Se han desarrollado especialmente frente a proteínas superficiales y glucosiltransferasas que intervienen en procesos adhesivos de *Streptococcus mutans*.
- Preparaciones enzimáticas. Tales como destranasas, que hidrolizan glucanos (que son la matriz orgánica de la placa), o invertasas, que escinden en la sacarosa antes de ser asimilada por las bacterias.
- Selladores de fisuras: previenen la placa en las principales áreas de estancamiento. Son precisamente estas zonas las que menos se benefician del auto limpieza, de las técnicas de higiene oral y del efecto del flour.
- Sustitutos de la sacarosa. Los poli alcoholes como manitol y sorbitol, que son fermentados por Estreptococos del grupo mutans y lactobacilos tienen una metabolización lenta. El xilol 5-fosfato ya que no puede metabolizarse, inhibe la glucólisis normal, y representa un desperdicio de energía para la célula que afecta indirectamente a su crecimiento.

4. ELIMINACIÓN MECÁNICA DE LA PLACA

Actualmente, este constituye el método idóneo para su control. El más importante y conocido es el cepillado de los dientes que, junto con el dentífrico y con la ayuda de la seda dental permite remover y eliminar gran parte de la placa bacteriana de las superficies accesibles de la corona del diente.

D. ESTUDIO PRECLÍNICOS

El desarrollo de un medicamento incluye, todos aquellos estudios que se realizan “in vitro” y/o en animales de experimentación, diseñados con la finalidad de obtener la información necesaria para decidir si se justifican estudios más amplios en seres humanos sin exponerlos a riesgos injustificados. Si bien muchos de los estudios preclínicos deben anteceder a los estudios clínicos, aquellos que requieren períodos prolongados para su ejecución o son estudios especiales, se continúan durante las primeras fases de los estudios clínicos^(47,50,63,121)

En los estudios de toxicidad mediante el uso de animales y/o métodos alternativos se realizan las siguientes pruebas:

- Toxicidad aguda
- Toxicidad subaguda
- Toxicidad subcrónica y crónica
- Estudios de carcinogénesis
- Estudios de toxicocinética
- Mutagénesis
- Teratogénesis
- Toxicidad peri y post-natal

1. ESTUDIOS DE TOXICIDAD

El objetivo de los estudios de toxicidad es evaluar el riesgo o peligro potencial que un agente químico o físico puede ocasionar sobre la salud humana cuando es objeto de exposiciones agudas o crónicas. No se limitan sólo a los fármacos sino que la mayor parte de las sustancias químicas industriales (pesticidas, agroquímicos, cosméticos, plásticos, etc.) son objeto de estudios de toxicidad iguales o más complejos que los realizados con los nuevos fármacos

a.TOXICIDAD

Es el estudio cualitativo y cuantitativo de los efectos deletéreos ocasionados por agentes químicos o físicos sobre la estructura y función de los sistemas vivos y la aplicación de estos estudios para la evaluación de la seguridad y prevención de daños al hombre y a las formas de vida útiles.^(45,50,51)

Los nuevos medicamentos en desarrollo son objeto de estudio de la farmacología como de la toxicología. La toxicidad constituye hoy en día una parte muy importante dentro del desarrollo de un nuevo fármaco.

b.LOS MÉTODOS ALTERNATIVOS.

Los métodos alternativos, además de utilizarse en la valoración de la toxicidad durante la fase preclínica de los posibles nuevos fármacos, también se utilizan en la investigación biomédica, en la educación y en la valoración de la toxicidad de compuestos químicos.()

Clasificación de los métodos alternativos:

- Intercambio de la información toxicológica.
- Mejora de diseño en la experimentación animal
- Modelos matemáticos (QSAR).
- Estudios humanos :

Epidemiológicos

Toxico vigilancia

Voluntarios

Técnicas in vitro :

- Cultivos de embriones
- Cultivo de órganos

- Órganos profundidos
- Explantes. Cultivos órgano típicos
- Cultivo de reagregados celulares
- Cultivo de células dispersas
- Cultivo de líneas celulares
- Modelos libres de células
- Microorganismos, algas.
- Otros: modelos en educación

c.VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ALTERNATIVOS.

La cantidad de métodos alternativos que se pueden desarrollar para el estudio de la toxicidad de un nuevo fármaco en desarrollo o de cualquier sustancia tóxica es prácticamente ilimitada.

Para que los datos toxicológicos suministrados por un método alternativo puedan ser utilizados para el registro de un nuevo fármaco se requiere que su protocolo haya sido previamente validado científicamente y en su caso, aprobado por las autoridades reguladoras.

Los criterios de validación son:

- Relación biológica del método con el proceso toxicológico.
- El desarrollo de una base de datos del procedimiento, con los resultados obtenidos por todos los laboratorios que lo han empleado.
- Variabilidad y reproducibilidad.
- Correlación buena con los datos obtenidos con los métodos in vivo, sensibilidad aceptable y selectividad.
- La evaluación de la metodología y de los resultados por un grupo de expertos internacionales desinteresados. Una vez realizada la evaluación definen la utilidad del método para predecir un determinado tipo de toxicidad, especificando bien sus capacidades y limitaciones.

2. Técnicas *in Vitro*

Inicialmente los sistemas *in vitro* fueron utilizados para estudios de biotransformación, y estudios mecanísticos básicos, pero en la actualidad, su ámbito de aplicación se ha extendido al desarrollo de modelos que permitan evaluar la potencial toxicidad orgánico específica, la irritación local y la terotogenicidad.

Según su finalidad, los ensayos *in Vitro*: pueden ser pruebas sustitutivas de los ensayos con animales, o bien a pruebas de criba previas a las de aquellos, o con carácter de complementarias para mejorar la sensibilidad y especificidad de los estudios con animales.

La configuración de los modelos experimentales empleados *in vitro* para valorar la toxicidad de los fármacos se fundamenta en dos pilares básicos, que son el sustrato biológico y los indicadores de toxicidad. ^(79,89,)

El sustrato biológico es el material generalmente orgánico, vivo o no, sobre el que se aplica *in vitro* el fármaco en estudio, y cuyas reacciones ante tal estímulo queremos extrapolar al hombre.

Estas alteraciones se valoran mediante los denominados indicadores de toxicidad, que son los parámetros que determinamos para cuantificar las modificaciones producidas en la estructura o fisiología de los componentes del sustrato del ensayo.()

Los principales sustratos biológicos empleados en los modelos experimentales de toxicidad *in vitro* son:

- Cultivos de embriones
- Cultivo y baño de órganos
- Órganos profundidos
- Explantes. Cultivos órgano típicos

- Cultivo de reagregados celulares
- Cultivo de células dispersas
- Cultivo de líneas celulares. Clones celulares

a).MODELOS LIBRES DE CÉLULAS

Los principales indicadores utilizados en los modelos experimentales de toxicidad in vitro son:

- Morfología celular y tisular
- Viabilidad celular
- Proliferación celular
- Actividad metabólica celular
- Contenido de sustancias reguladoras
- Utilización de la energía y alteraciones enzimáticas

Síntesis de macromoléculas:

- Inducción selectiva de proteínas
- Membranas celulares
- Composición y estabilidad
- Permeabilidad iónica
- Sistemas de transporte
- Estudio de la comunicación intercelular
- Indicadores específicos.

b).VENTAJAS DE LOS MODELOS IN VITRO:

En los casos en que se precisan, requieren un número considerablemente menor de animales, pues con fracciones de los órganos de un solo animal, pueden realizarse cientos de ensayos.

Utilizan material biológico muy homogéneo, obtenido con técnicas estandarizadas. Posibilitan además el uso de material de origen humano, de cadáveres o por biopsia en sujetos vivos, lo que puede simplificar en gran medida el proceso de extrapolación de los datos obtenidos. Permiten estudiar las acciones del compuesto sobre una determinada población celular o fracción subcelular aislada en la que se presuponga la diana principal o secundaria.

Con ello se evitan las interferencias producidas por otros órganos, células u orgánulos sobre la diana que estemos estudiando.

Los resultados presentan mayor reproducibilidad que los métodos con animales, al consistir cada ensayo en reacciones de unos pocos componentes, en condiciones controladas, sin interferencias de otros factores como el estrés del animal, los cambios estacionales, etc.

Facilitan determinados estudios especializados, como los toxicocinéticos de captación, transformación y eliminación de sustancias.

Suponen un importante ahorro de tiempo al facilitar los resultados con mayor rapidez, tienen un coste económico bastante menor.

Requieren menores cantidades de los productos ensayados que los métodos *in vivo*.

c).CULTIVOS CELULARES.

El desarrollo de los cultivos celulares *in vitro* se originó en los trabajos de Harrison y Carrel en relación con las perspectivas del transplante de órganos. Su aplicación en la investigación médica adquirió enorme importancia en los trabajos de Enders, SÉller y Robbins, quienes descubrieron que el virus de la poliomielitis se podía replicar en cultivos de células *in vitro* provenientes de tejido embrional de riñón humano y otros órganos. Este hecho condujo al descubrimiento de muchos virus y al desarrollo de vacunas contra la poliomielitis y el sarampión entre otras.

Los cultivos celulares son el producto de la colección de células animales que pueden provenir de diferentes órganos, colocados en condiciones especiales para su sobrevivencia y proliferación, manteniendo para esto sus funciones metabólicas de manera semejante a las que tenía en su huésped: pH, presión osmótica, nutrientes, sales, etc.

Cuando el cultivo proviene de células que han sido disgregadas de un tejido original tomado de un órgano de un animal recién sacrificado, recibe el nombre de cultivo primario. Cuando este cultivo primario es sometido a procesos de transformación que le confiere capacidad ilimitada de la multiplicación, recibe el nombre de Línea Celular.

Los cultivos de células animales se han clasificado de acuerdo a su capacidad de anclaje (adherencia), y así han sido aisladas recientemente de unos órganos determinados o si provienen de células que han sufrido modificación. De acuerdo a su capacidad de adherencia o no a una superficie determinadas las células pueden crecer formando monocapa o en suspensión respectivamente. Esto está asociado con el tipo de tejido del cual derivan.

d). CULTIVOS PRIMARIOS

El cultivo primario de células tienen un tiempo finito de vida de 5 – 10 divisiones in vitro.

Los cultivos primarios pueden ser obtenidos de embriones y de órganos de animales adultos. Las células obtenidas de embriones, in vitro tienen un rápido desarrollo.

Las células obtenidas de animales adultos es más difícil disgregarlas y usualmente su crecimiento en cultivos es más lento.

Existen diferentes técnicas para obtener suspensiones celulares de varios órganos, para esta disgregación los métodos más utilizados pueden ser clasificados en tres categorías:

- Métodos mecánicos, para el inicio de la disgregación, el órgano escogido se lo corta, hasta obtener las células.
- Métodos químicos, se utiliza agente quelantes como el EDTA que mantiene la integridad de tejidos, pero al retirar cationes divalentes como calcio y magnesio, guarda la integridad celular., que actúan en la matriz extracelular.
- Mediante digestión enzimática, el tejido es sometido a enzimas como: tripsina, colagenasa.

Los cultivos primarios tienen características especiales que los diferencian de las líneas celulares: conservan la morfología de las células del órgano del que fueron aisladas, sus cromosomas tienen un número diploide ($2n$), su crecimiento *in vitro* es limitado y hay inhibición por contacto.⁽⁹⁷⁾

e. LÍNEAS CONTINUAS

Los cultivos celulares continuos se caracterizan por carecer del control de proliferación; se dividen ilimitadamente; aunque para su mantenimiento *in vitro* precisan de requerimientos mínimos: pH, temperatura y además constituyentes determinados. Aunque su sensibilidad a elementos tóxicos es menor que las células de cultivos primario, su proliferación ilimitada

in vitro facilita su manejo. Asimismo, se puede contar con una gama innumerable de células provenientes de diferentes especies animales, como también humanas. Esto permite evaluar el efecto del producto bajo estudio en varias estirpes celulares. Hecho que *in vivo* se ve limitado.

f). Akhana

La *Akhana* proviene de la familia Compuestas (Compositae o Asteracea) perteneciente a la Especie *Aphyllocladus spartioides weddell*, originario de los valles interandinos, del Norte de Potosí, presenta ramas alargadas, tallo liso, hojas compuestas, flores con una fila de línea de filarios crece generalmente en las épocas primavera y verano.

En pruebas fitoquímicas realizadas, se determino que en su composición , además de otros compuestos comunes a otras plantas están presentes flavonoides, taninos , sesquiterpenlactonas , las que tienen gran importancia por la variada acción biológica que han demostrado , tener propiedades dilatadoras coronarias, antihepatotóxicas, coleretica y diurética, acción citotóxica, antihumoral, analgésica y lo mas importante inhibición de las bacterias anaerobias.

VI.Objetivos

A.Objetivo general

Evaluar los parámetros de seguridad pre-clínica y la actividad biológica de *Aphyllocladus spartioides weddell* en procesos gingivoperiodontales

B.Objetivos específicos

- Evaluar del efecto toxico *in Vitro* del extracto acuoso de *Aphyllocladus spartioides weddell* en cultivos primarios (linfocitos humanos y esplenocitos murinos) y en una línea celular continua (BHK-21), empleando ensayos de exclusión de colorante vital y reducción de sales de Tetrazolio MTT.
- Evaluar la inocuidad de la preparación del enjuague con *Aphyllocladus spartioides weddell* sobre la mucosa oral de animales de experimentación, mediante parámetros histológicos.
- Determinar la modificación en la flora microbiana oral en paciente tratados con el enjuague de *Aphyllocladus spartioides weddell*.

- Evaluar la evolución de la expresión de los procesos de infección e inflamación en la gingivitis y la periodontitis mediante valoración clínica odontológica en pacientes tratados con enjuague de *Aphyllocladus spartioides weddell*.

C. HIPÓTESIS.

El extracto acuoso de *Aphyllocladus spartioides weddell* tiene utilidad en el manejo de enfermedades periodontales e inflamatorias, tanto por su efecto terapéutico como por su inocuidad en sistemas biológicos.

-

VII. DISEÑO METODOLOGICO

El presente estudio corresponde a un diseño experimental, fue realizado en tres etapas: en una etapa se realizó el estudio *in vitro* en las líneas continuas, sobre células *BHK-21*, y cultivos primarios realizando la extracción de esplenocitos murinos, linfocitos humanos, evaluando la cito toxicidad de *A. weddell* en diferentes concentraciones y tiempos de exposición, para encontrar la concentración citotóxica media (CC50). Una vez obtenido estos resultados se procedió a realizar el estudio de toxicidad local *in vivo* en mucosa oral de conejos a los cuales se les dividió en tres grupos: al primer grupo se le aplicó gel extracto utilizando el CC50, al segundo grupo gel Placebo y el tercer grupo fue control negativo. Los geles se aplicaron tres veces por día por espacio de seis semanas, para luego realizar el estudio de inocuidad mediante cortes histopatológicos, en diferentes niveles de la mucosa para determinar posible efecto tóxico de la planta sobre este tejido. Una vez obtenidos los resultados, se procedió al estudio clínico.

El estudio clínico se realizó con pacientes que acudieron a la Cátedra de Periodoncia de la Facultad de Odontología de la UMSA; se los agrupó según patología: gingivitis y/o

periodontitis. Posteriormente se realizaron enjuagues bucales durante seis días, a los cuales se les realizó un control de los signos clínicos gingivoperiodontales y microbiológicos antes y después del tratamiento.

A. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Área de recolección de la planta.

La planta denominada Akhana fue recolectada de la zona sur oeste de Bolivia de la zona altiplánica del Norte de Potosí, su identificación fue realizada en el Herbario Nacional, Instituto de Ecología UMSA.

2. Extracto vegetal

2.2 Para la extracción del principio activo, en base en lo reportado en la medicina tradicional local, se seco los tallos en sombra a temperatura ambiente. Después fueron lavados y desinfectados con alcohol al 70% y evaporación en ambiente estéril, hasta su completo secado. Luego fue pulverizados con moledora manual, para tener mayor superficie de contacto con la solución de extracción.

La extracción acuosa al 10% de la planta pulverizada se realizó resuspendiendo el material en agua bidestilada y desionizada estéril hirviendo (14) se dejó reposar por espacio de 15 minutos a temperatura ambiente, se filtró con gasas estériles y se alícuotó en viales estériles en volúmenes de 30 mL. Estos fueron congelados por espacio de dos días y posteriormente se liofilizaron a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ con un vacío de 10^{-3} MBar de presión (Freeze Dry Sistem LIPH LOCK6 de LABCOBCONCO), por espacio de siete días. El rendimiento en peso seco por 30 mL extracto fue de 0.6052g.

Todos los ensayos se realizaron con el mismo lote del extracto para evitar posibles variaciones en los resultados debido a diferencias en los preparados (i.e., época de recolección, edad de la planta, condiciones ambientales, etc.)

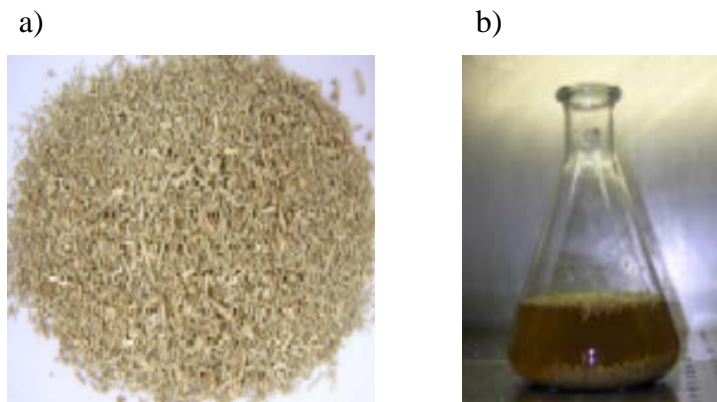


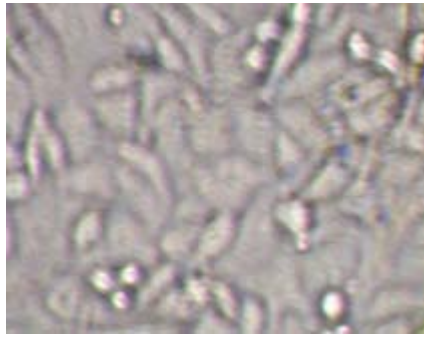
Figura . *A. weddell*. a) Tallos de *A. weddell* triturados en ambiente estéril
b) Extracción acuosa de *A. weddell* para su posterior liofilización.

2.2 Estabilidad

Para establecer la estabilidad física del extracto, se peso 0.04 g del liofilizado en viales estériles se resuspendió en 2 mL de RPMI y 2 mL de Hanks , se esterilizo por filtración a presión positiva a través de una membrana de nitrocelulosa (Millipore) de 0,22 um de diámetro de poro, se incubo a 37°C con saturación de humedad por espacio de 24, 48 y 72 horas y se evaluaron tres parámetros: sedimentación, turbiedad, solubilidad .

3.CULTIVO DE CÉLULAS: LÍNEA CELULAR CONTINUA BHK – 21.

El cultivo de células es considerado como una tecnología valiosa y fuente de material biológico para el diagnóstico, producción de material biológico, sistemas de monitoreo *in vitro* de actividad biológica, etc. Permite detectar variaciones de la función celular en un entorno libre de las variaciones sistémicas, propias de modelos *in vivo*. Sin embargo, estos son útiles cuando los mismos están bien organizados, caracterizados y manipulados.



Fotografía 1. – Células BHK-21 en cultivo. Células con 80% de confluencia obtenidas luego de 24 horas de incubación con inóculo inicial de 100 μL de suspensión celular a una concentración de $3,1 \times 10^6$ cel/mL. Aumento 100X,

La línea celular *BHK-21* se derivó en 1961 del riñón de hamsters sirios recién nacidos, Como características fundamentales esta línea posee rápido crecimiento, tiempo de duplicación menor en comparación con otras líneas celulares, pases ilimitados y alta eficiencia de plaqueo. Esta constituida por células pseudofibroblásticas y es una línea pseudodiploide con tetraploidia ⁽¹⁴⁰⁾. Son células que crecen en monocapa. Las *Células BHK-21* provenientes del banco de células del Instituto SELADIS, Laboratorio de Virología fueron conservadas en RPMI-DMSO a -195°C en Nitrógeno líquido y fueron cultivadas en frascos de Roux, (25 cm^2) de superficie, adicionando medios de cultivo de mantenimiento (RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino al 3%) de acuerdo a requerimiento. Los cultivos fueron incubados en estufa (incubador Tuttnaue KNOTT), bajo “condiciones de cultivo celular”^(79,86125)

El desarrollo del cultivo celular fue evaluado diariamente a través de un microscopio invertido (Olympus CK 2). Se realizaron los subcultivos de las células, para llevar a cabo los diferentes ensayos.

3.1 DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD Y AJUSTE DE LA DENSIDAD CELULAR.

La manipulación de cultivos celulares requiere la cuantificación del número de células presentes en una muestra así como determinar la proporción de células viables de manera previa a su uso en cualquier ensayo. Con un número adecuado de células se puede trabajar con crecimiento óptimo celular. Para determinar la densidad celular se emplean diferentes técnicas, desde la relativamente simple cámara de contaje celular, de la que existen numerosas variantes, hasta equipos automáticos de contaje celular como el “Cell counter”⁽⁹¹⁾

Para la determinación de la viabilidad celular se emplea diferentes métodos, entre ellos el de incorporación y retención de colorante vital por células viables como la diacetil fluoresceína, la eosina; la incorporación de isótopos radioactivos como el ⁵¹Cr; la exclusión por células vivas de colorantes vitales como el azul Tripán, eritrosina o nigrosina. Este colorante utilizado en el presente trabajo, se basa en la propiedad de permeabilidad selectiva de la membrana plasmática; la pérdida de esta propiedad por las células muertas permite la difusión del colorante, en este caso Azul Tripán, al citoplasma observándose claramente de color azul, esto facilita la diferenciación de las células vivas que por mantener la integridad de la membrana se observan incoloras, translucidas y refringentes ⁽¹⁴⁵⁾, Para realizar esto, luego de obtener una suspensión celular homogénea en condiciones de esterilidad, se alicuotó 50 uL de la misma y se incubó con 50 uL de Azul tripan 0,4% en PBS (factor de dilución 1:2).

Transcurrido los tiempos de incubación se procedió a realizar la viabilidad por azul Tripán. En el cual primeramente se desecho todo el medio, se le coloco 50 ul de azul Tripán 0.3% se incubo a 37°C con saturación de humedad por espacio de cinco minutos, luego se desecho todo el colorante, se procedió al recuento de células en cámara de Neubauer en los 4 retículos de células blancas, con objetivo 10X de microscopio óptico (Olympus CH-2), se contaron células vivas y células muertas haciendo un contaje de las células refringentes y azules, en cinco cuadrantes de cada pozo, luego se saco el porcentaje de viabilidad por pozo de las diferentes diluciones realizadas.

Para determinar el porcentaje de viabilidad se aplico la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{No de células vivas}}{\text{No de células totales}} \times 100$$

Asimismo, con estos datos se determinó el número de células, según la siguiente formula:

$$\frac{\text{No de células vivas}}{\text{No. Cel/mL}} = \frac{\text{No de células vivas}}{\text{No cuadrantes contados}} \times \text{factor de dilución} \times 10^4$$

3.3 Citotoxicidad in vitro de la *A.weddell*

Para la determinación de la citotoxicidad in vitro del extracto acuoso de *A. weddell* en cultivos de células BHK-21, se ajusto el número de células a $3,1 \times 10^6$ cel/mL, y se coloco

100 uL de esta suspensión en policubetas de 96 pozos (ICN), por triplicado para cada dilución a experimentar; luego se incubo por 24 horas de cultivo para obtener una monocapa de 80-90% de confluencia, que es requisito para realizar cualquier ensayo biológico en este trabajo.

Se resuspendió 0.12 g de extracto liofilizado en 6 ml de RPMI al 3% se esterilizo por filtración a presión positiva a través de una membrana de nitrocelulosa (Millipore) de 0,22 um de diámetro de poro, se hicieron diluciones seriadas 10X, se desecho el sobrenadante de las células incubadas en los pozos, se adiciono a cada pozo 200 ul de las diluciones realizadas se incubo por 24 , 48 y 72 horas a 37° con saturación de humedad y CO₂ , comparando con un control de células sin en extracto , cultivadas en las mismas condiciones.

Transcurrido los tiempos de incubación se procedió a evaluar la viabilidad por el método del azul Tripán. Una vez analizados los resultados del primer ensayo, se a realizo un segundo ensayo con la misma densidad celular y condiciones del primer ensayo, utilizando diluciones seriadas 3x se incubando por 48 horas a 37° con saturación de humedad y CO₂ , este ensayo se realizo por duplicado. De dichas dosis se saco el CC50 mediante regresión lineal

3.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA POR EL ENSAYO ESPECTROFOTOMÉTRICO DE MTT

En 1983 Mosmann y Cols, desarrollaron un ensayo colorimetrico rápido para evaluar el crecimiento y sobrevivencia celular. Posteriormente se reportaron varias modificaciones de tal manera que en la actualidad muchos laboratorios de cultivo celular han adoptado este ensayo para la aplicación de una variedad de ensayos biológicos que incluyen: localización intracelular de oxidoreductasas, test de la viabilidad celular, estimación del crecimiento celular, estudios de citotoxicidad, actividad de parásitos, bacterias y virus, etc .Asimismo, el ensayo, por su bajo costo y el uso de policubetas de cultivo, pipetas automáticas multicanal,

y la lectura de varios pozos en breve tiempo con el espectrofotómetro lector de ELISA, permite trabajar con numerosas variables a la vez.

Este método está basado en la reducción de la sal de tetrazolio [3-(4,5 dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio] (MTT), por células activas metabolitamente. La reducción produce la ruptura del anillo de tetrazolio; la reacción es principalmente atribuida a la catálisis producida por deshidrogenasas mitocondriales, como la succinato deshidrogenasa y a transportadores electrónicos, razones por lo cual es considerado como un indicador de “actividad redox celular”. Existen evidencias de que la biorreducción del MTT en células mamíferas también puede ser catalizada por enzimas no mitocondriales ubicadas en el retículo endoplasmico, citoplasma y membrana plasmática ^(93,94,9596)go, independientemente de la fuente de oxidorreducción, en todo caso esta es un bioindicador de actividad celular. El producto, es la formación de cristales de formazan azul intracelular la magnitud del conjunto de cristales está en directa proporción a la cantidad de células metabolitamente activas, insoluble en medio acuoso.

Para el ensayo, 100 µL de solución de MTT (1 mg/mL en RPMI sin rojo fenol) fue adicionado a los cultivos en estudio, las placas fueron incubadas a 37°C por 4 horas para permitir la actividad enzimática y la formación de los cristales de formazan. Estos fueron disueltos con 150 µL de ácido clorhídrico-ácido isopropílico. La intensidad del color de cada pozo fue medida en el lector de ELISA (AWARENESS. Technology inc) a una longitud de onda de 545 nm y a 630 nm de referencia.

Una vez medida la Densidad Óptica, los datos fueron empleados para: determinar el porcentaje de viabilidad celular.

4. Citotoxicidad en cultivos primarios

4.1 Aspectos conceptuales

Los cultivos celulares primarios son aquellos en los que las células son obtenidas a partir de tejidos u órganos procedentes de animales o del hombre. Esta constituido de células que han migrado del explante de tejido al medio en el que se encuentran ó que por disgregación mecánica, química o enzimática del tejido se instalan en el medio. Estos, tienen tiempo limitado de sobrevivencia in Vitro a diferencia de las líneas celulares que se dividen ilimitadamente en similares condiciones.

Las células deben ser obtenidas a temperaturas bajas de 4°C a 6°C usualmente sobre baño de hielo picado, esto permite mantener la viabilidad celular de manera optima durante el proceso de manipulación y obtención celular. La recolección debe ser hecha de preferencia en medios enriquecidos como Ham's F10, Hank's F12 ó RPMI-1640 y si es requerido con adición de suero, el fetal bovino penicilina y estreptomycin.

Las técnicas de disgregación celular son escogidas en función del tamaño y naturaleza del órgano o tejido y del propósito del uso de los cultivos aunque, en todas las instancias el ó los métodos seleccionados deben ser aquellos que causen el mínimo daño y trauma posible en las células aisladas.

El procedimiento mecánico consiste en la extracción del órgano ó tejido mediante cortes y trituraciones sucesivas. El método enzimático utiliza la digestión con preparaciones crudas de tripsina, colagenasa, elastasa, hialuronidasa, etc. ó varias combinaciones enzimáticas que dirigen la matriz extracelular .El método químico esta basado en la eliminación de cationes

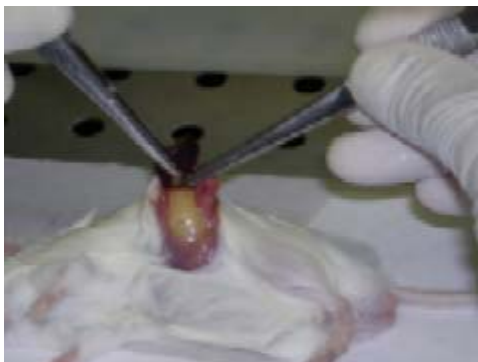
divalentes en el medio con ó sin la adición de agentes quelantes (EDTA) ,estos últimos procedimientos producen daño celular ulterior lo que va en decremento de la viabilidad celular final; sin embargo, su elección como se menciona anteriormente, esta en función de los requerimientos .

4.2 Obtención de células esplénicas

4.3 Animales de experimentación

Ratones albinos albinos de 8 a 10 semanas de edad, sexo femenino, de peso entre 25 a 30 g., fueron proporcionados por el Bioterio de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas. Los animales fueron alimentados con pellets de purina, harina de trigo de maíz y de vitaminas y agua a requerimiento. Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, luego de realizar la sepsis del animal con etanol al 70%. Una vez realizada esta operación, se procedió a trabajar todo el procedimiento en condiciones estériles (campana de flujo laminar vertical Gelaire Flor Laboratorios); se extrajo el bazo, cuidadosamente, desprendiéndolo del mesenterio; el órgano fue colocado sobre una caja de Petri que contenía medio de cultivo RPMI al 5%, Mercaptoetanol 5×10^{-5} M ,sobre baño de hielo. Cuidadosamente por procedimientos mecánicos basados en cortes y trituraciones sucesivas del órgano, se obtuvieron las células linfoides, disgregando con una pipeta Pasteur, mediante absorción y eliminación sucesiva de la suspensión (4 a 5 veces).

a)



b)



Fotografía 2. Extracción de esplenocitos murinos a) Extracción del bazo, desprendimiento del mesenterio b) Bazo extraído en la caja Petri, realizando las trituraciones.

La suspensión celular fue transvasada a tubos de centrifuga de poliestireno (Falcon), separando los detritos celulares de la suspensión; y las células fueron concentradas por centrifugación a 1500 rpm por 5 minutos a 4°C.

Para eliminar los glóbulos rojos del cultivo, por su interferencia en la visualización morfológica celular del pellet, este fue resuspendido en 10 ml de solución de Tris ClNH_4 , pH 7.2-7.4 y (60,214). La suspensión se incubó durante 5 minutos a 4°C. Para eliminar restos del reactivo y productos de la lisis de los glóbulos rojos (detritos celulares y fragmentos estroma y hemoglobina) las suspensiones celulares se lavaron tres veces con solución de Hanks () por centrifugación a 800 rpm (200G) por 10 minutos a 4°C. Luego de cada centrifugación se observó en el tubo la formación de un pequeño coágulo que se disgrega sometiendo el tubo a la acción del Vortex, este hecho tiene mucha importancia ya que de no realizarse esta maniobra la densidad celular final decrece drásticamente.

Luego de los lavados, las células se resuspendieron en 1 mL de RPMI AL 5% con Mercaptoetanol, Suero Fetal Bovino (Gibco) Lab ,2- Mercaptoetanol 5×10^{-5} M. (Sigma Che.Co), penicilina y estreptomina.

4.4 Obtención de linfocitos humanos

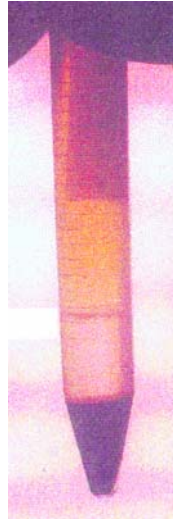
La separación y aislamiento de linfocitos humanos a partir de sangre periférica se basa en las características físicas de las células (tamaño-densidad). Basado en la técnica original de Boyum, en la que se aplica un gradiente de densidades, se utiliza una mezcla de sales de polímeros de sucrosa el LSM (Lymphocyte separation médium) que tiene una densidad específica definida de (1.077 g/mL) similar a las células linfocíticas, proporcionando entre un 70 a 90% de células viables.

La obtención de linfocitos se realizó a través de punción venosa extrayendo un volumen de 10 mL con heparina 100 uL, teniendo la relación de 50ul por cada 5 mL de sangre extraída.

La muestra en la jeringa se llevó a 37°C durante una hora en posición vertical para permitir la separación por gravedad en sus componentes entre los que se identifican de arriba abajo: plasma, células mononucleares y plaquetas, granulocitos, eritrocitos. De acuerdo con esto los linfocitos pueden ser recuperados, en la interfase ubicada entre el plasma y el medio separador de linfocitos, una vez visualizado todo lo anterior se procedió a colectar en un tubo de vidrio la interfase. La muestra fue diluida con medio Buffer salino fosfato (PBS), todo esto en condiciones de esterilidad.

La suspensión celular fue lavada con PBS por centrifugación a 1500 rpm por espacio de cinco minutos, el sobrenadante fue desechado y el paquete celular fue resuspendido en una relación de cinco partes de la solución con PBS pH 7.4, por una parte de sangre obtenida, dando una dilución 1/5.

Paralelamente se dispense en un tubo de poliestireno de 15 mL, 3 mL de LSM (densidad de 1.077) con la ayuda de una pipeta pasteur, llenamos este tubo con la suspensión celular cuidando de no mezclar las soluciones. Luego de esto la solución fue centrifugada a 1500 rpm por 20 minutos.



Fotografía 3: Aislamiento de linfocitos por LSM (Lymphocyte separation médium)

Con una pipeta pasteur se colecto la interfase de células mononucleares ubicada entre el plasma y el LSM. Las células fueron trasferidas a otro tubo de 15 mL y lavadas por centrifugación a 100 rpm por 10 minutos con PBS. El sobrenadante fue descartado y el pellet celular fue resuspendido en 1 mL de RPMI al 5% suplementado con suero fetal bovino, estreptomycin, penicilina. Se colecto una alícuota de la suspensión celular, para calcular la densidad celular y el porcentaje de viabilidad de la muestra^(85,86)

Una vez realizado el ajuste celular tanto del cultivo de de células esplénicas y como de linfocitos humanos fueron incubados por 24 horas en placas de 96 pozos (ICN) a una

densidad celular de 2×10^6 cel/mL. Se deseche el medio y se adiciono el extracto en diferentes diluciones seriadas 3x. Se incubo por 48 horas a 37° con saturación de humedad y CO_2 . Estos ensayos se realizaron por duplicado, una vez concluido el tiempo de incubación se procedió a evaluar la viabilidad celular por azul Tripán, tanto de los esplenocitos murinos como de los linfocitos humanos, y se realizo la operación matemática de regresión lineal para la obtención de el CC50.

5. Estudio de inocuidad in vivo

5.1 Material y Métodos

5.2 Aspectos conceptuales de la mucosa oral.

La mucosa bucal está constituida por un epitelio de recubrimiento y por tejido conectivo laxo que lo sostiene y nutre, llamado lámina propia o corium.

De acuerdo a características funcionales se pueden observar variaciones histológicas y podrán encontrarse mucosas queratinizadas en paladar o encías y con gran variedad papilar. Los epitelios de la cavidad bucal se dividen en queratinizados y no queratinizados, dependiendo si superficialmente están protegidos o no por esta capa cornea o queratina; a su vez la capa queratinizada se llamará ortoqueratina si las células no muestran núcleos y paraqueratina si los mostraran, lo más común dentro de la cavidad bucal es que los epitelios queratinizados. Son epitelios estratificados por estar conformados por varias capas o estratos. Se les denomina de planos por la apariencia de sus capas más superficiales. El último apelativo es el de descamativo, lo describe el alto índice de renovación celular, las células “viejas” descaman y son constantes y aceleradamente reemplazadas. De tal forma que el epitelio de la mucosa bucal es estratificado, plano y descamativo, pudiendo ser también queratinizado. Los epitelios bucales en general constan de 3 capas cuando no son queratinizados y de 4 cuando la capa final de recubrimiento es queratinizada, muestra del interior a la superficie, la capa basal (B), de aspecto poliédrico y más obscura (basófila),

cuando es teñida con hematoxilina y eosina; sigue la capa o estrato granular (G) así llamada por los pigmentos basófilos (oscuros) intracitoplasmáticos. B+G constituyen el estrato (EG) germinativo, que es la zona donde ocurre la activa multiplicación celular. Sigue la capa espinosa (E) llamada así de manera descriptiva, ya que las uniones desmosomales quedan tensas (estiradas), dando la imagen de prolongaciones “espinosas”.

Es común observar prolongaciones epiteliales hacia el tejido conectivo, denominadas digitaciones, en algunas condiciones patológicas esta imagen puede variar. El tejido conectivo está formado por abundantes fibras colágenas, fibroblastos, vasos sanguíneos y anexos como pudieran ser glándulas salivales menores y glándulas sebáceas (Gránulos de Fordyce). La unión entre tejido conectivo y epitelio es a través de medios físicos y químicos, a través de sustancias proteicas “cementantes” con una gran capacidad de intercambios iónicos como lámina, epiligrina y moléculas de adhesión extracelular que ofrecen unión a integrinas de las células de la capa basal epitelial. ^(53,54,55,56)

5.3 Animales y dieta

Los animales que se utilizaron fueron conejos californianos de 4 meses de edad, sexo masculino, adquiridos del Bioterio de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas.

Previo al experimento se sometieron a los animales a un control, de peso, examen coprorasitológico simple, para luego someterlos, después a un periodo de adaptación de meses en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas. El área de experimentación con animales durante 4 semanas tenía las siguientes características: temperatura 20 a 24°C, humedad entre 40 y 70% foto periodo de 12 horas de luz/oscuridad.

La dieta administrada consistió en alimento balanceado de para conejos 150 g proveniente de la empresa Ferrari Chezzi Ltda. el cual estaba preparado en base a alfalfa, avena, cebada, harina de soya afrechillo, minerales y vitaminas, siendo la alimentación recomendada para esta especie, se les dio a beber agua en un volumen aproximado de

consumo de 250 mL por día; sin embargo durante el periodo de adaptación se realizaron mediciones diarias del alimento y agua , para que basados en este rango, se pueda evaluar con posterioridad y durante el experimento la variación en el consumo normal .

5.4 Preparación del gel : El gel se preparo a base de carbopol W- 10 al 1% que es un gelificante tensoactivo, que aumenta la viscosidad de la sustancias ,el cual fue disuelto en 100 mL de agua estéril desionizada, posteriormente se calentó hasta la disolución completa, se añadió a la mezcla Polivinilpirrovidona al 1% que cumple la función de filmogeno, dando paso al principio activo,por ultimo se agrego Trietanolamina 0.7% que viene a neutralizar las anteriores componentes del gel, una vez gelificado se puso Benzoato de sodio al 5%, se mezclo energicamente; se repartió el gel en dos frascos de vidrio estériles, cantidades iguales del gel preparado , a un frasco se le añadió aloe vera al 5,4% , se autoclavo , y por ultimo se agrego el extracto .

Una vez cumplido el periodo de adaptación, se procedió a realizar el estudio de inocuidad local *in vivo*. Se trabajo con seis especimenes a los cuales, se los separaron en tres grupos : dos especimenes por grupo. Al primer grupo se le administro gel con extracto utilizando el promedio de las CC50 de cultivos primarios y continuos, al segundo grupo el gel placebo y el tercer grupo control no se le administro ningun gel solo alimento y agua controlada La administración del gel fue realizada alrededor de toda la mucosa oral , con hisopos estériles ver Fotografia 4, tres veces por día, evitando en cada aplicación la ingesta de alimento liquido/sólido por espacio de 15 minutos para evitar posibles interferencias en el experimento. Esto se realizo diariamente por espacio de seis semanas.



Fotografía 4: Administración del gel alrededor de la mucosa oral, con hisopos estériles.

Una vez concluido el tiempo de experimentación se procedió a sacrificar a los animales introduciendo al animal en un frasco con algodón empapado de halotano por espacio de 10 minutos; al cabo de este tiempo por medio de procedimientos quirúrgicos se extrajo toda la mucosa oral de cada animal, para luego realizar cortes seriados de dicho tejido, con un equipo de disección. Las muestras provenían de ambos lados (de la mucosa derecha e izquierda) y de la parte anterior, del margen de unión entre la encía y mucosa oral, la encía papilar cara interna, encía libre cara interna y encía adherida cara interna para el análisis histológico.

5.5 Técnica Histológica

Los cortes fueron preparados por duplicado por cada lado de la mucosa oral; posteriormente fueron fijados en formol al 10% con el objetivo de conservar definitivamente la estructura celular,. A continuación se procedió a lavar con agua corriente para eliminar el exceso de fijador y se procedió a deshidratar el tejido con inmersiones sucesivas con alcoholes al 75%,85% y 95%. El siguiente paso fue someter al xilol, previa identificación de cada corte, luego se fijaron los cortes en parafina líquida (punto de fusión de 56 a 59 °C); una vez formado el bloque que incluye el tejido, se procedió a cortar con un desgaste de 15 a 20 micras, un corte fino de 3 a 4 micras un micrótopo. Estas muestras se fijo en un porta objetos en baño maría de 45 a 55°C. A continuación de realizo la Tinción universal y la observación de los diferentes niveles de la mucosa para así poder evaluar el posible efecto tóxico de la planta sobre dicha mucosa. Se

establecieron parámetros de medición como se observa en la tabla 1. Se asignaron valores, graficando los resultados en Microsoft Excel, en algunos casos mostrando promedios.

Parámetro	Escala
Linfocitos	Leve, moderado, severo
Fibrosis	Ausencia, presencia
Vasos congestivos	Leve, moderado, severo
Hiperplasia	Leve, moderado, severo
Hiperplasia Pseudoepiteliomatosa	Ausencia, presencia
Queratinización	Ausencia, presencia
Eosinofilos	Leve, moderado, severo
Proyecciones Papilares	Ausencia, presencia
Proyecciones verrucosas	Ausencia, presencia
Mitosis	Leve, moderado, severo
Mucosa papilar espesor total	Número de capas
Mucosa papilar estrato superficial	Número de capas
Mucosa papilar estrato intermedio	Número de capas
Encía libre espesor total	Número de capas
Encía libre estrato superficial	Número de capas
Encía estrato intermedio	Número de capas

Tabla 1: Parámetros histológicos medidos en los diferentes cortes de la mucosa

6. Estudio clínico

6.1 Material y métodos

Los resultados obtenidos en los conejos a los que se administro el gel (que permite que los principios activos, estén presentes de una manera sostenida en contacto con la mucosa y que

en la región de penetración muestra, que puede existir fenómenos irritativos, por lo que se decidió a nivel clínico retornar a lo que indica la medicina tradicional el enjuague bucal.

6.2 Preparación del enjuague

La preparación del enjuague se realizó según las normas farmacéuticas, en el Área de Química Farmacéutica del Instituto SELADIS. A partir del liofilizado obtenido de la planta, se preparó el enjuague bucal al 0.03 gr/ 100 mL, con 180 mL de agua destilada estéril; se añadió 0.72 mL de esencia de menta, 0.0174 gr de stevia como edulcorante y 0.025 gr de Benzoato de sodio que es el conservante. De igual modo se preparó el placebo sin extracto y se envasaron en frascos de polivinilo estériles de 180 mL con su respectiva etiqueta (Ver Anexo.)

6.3 Población de estudio.- El estudio se realizó con 30 pacientes ambulatorios que acudieron a la Facultad de Odontología de la UMSA, Cátedra de Periodoncia, los cuales cursaban enfermedad gingivoperiodontal. Se les invitó a participar en el presente estudio, mediante un consentimiento informado, donde se les otorgó una copia del documento. Los pacientes fueron agrupados, según enfermedad diagnosticada mediante un examen general y una historia clínica, de la siguiente manera: 15 pacientes con gingivitis, 15 pacientes con periodontitis, antes y después del tratamiento se les realizó una medición semicuantitativa de los signos clínicos gingivoperiodontales a cada paciente (ver anexo), asignando valores: a cada parámetro utilizado para la medición de estos síntomas y signos : leve + , moderado ++, avanzado +++, con la siguientes equivalencia por el cálculo por el tratamiento , se establecieron los siguientes valores, Leve: 1, moderado :2, avanzado : 3, ausencia :0, con estos valores se graficaron los resultados mediante graficas de puntos antes y después del tratamiento, paralelamente para conocer la tendencia de la disminución de los signos y síntomas gingivoperiodontal evaluados , se calculó la pendiente de cada variable, y se obtuvo el promedio de dichos valores, utilizando : Microsoft Excel (Microsoft office 2001: Microsoft Corp . Redmond Wash)

6.4 Tratamiento del paciente con el enjuague bucal

Los pacientes seleccionados por el tipo de enfermedad recibieron, el enjuague bucal (extracto o placebo) según el método doble ciego: 10 recibieron enjuague bucal con extracto y 5 pacientes recibieron enjuague placebo, para ambas enfermedades. El tratamiento se aplicó por seis días, realizando enjugues bucales con una medida otorgada de 15 mL cuatro veces por día, después de cada comida y cepillado de los dientes, tratando de que tome contacto el líquido con la encía y el diente durante al menos 1 a 2 minutos .

6.5 Obtención de las muestras microbiológicas

Se obtuvieron las muestras del surco gingival profundo con hisopos estériles para frotis en portaobjetos estériles para el estudio morfológico de las bacterias. También este método se utilizó para identificar las espiroquetas en fresco en campo oscuro con solución salina fisiológica al 9%, Las placas teñidas fueron evaluadas por el número de microorganismos observados, la morfología y coloración de los mismos, permitiendo la identificación y semicuantificación solo de las principales bacterias periodontopatogenas como: Espirouetas spp., Fusobacterias spp., Streptococcus mutans spp., Streptococcus y Sthaphylococcus spp. Estos microorganismos identificados por criterios morfológicos y tintoriales se clasificaron en:

- + Escasos (algunas bacterias por campo en toda la placa)
- ++ Frecuentes (numerosas bacterias por campo en todos los campos)
- +++ Abundantes (Gram. cantidad de bacterias en cada campo en toda la placa)



Fotografía 6: Toma de muestra del surco Gingival con ayuda de papel Watman N 3.

Se realizó cultivo primario del exudado del surco gingival con la ayuda de un pequeño papel Watman N° 3 que se ingresó cuidadosamente en el surco gingival (ver gráfico), para observar las bacterias anaerobias presentes, se cultivó en caldo tioglicolato, inmediatamente se selló con parafina líquida para cultivo en microaerofilia, anaerobiosis (Jarra Gas Pack) de 24 horas, donde también se realizó un frotis para posterior tinción Gram, luego se realizó subcultivos en medios sólidos (Agar sangre, Agar Chocolate , Agar mitis salivarius) (ver anexo).

VII. Resultados.

A. Estabilidad del extracto

Una vez realizados los ensayos a la que el extracto se mezcla con los diferentes medios, para ver su estabilidad no se observó ninguna alteración visible de turbiedad, sedimentación e in solubilidad a las 24, 48 horas en los diferentes tiempos de exposición, por lo tanto se determinó que se puede utilizar para los posteriores ensayos tanto RPMI y Hank's, como diluyentes.

B. CITOTOXIDAD DE A. weddell EN CULTIVO DE CÉLULAS BHK-21

Con la finalidad de determinar el posible efecto tóxico del producto y la concentración a la cual este no sea tóxico se trabajó con cultivos de células BHK-21, a diferentes concentraciones del extracto y diferentes tiempos de incubación.

La figura 1 muestra la evaluación preliminar del efecto citotóxico de *A. weddell* a partir de una concentración inicial de 2mg/mL y 4 diluciones 10x en cultivo de 24, 48 y 72 horas. La evaluación se realizó comparando con el control negativo donde solo se utilizó medio (CN)

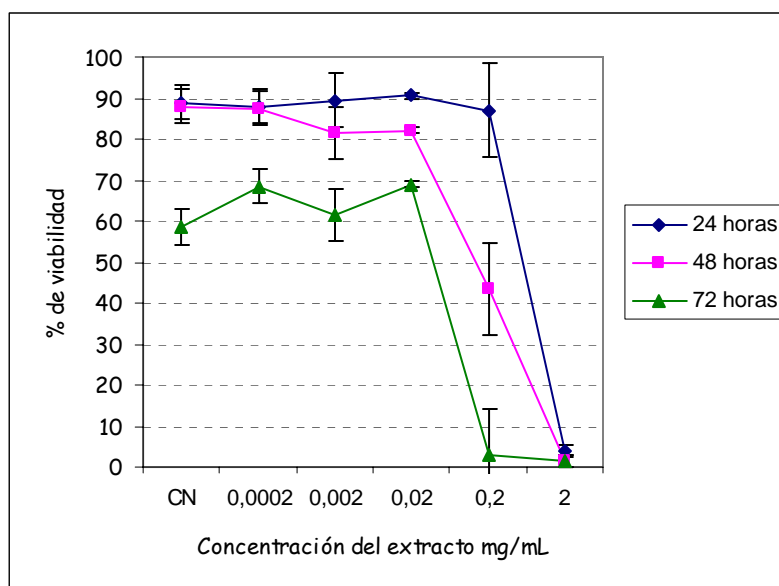


Figura 1 **Determinación del efecto citotóxico de *A.s. weddell* sobre células BHK-21.** El cultivo celular fue realizado a las 24, 48 y 72 horas en presencia de diferentes concentraciones de, *A. weddell* concentración inicial 2mg/mL. El porcentaje de viabilidad de células- *Akhana* fue evaluado mediante el método de Exclusión del colorante Azul Tripán

Con la realización de este ensayo se observó la acción tóxica de *A. weddell* en las concentraciones 0.2 mg/mL. No se observó mayor diferencia en el porcentaje de viabilidad a concentraciones menores, con respecto al control negativo, en el ensayo llevado a cabo a las 24, 48 y 72 horas se evidenció aún más un descenso significativo en el porcentaje de viabilidad celular.

Una vez evaluado el efecto de *A. weddell* con las diluciones logarítmicas (base 10) del extracto, se decidió realizar diluciones a 3 x a partir de la concentración inicial de

2mg/mL, a cultivos de 48 horas. Encontrando una disminución de la viabilidad en las concentraciones de 2 mg/mL, 0,6 mg/mL y 0.2 mg/mL.

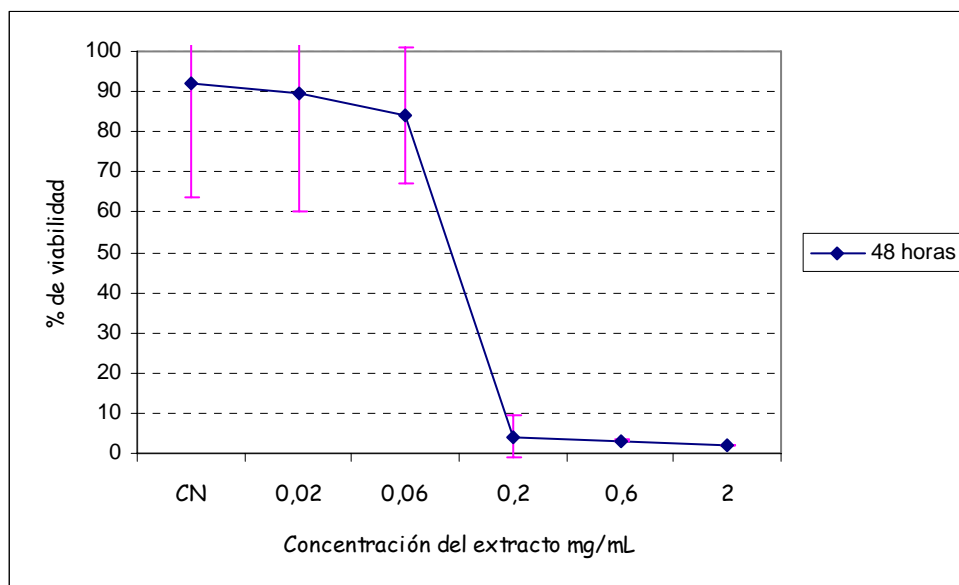


Figura 2. Determinación del efecto citotóxico de *A. s. weddell* sobre células BHK-21. El cultivo celular fue realizado a las 48 horas en diferentes concentraciones a partir de las anteriores realizando diluciones 1/3 de Akhana, partiendo de una concentración inicial 2mg/mL. El producto *A. weddell* -células fue evaluado mediante el método de Exclusión del colorante Azul Tripán. El valor representa el promedio de 2 ensayos

Con este ensayo se evidenció que la concentración citotóxica media (CC50), entre las concentraciones de 0.2mg/mL y 0.06mg/mL, se realizó la operación matemática de regresión lineal para determinar la (CC50), donde se obtuvo el siguiente valor: 0.1336mg/mL.

Concluidos los anteriores ensayos, se realizó el mismo procedimiento (con las mismas concentraciones y tiempo de incubación), utilizando la técnica espectrofotométrica del MTT y así poder realizar la comparación con el método de exclusión del colorante Azul Tripán.

Los ensayos por MTT confirmaron que las dos concentraciones más altas de 2 mg/mL y 0.6 mg/mL son las más tóxicas, ver Fig. 3 también se observó que existe un aumento paulatino en el porcentaje de viabilidad de las células BHK-21, así pudiendo demostrar aun

una mayor actividad de las células BHK-21 cultivadas, demostrado por el método espectrofotométrico del MTT con respecto al método de exclusión del colorante Azul Tripán.

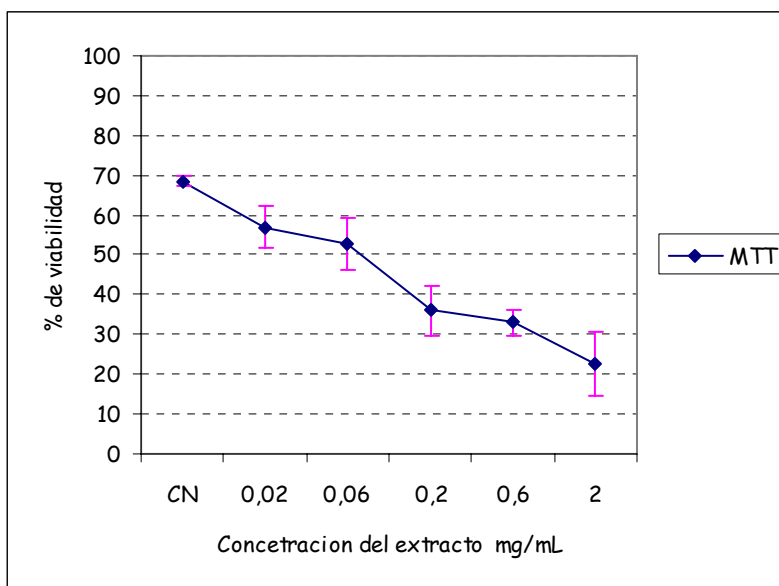


Figura 3. La evaluación de la actividad del extracto con células BHK-21, a diferentes concentraciones del extracto mediante la técnica espectrofotométrica del MTT, la cuantificación de la sal de tetrazolio se realizó a 48 horas de exposición y cada variable se ensayó por triplicado.

DETERMINACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO DE LA *A. weddell* SOBRE CULTIVOS PRIMARIOS

A Esplenocitos murinos.

Los cultivos primarios, son sistemas sensibles a cambios físicos, químicos, así como los componentes del medio donde se encuentran, por lo que se constituyen en un excelente monitor de cualquier compuesto que altere la actividad y funcionalidad normal de las células. Con la finalidad se realizó el cultivo de células esplénicas murinas, para la evaluación efecto citotóxico de *A.s. weddell* a partir de la concentración de 2mg/mL realizando diluciones 3x. Se observó una menor viabilidad celular en las concentraciones de

2 mg/mL y 0.2mg/mL , determinándose el CC50 entre las concentraciones de 0.6 mg/mL y 0.2 mg/mL, ver Fig.(4) , la operación matemática de regresión lineal se encontró el valor de: 0.1401mg/mL. Se observó también que existió una menor viabilidad celular de los esplenocitos murinos con respecto a las células BHK-21.

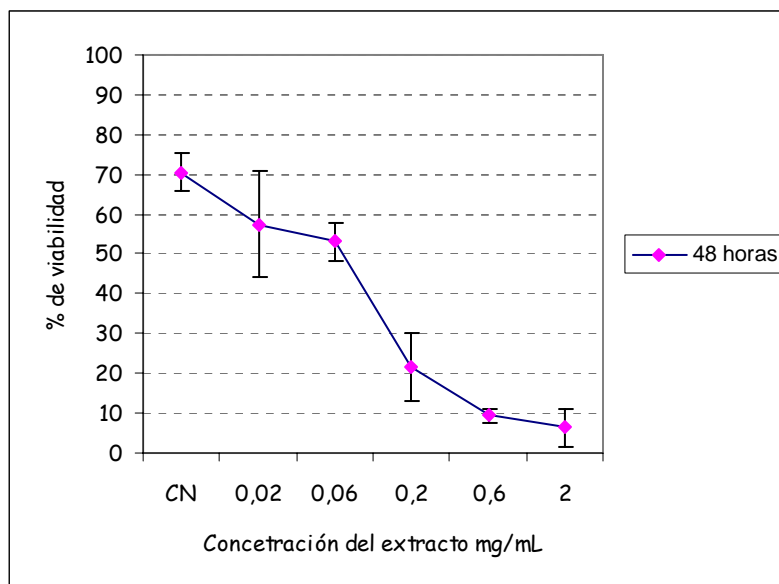


Figura. 4 Determinación del efecto citotóxico de *A. s. weddell* sobre esplenocitos murinos. El cultivo celular fue realizado a las 48 horas en presencia de diferentes concentraciones de *A.s. weddell*, concentración inicial 2mg/mL. El producto de la interacción constante *A. weddell*-células fue evaluado mediante el método de Exclusión del colorante Azul tripan. El valor representa el promedio de 2 ensayos

DETERMINACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO DE *A. weddell* SOBRE CULTIVO DE LINFOCITOS HUMANOS

B. Linfocitos humanos

Las células linfocíticas, dependientes de las células madres linfoides, tienen un papel muy importante en la inmunidad celular (función reguladora en la respuesta celular), son sensibles a cualquier agente extraño, de ahí su importancia en la detección del efecto deletéreo, que podría causar el producto natural.

El ensayo se realizó con las mismas concentraciones de extracto utilizadas en el efecto citotóxico a las células BHK-21 (concentración inicial 2 mg/mL diluciones seriadas 3x, con un tiempo de exposición de 48 horas). Se observó una mayor viabilidad de las células linfoides en control negativo (como se observa en la Fig. 4, en comparación a las células esplénicas). Se encontró que las dos primeras diluciones de 2 mg/mL y 0.6 mg/mL son las más tóxicas el CC50 dio un valor de: 0.1121mg/mL

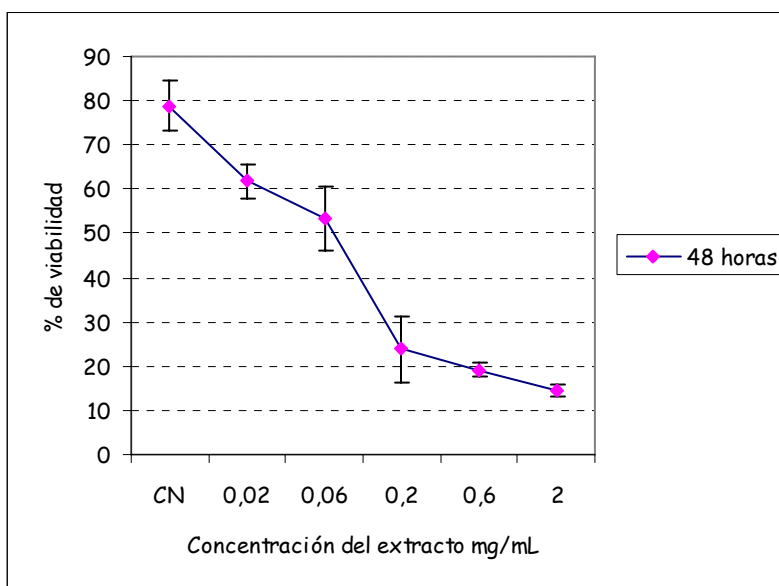


Figura. 5 Determinación del efecto citotóxico de *A.s. weddell* en linfocitos humanos. El cultivo celular fue realizado a las 48 horas en presencia de diferentes concentraciones de *A. weddell*, concentración inicial 2mg/mL. El producto de la interacción constante *A. weddell*-células fue evaluado por el método Exclusión del colorante Azul tripan. El valor representa el promedio de 2 ensayos

B. Resultados.-

ESTUDIO DE INOCUIDAD LOCAL *IN VIVO*

Estado general y comportamiento animal

El estado general, observable visualmente, fue reportado de manera diaria, buscando algún cambio en la movilidad, quietud, ingesta líquida/sólida, su peso fue normal de acuerdo a su

crecimiento, la agresividad, pasibilidad, erizado de pelo y otros. El registro indica que no hubo cambios visibles en el comportamiento, ni en la ingesta líquido/sólido o en el erizado de pelos. Se puede afirmar que la apariencia se mantuvo dentro de los límites normales sin alteración evidente en ninguna, en los animales tratados con los geles.

Una vez realizados los cortes histológicos y tinción de las placas se procedió a analizar diferentes componentes de la mucosa oral para ver el posible efecto tóxico del producto natural haciendo comparaciones con el gel placebo y el control negativo, con los parámetros de medición ya establecidos, en la mucosa oral.

En la evaluación de linfocitos en la lámina propia, fueron encontrados, en todos los cortes tanto en el control extracto y placebo, con un ligero aumento en dos de los cortes que se administro el extracto como muestra la figura con un incremento en su promedio: control normal 0.75, extracto 1.25 y placebo 0.85, donde se observa un leve incremento en el extracto.

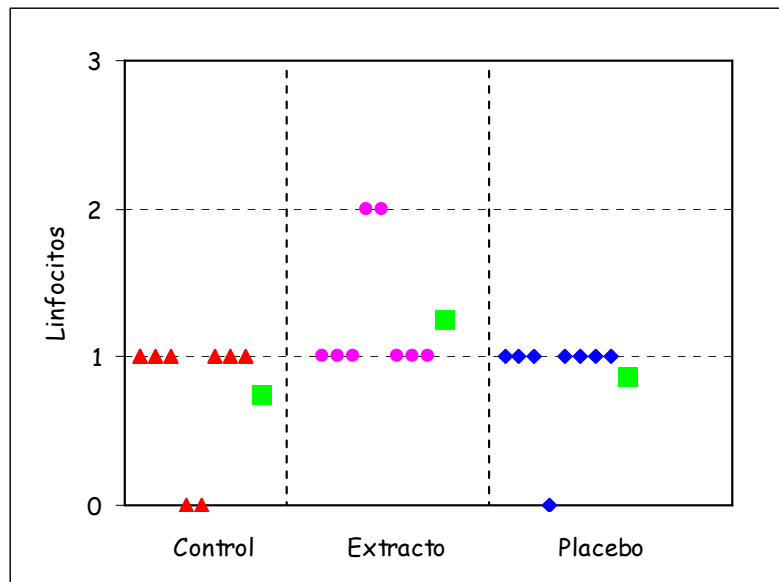


Figura. 6. Evaluación de la presencia de linfocitos en lamina propia, después de la administración por 6 semanas del gel extracto, gel placebo, control normal (sin ninguna aplicación solo alimento y agua normal), los puntos representan el grado de severidad, 0: ausencia, 1: leve, 2: moderado: 3: severo, de cada corte de la mucosa lado izquierdo, lado derecho, lado anterior y encía, por duplicado de los dos conejos experimentados por grupo. Se observo un incremento en el extracto.

La fibrosis en el Corium encontrada, se observó una presencia de fibrosis en cinco muestras de tejido, en las que se administró el gel extracto, una leve presencia en el gel placebo, comparando con el control que presentó ausencia total de fibrosis.

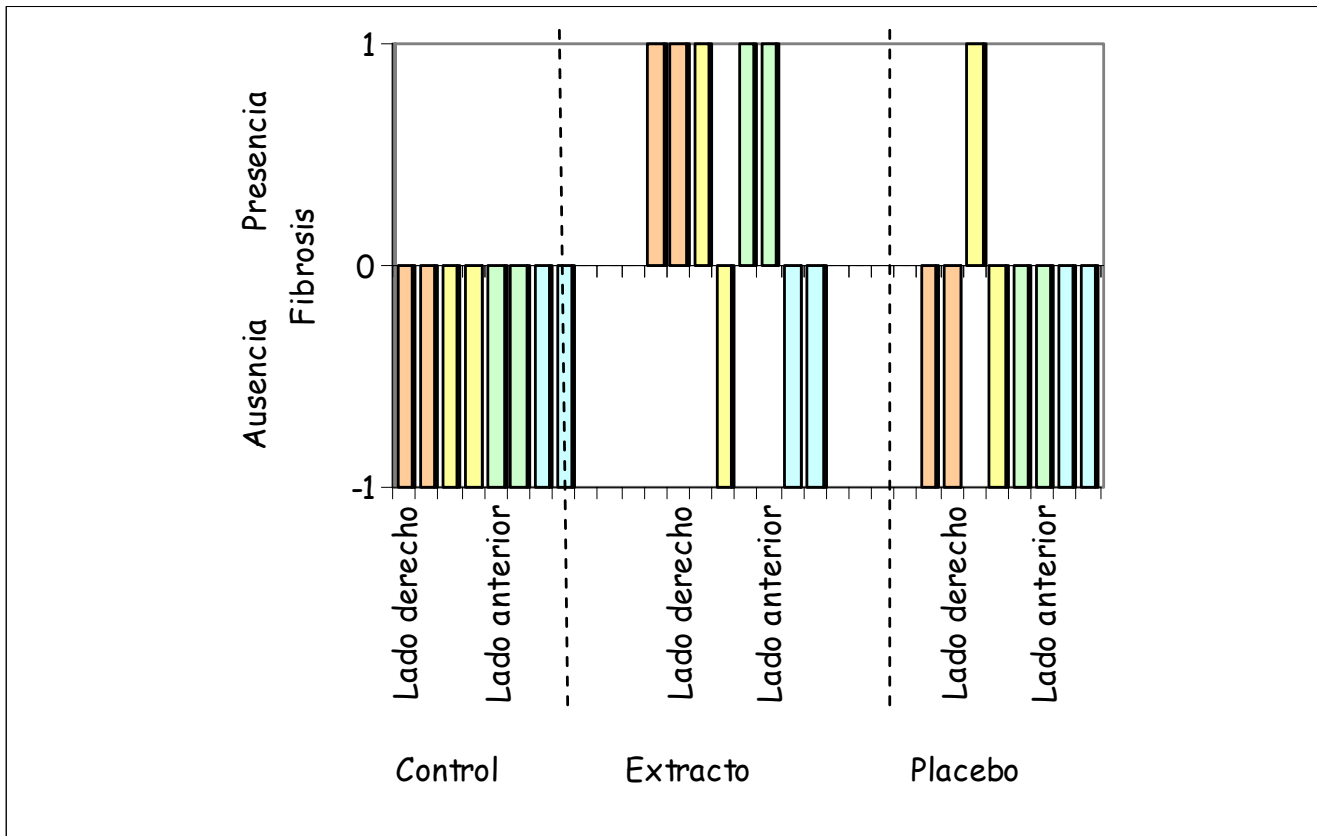


Figura. 7. Evaluación de fibrosis en el Corium, después de la administración por 6 semanas del gel extracto, gel placebo, control normal (sin ninguna aplicación solo alimento y agua), Las barras representan la ausencia o presencia de fibrosis encontradas en cada corte de la mucosa lado derecho, lado izquierdo, lado anterior y encía por duplicado de los dos conejos experimentales por grupo.

La presencia de vasos congestivos en el Corium en la evaluación, se observó un aumento considerable de vasos congestivos por parte de los cortes, a los que se les administró el gel extracto y un leve aumento en el gel placebo comparados con la ausencia en el control negativo, Fig. 8 presentando los siguientes promedios: Control: 0, extracto: 1.25 y Placebo de 0.5.

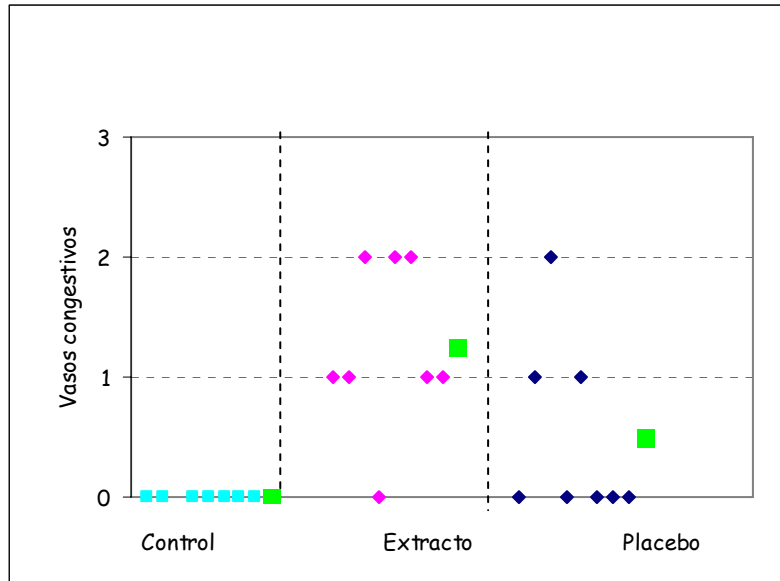


Figura. 8 Los vasos congestivos, observados en la lámina propia del corium, después de la administración por 6 semanas del gel extracto, gel placebo, control normal (sin ninguna aplicación solo alimento y agua), los puntos el grado de severidad 0: ausencia, 1:leve, 2 : moderado, 3 : severo, de cada corte de la mucosa lado izquierdo, lado derecho, lado anterior y encía., por duplicado de los dos conejos experimentados por grupo. Presentando un aumento en el extracto.

En la evaluación realizada de la presencia de hiperplasia a diferentes cortes de la mucosa no se observó hiperplasia significativa en el gel extracto y en el gel placebo, Control: 0.6, Extracto: 0.1, Placebo: 0.2 como se observa en la Fig. 9

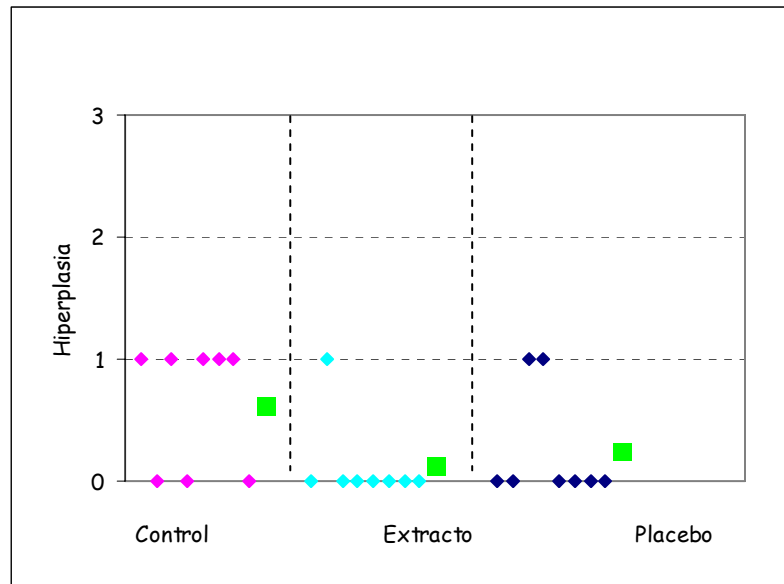


Figura. 9 Evaluación de la hiperplasia, después de la administración por 6 semanas del gel extracto, gel placebo, control normal (sin ninguna aplicación solo alimento y agua), los puntos representan el grado de severidad ausencia: 0, leve: 1 moderado: 2 y severo: 3 de cada corte de la mucosa lado izquierdo, lado derecho, lado anterior y encía, por duplicado de los dos conejos experimentados por grupo.

En cuanto a la hiperplasia pseudoepiteliomatosa, se observó la presencia en el extracto, en comparación a las muestras que recibieron gel placebo y control negativo, que presentaron una ausencia de este tipo de hiperplasia pseudoepiteliomatosa, presentándose con un espesor exagerado a nivel del extracto intermedio Fig. 10

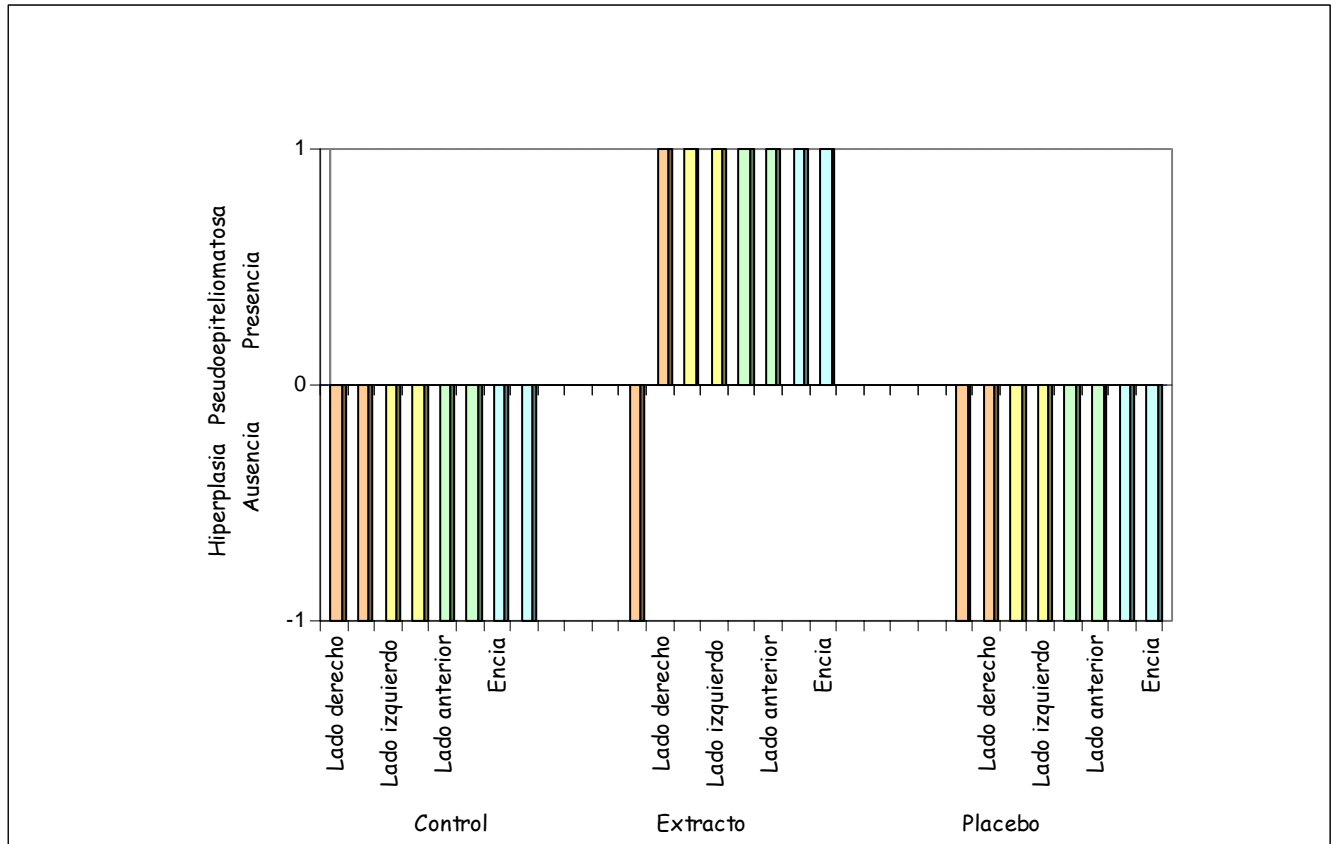


Figura. 10 En la evaluación de la hiperplasia pseudoepiteliomatosa, después de la administración por 6 semanas del gel extracto, gel placebo, control normal (sin ninguna aplicación solo alimento y agua normal), las barras representan la ausencia o presencia encontradas en cada corte de la mucosa lado izquierdo, lado derecho, lado anterior y encía, por duplicado de los dos conejos experimentados por grupo.

La queratinización en la mucosa oral, al realizar el presente estudio se encontró presencia de queratinización, en el control negativo, extracto y placebo no habiendo un aumento significativo.fig 11

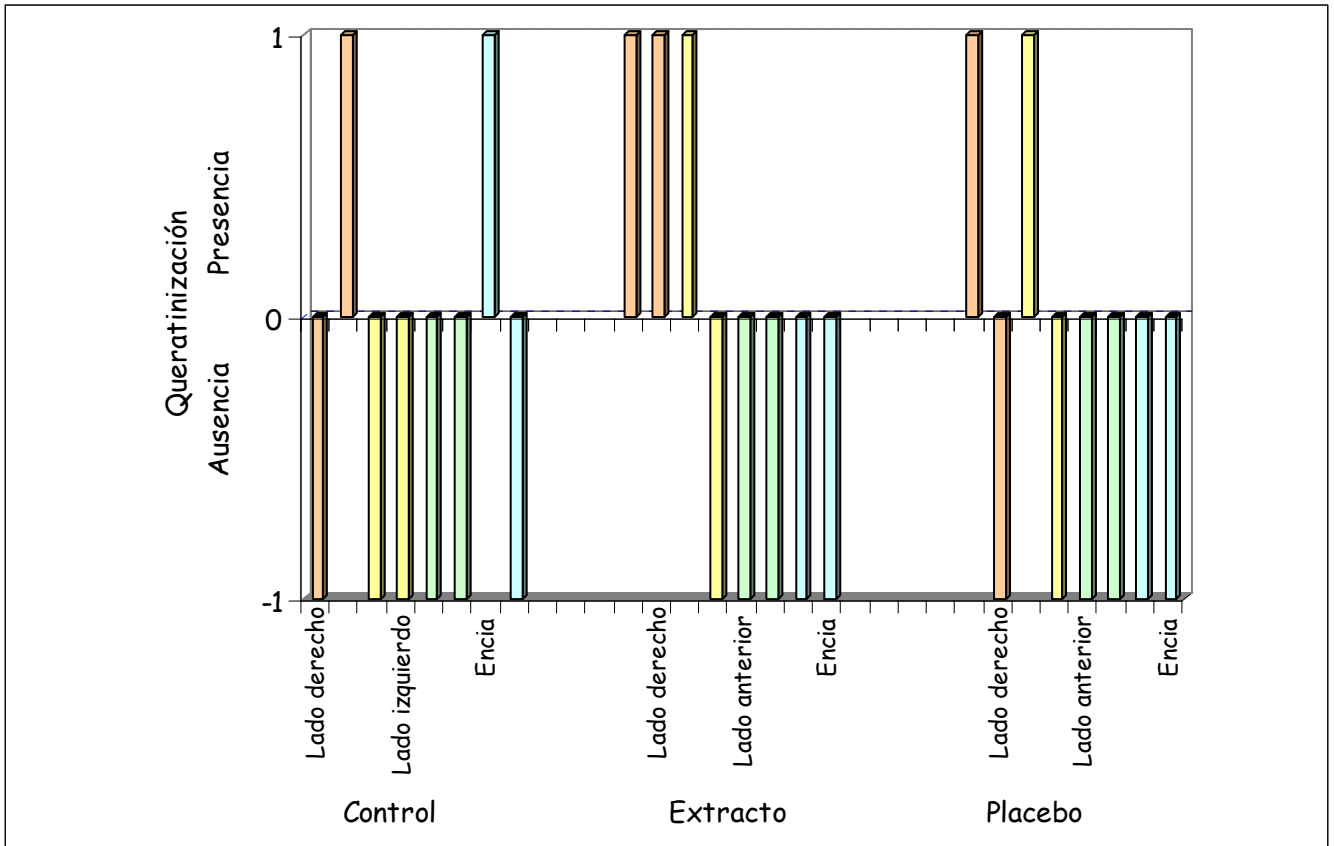


Figura 11. Presencia de queratinización, después de la administración por 6 semanas del gel extracto, gel placebo, control normal (sin ninguna aplicación solo alimento y agua) Las barras representan la ausencia o presencia de queratinización encontradas en cada corte de la mucosa lado izquierdo, lado derecho, lado anterior y encía , por duplicado de los dos conejos experimentales por grupo.

Los eosinofilos presentes en la mucosa no se presento un incremento considerable, encontrando un leve aumento tanto en el gel extracto y control; al contrario se noto una ausencia en los cortes que se expusieron al gel placebo, se observa en la Fig 12

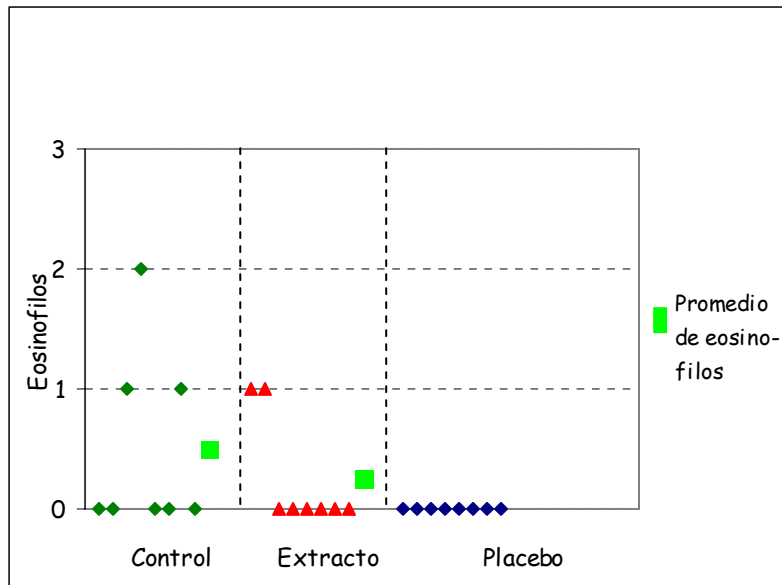


Figura. 12 Evaluación de Eosinofilos, después de la administración por 6 semanas del gel extracto, gel placebo, control normal (sin ninguna aplicación solo alimento y agua), los puntos representan el grado de severidad , 0 : ausencia, 1 : leve, 2: moderado y 3 : severo, de cada corte de la mucosa lado izquierdo, lado derecho, lado anterior y encía , por duplicado de los dos conejos experimentados por grupo.

En la presencia de proyecciones papilares y verrucosas, se observo presencia de estos filamentos en el control y en el extracto y una total ausencia en el placebo como se observan en las Fig. .Las proyecciones verrucosas solo se presento en los cortes que recibieron el gel extracto Fig. 13

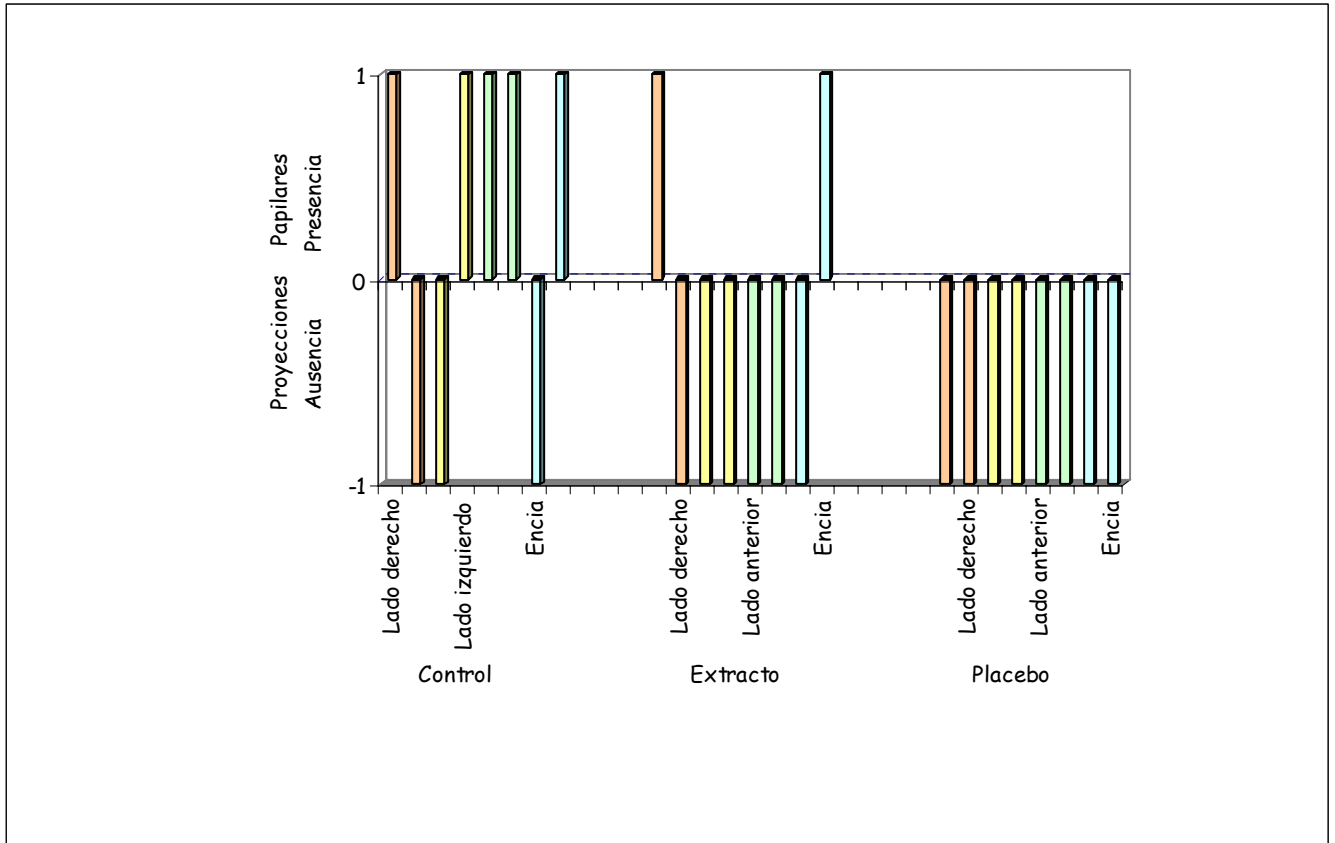


Figura. 13 Presencia de proyecciones papilares, después de la administración por 6 semanas del gel extracto, gel placebo, control normal (sin ninguna aplicación solo alimento y agua), las barras representan la ausencia o presencia de proyecciones papilares, encontradas en cada corte de la mucosa lado izquierdo, lado derecho, lado anterior y encía , por duplicado de los dos conejos experimentados por grupo.

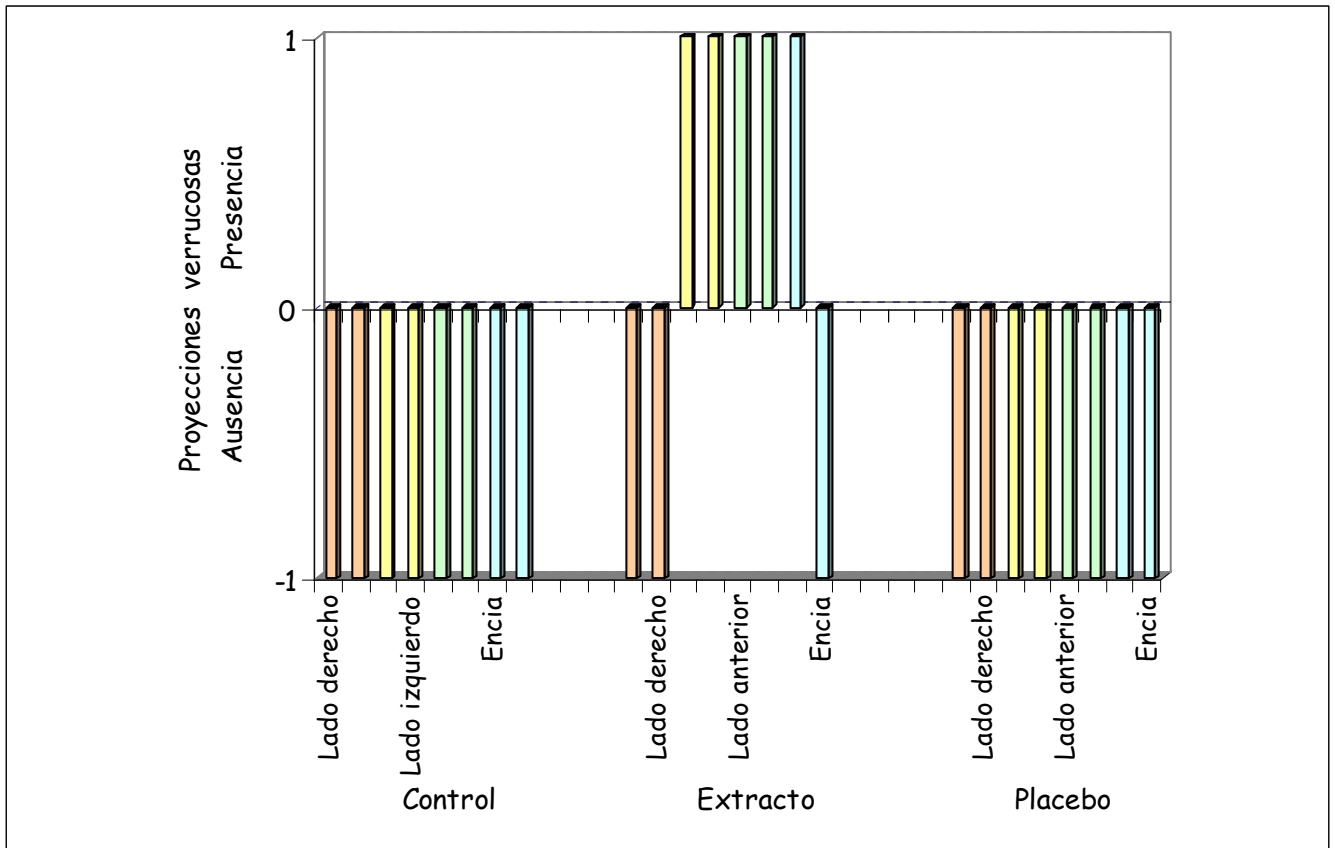


Figura14. Evaluación de las proyecciones verrucosas.- Se examinó después de la administración por 6 semanas del gel extracto, gel placebo, control normal (sin ninguna aplicación solo alimento y agua), las barras representan la ausencia o presencia de proyecciones verrucosas encontradas en cada corte de la mucosa lado izquierdo, lado derecho, lado anterior y encía, por duplicado de los dos conejos experimentados por grupo.

En la presencia de mitosis, se encontró un aumento considerable en las muestras de los animales que recibieron el gel extracto y placebo, con ausencia en el control negativo, lo cual nos muestra una significancia apreciable.

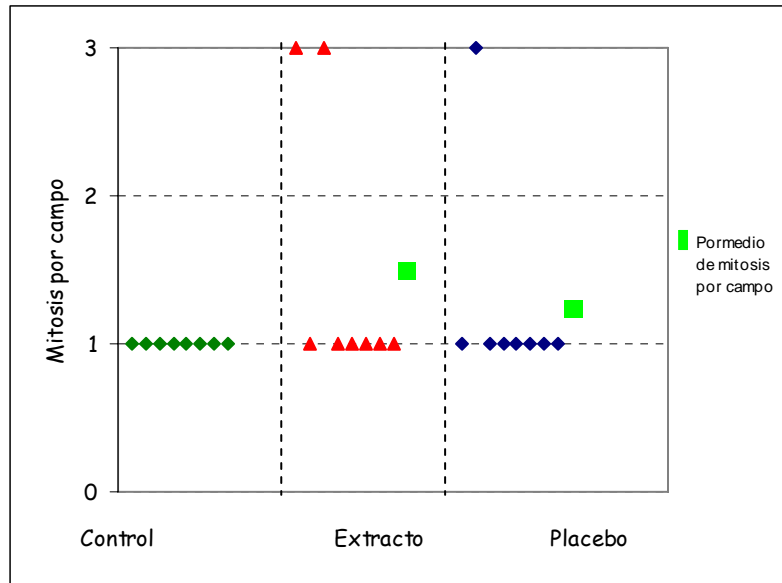


Figura. 15 Evaluación de mitosis por campo, después de la administración por 6 semanas del gel extracto, gel placebo, control normal (sin ninguna aplicación solo alimento y agua normal), los puntos representan el grado de severidad, 0: ausencia, 1: leve, 2: moderado, 3: severo en cada corte de la mucosa lado izquierdo, lado derecho, lado anterior y encía, por duplicado de los dos conejos experimentados por grupo.

En el recuento de las capas de la mucosa oral, se realizó contando diferentes capas de células dispuestas en la mucosa oral. Se hizo énfasis en el estrato intermedio para poder analizar el efecto del producto natural y observar un aumento o disminución de las mismas.

En la mucosa papilar (espesor total) se observó un aumento en el número de capas en los lados laterales derecho e izquierdo donde se utilizó el gel extracto, en el placebo se observa un aumento de capas en el lado derecho, en el control no se observa significancia en el número de capas Fig. 16

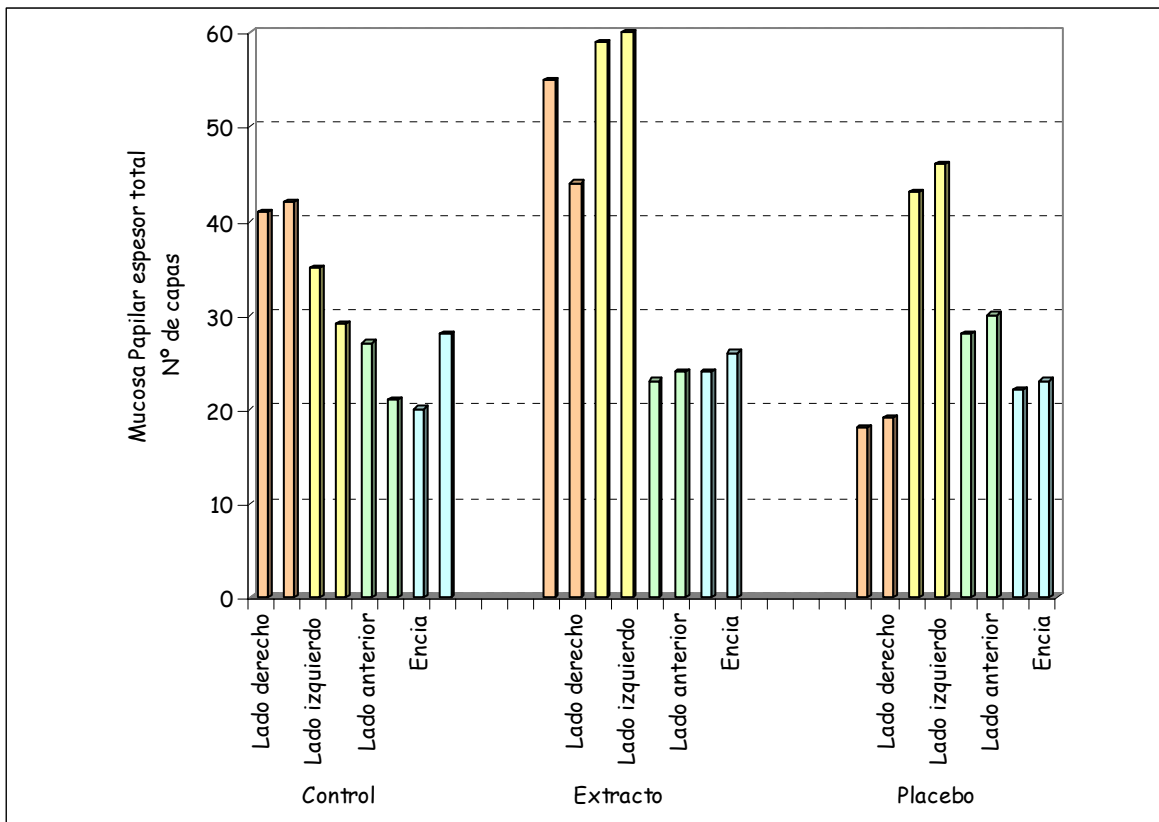


Figura. 16 Evaluación de la mucosa papilar espesor total, después de la administración por 6 semanas del gel extracto, gel placebo, control normal (sin ninguna aplicación solo alimento y agua), Las barras representan el número de capas de células encontradas cada corte de la mucosa lado izquierdo, lado derecho, lado anterior y encía, por duplicado de los dos conejos experimentados por grupo

En el estrato superficial de la mucosa papilar se observa un aumento en los animales que recibieron el gel extracto en comparación al gel placebo y control los cuales no tuvieron un notable aumento en el número de capas como se observa Fig.17.

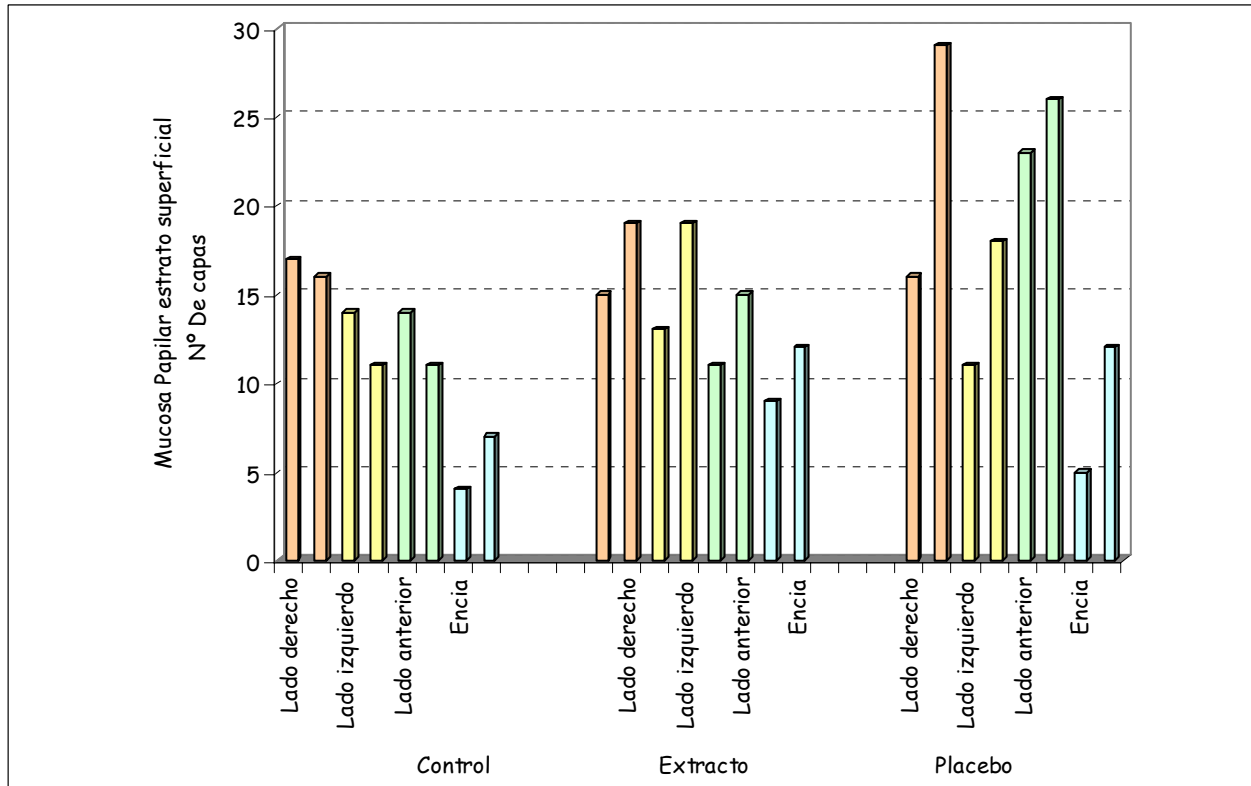


Figura 17 Evaluación de la mucosa papilar estrato superficial, después de la administración por 6 semanas del gel extracto, gel placebo, control normal (sin ninguna aplicación solo alimento y agua), las barras representan en número de capas de células de cada corte de la mucosa lado izquierdo, lado derecho, lado anterior y encía, por duplicado de los dos conejos experimentados por grupo.

En la encía libre espesor total se observó solo un aumento en uno de los cortes del lado derecho del extracto y control y no habiendo un aumento considerable en el placebo, como se observa en la Fig.19

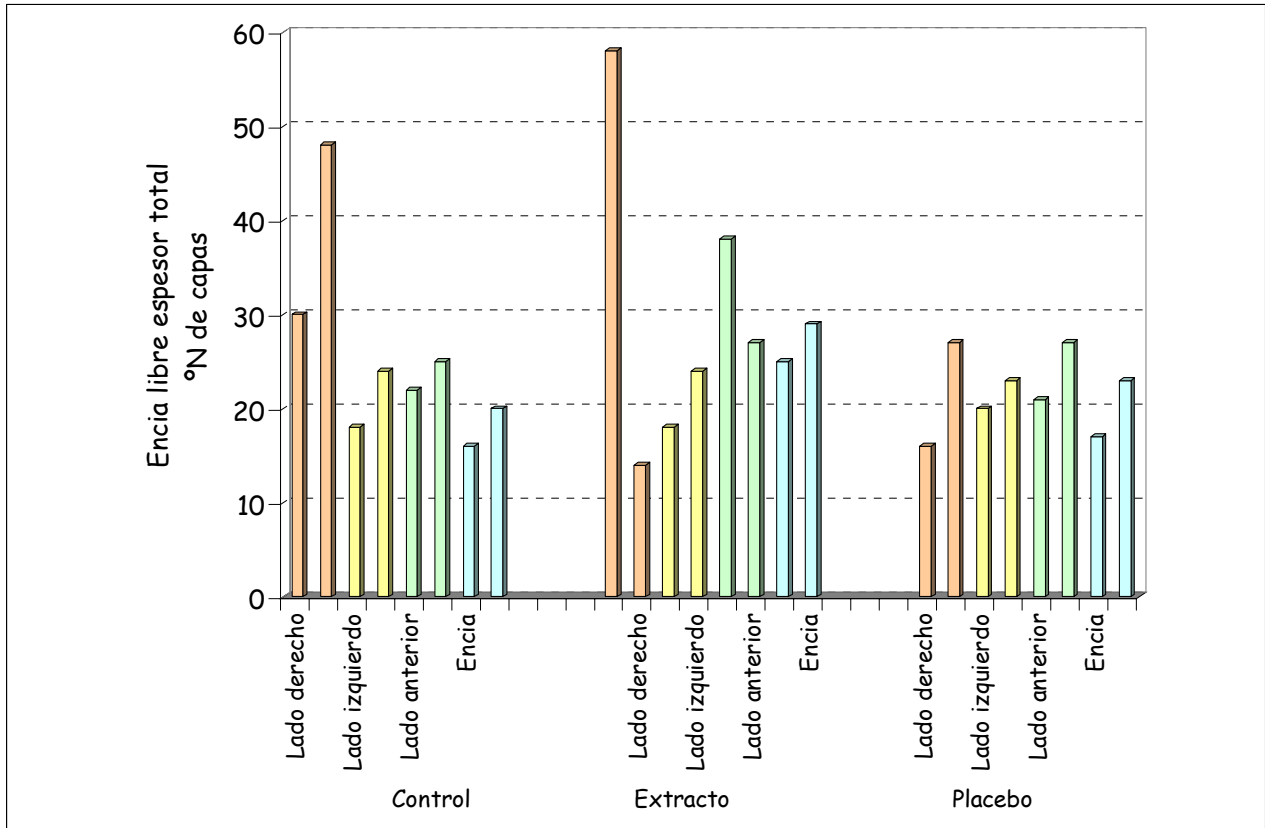


Figura. 19 Evaluación encía libre espesor total, después de la administración por 6 semanas del gel extracto, gel placebo, control normal (sin ninguna aplicación solo alimento y agua normal), las barras representan el número de capas de células de cada corte de la mucosa lado izquierdo, lado derecho, lado anterior y encía, por duplicado de los dos conejos experimentados por grupo.

La encía libre estrato superficial presento un leve aumento del numero de capas en la mayor parte de las muestras estudiadas de los animales que utilizaron extracto y placebo en comparación al control negativo que presento un numero menor de capas como se puede observar en la Fig. 20. En la encía libre estrato superficial solo se encontró un aumento en el número e capas en el corte del lado derecho del extracto y en un solo corte del control negativo, en el placebo se noto un ligero aumento en el número de capas en negativo, en el placebo se noto un ligero aumento en el número de capas en comparación al extracto.

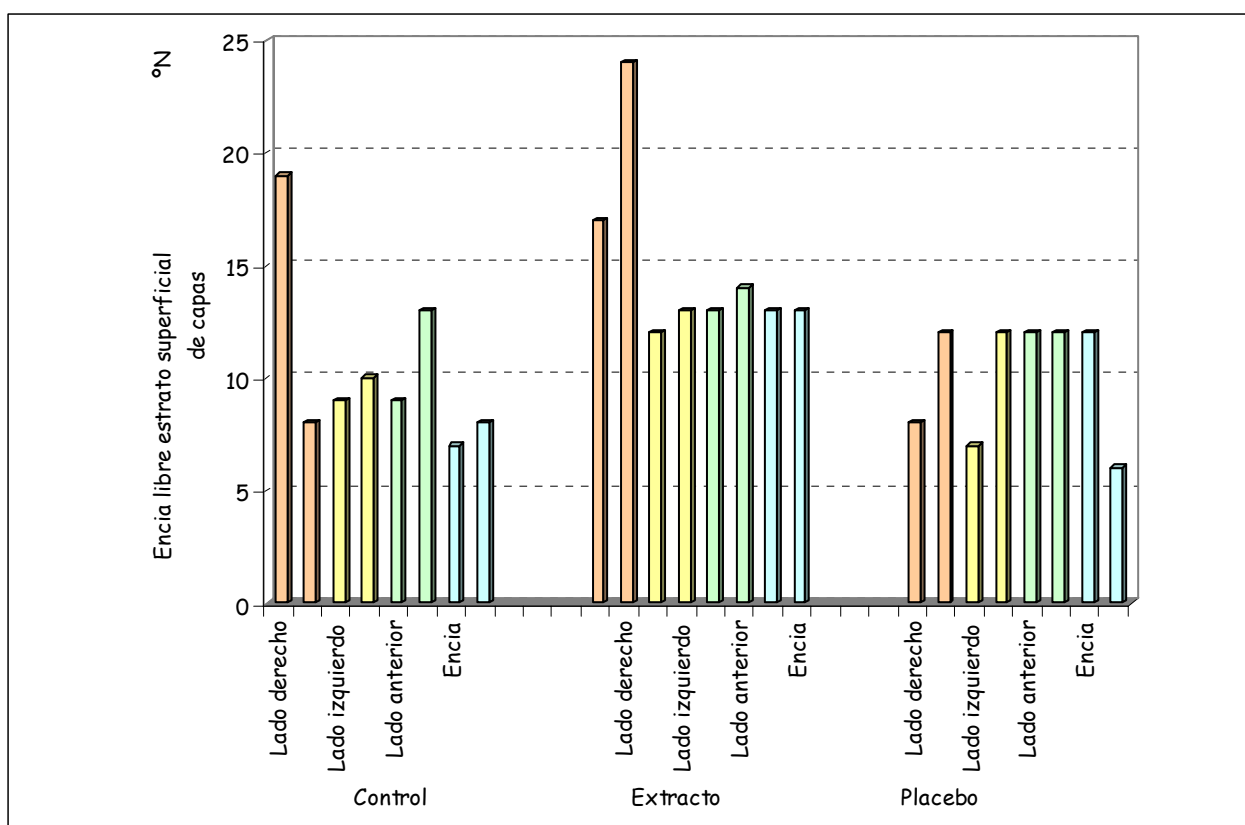


Figura. 20 Evaluación de la encía estrato superficial, después de la administración por 6 semanas del gel extracto, gel placebo, control normal (sin ninguna aplicación solo alimento y agua normal), las barras representan el numero de capas de células de cada corte de la mucosa lado izquierdo, lado derecho, lado anterior y encia, por duplicado de los dos conejos experimentados por grupo.

En la encía libre estrato intermedio se encontró un aumento en el número de capas solo en los lados derecho e izquierdo en comparación al control negativo, el placebo no presenta significancia en el aumento de capas.

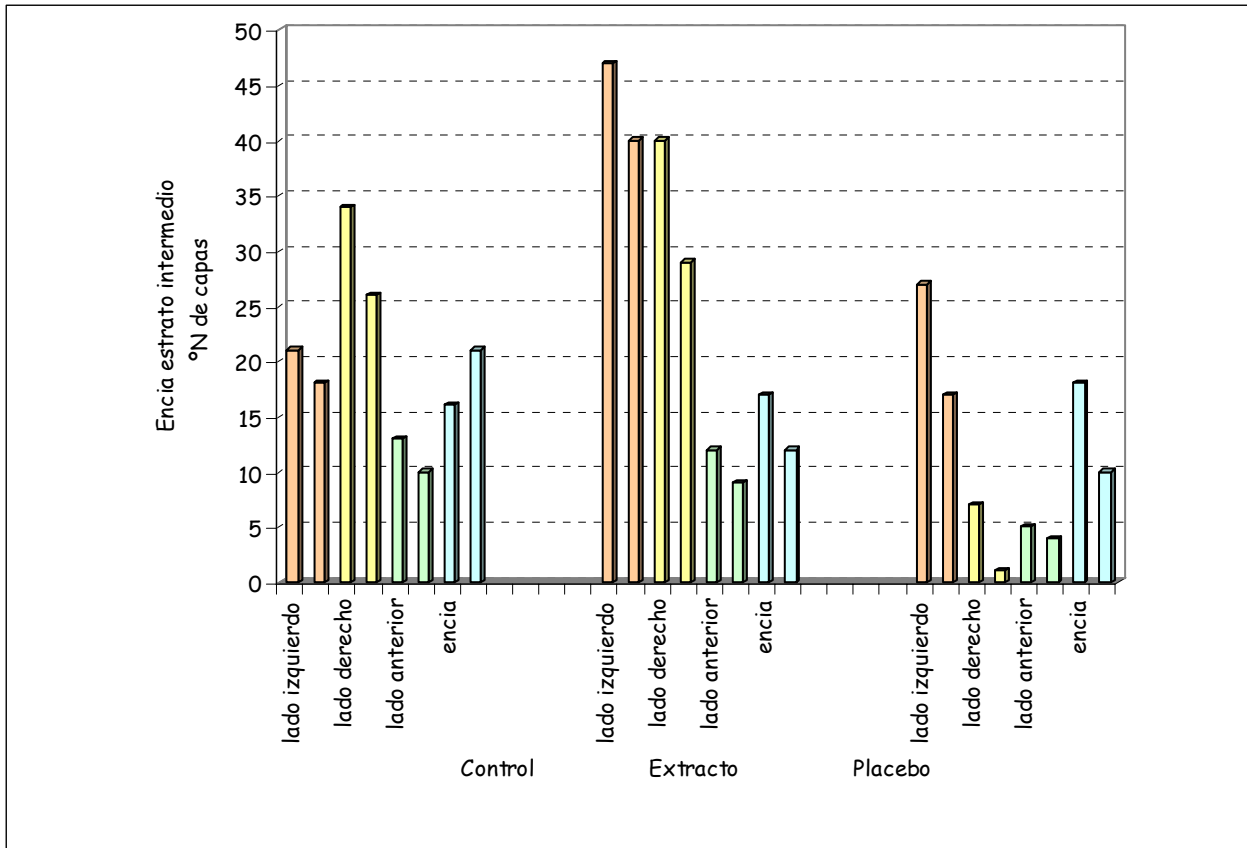


Figura 21. Evaluación encía libre estrato intermedio, después de la administración por 6 semanas del gel extracto, gel placebo, control normal (sin ninguna aplicación solo alimento y agua normal), las barras representan el número de capas de células encontradas en cada corte de la mucosa lado izquierdo, lado derecho, lado anterior y encía, por duplicado de los dos conejos experimentados por grupo.

VII.Resultados.-

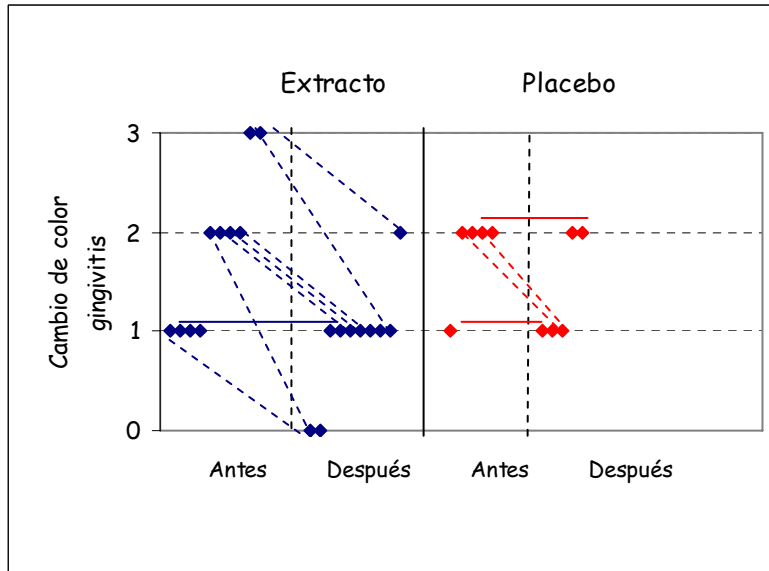
Estudio Clínico

Para examinar el efecto de este enjuague bucal *in vivo*, se administro en 8 pacientes diagnosticados con gingivitis marginal localizada (GML) y 7 con gingivitis marginal generalizada (GMG) a 12 personas con periodontitis destructiva crónica (EPDC) y 3 con enfermedad periodontal local (EPL).

La evaluación de los signos y síntomas gingivoperiodontales y la presencia de microorganismos se evaluó antes y después de la administración del enjuague extracto y enjuague placebo. Se hace énfasis en el hecho de que además del tratamiento con el enjuague (con extracto o placebo) todos los pacientes fueron sometidos a curetaje o tartrectomia o limpieza bucal , para eliminar la placa bacteriana y sarro que contienen agentes nocivos que causan daño .

Las Figuras 24 y 25 nos muestra el cambio del color en pacientes con gingivitis y periodontitis antes y después del tratamiento de cada paciente que utilizo el enjuague bucal extracto y placebo, viéndose un significativa disminución en el grado de severidad del cambio de color en los pacientes que utilizaron enjuague extracto con respecto a los pacientes que utilizaron placebo en ambas enfermedades.En los que recibieron placebo (y curetaje) la disminución se pudo ver en un grado o no hubo variación . En cambio en los pacientes con extracto se observo solo en una caso ausencia de variación y la disminución fue en uno o dos grados. En el promedio de pendientes, se encontró un aumento significativo en los pacientes tanto de gingivitis como de periodontitis que utilizaron enjuague extracto, con respecto a los pacientes que utilizaron enjuague placebo.

a)



b)

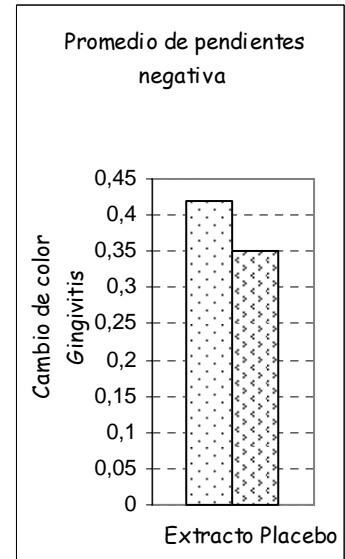
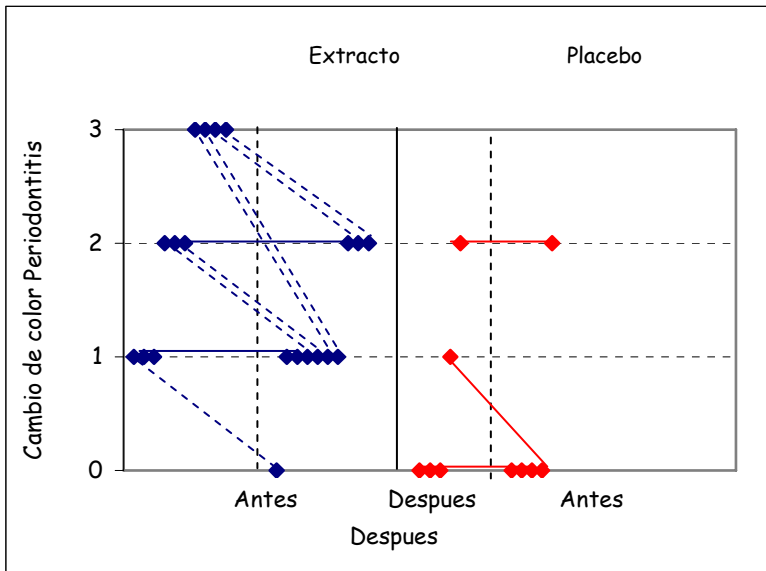


Figura 24 Evaluación semicuantitativa del cambio de color y promedio de pendientes. a) Pacientes con gingivitis antes y después del tratamiento con el enjuague bucal extracto y placebo. Los puntos representan el grado de severidad de la enfermedad. 0: ausencia, 1: leve, 2: moderado y 3: avanzado. b) Diferencia del promedio de las pendientes negativas.

a)

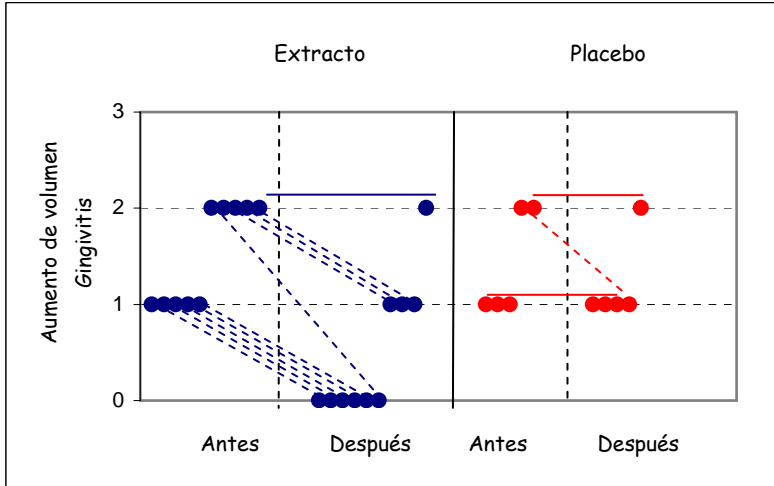


b)

Figura 25. Evaluación semicuantitativa del cambio de color y promedio de pendientes. a) Pacientes con periodontitis antes y después del tratamiento con el enjuague bucal extracto y placebo. Los puntos representan el grado de severidad de la enfermedad. 0: ausencia, 1: leve, 2: moderado y 3: avanzado. b) Diferencia del promedio de las pendientes negativas.

Las figuras 26 y 27 nos muestran el cambio del aumento de volumen en ambas enfermedades (tanto gingivitis y periodontitis) con sus respectivos promedios de pendientes en los que se observo una disminución significativa en el grado de severidad de los pacientes tratados con enjuague extracto, en comparación a los pacientes tratados con el enjuague placebo.

a)



b)

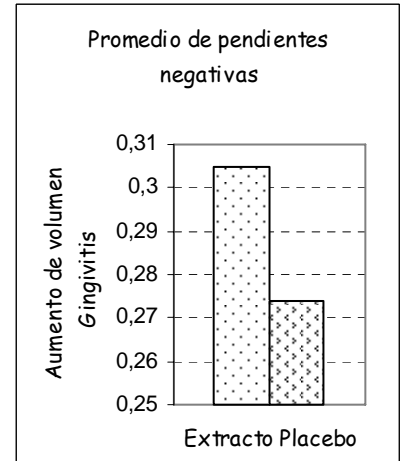
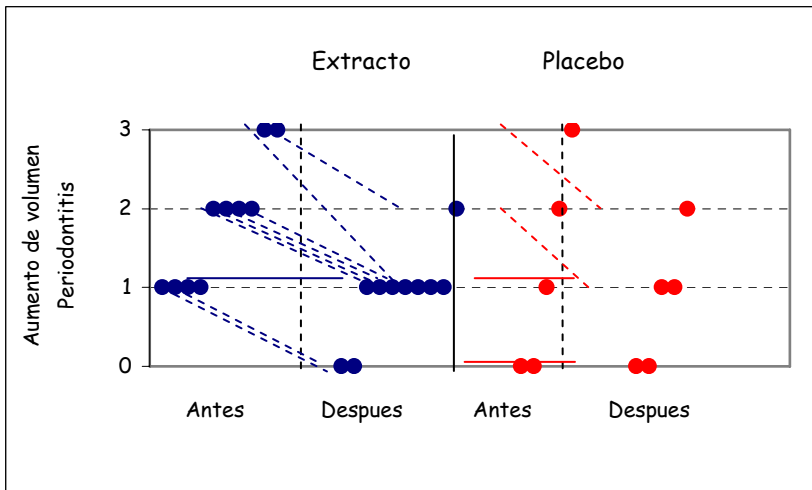


Figura 26. **Evaluación semicuantitativa del aumento de volumen y promedio de pendientes.** a) Pacientes con gingivitis antes y después del tratamiento con el enjuague bucal extracto y placebo. Los puntos representan el grado de severidad de la enfermedad. 0: ausencia, 1: leve, 2: moderado y 3: avanzado. b) Diferencia del promedio de las pendientes negativas.

a)



b)

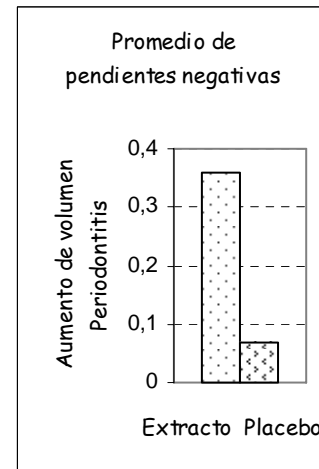
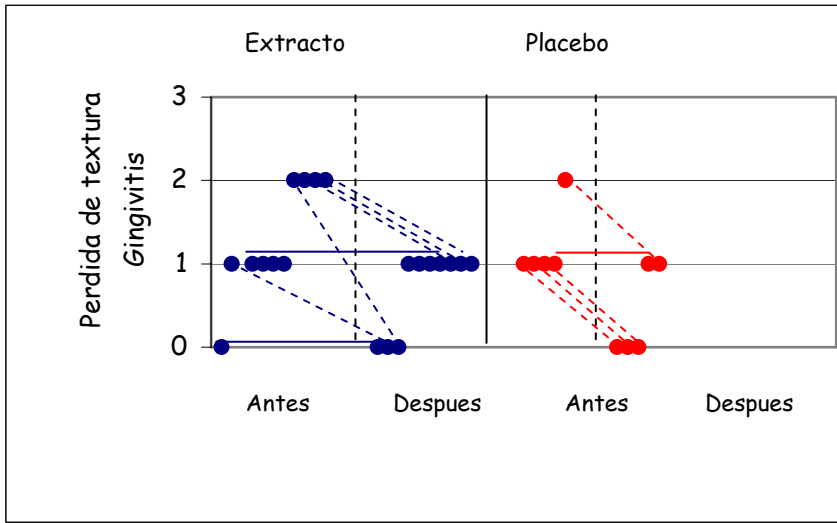


Figura 27. **Evaluación semicuantitativa del aumento de volumen y promedio de pendientes.** a) Pacientes seleccionados con periodontitis antes y después del tratamiento con el enjuague bucal extracto y placebo. Los puntos representan el grado de severidad de la enfermedad. 0: ausencia, 1: leve, 2: moderado y 3: avanzado. b) Diferencia del promedio de las pendientes negativas.

En las Figura. 28y 29nos muestran los cambios de perdida de textura en los pacientes con gingivitis y periodontitis con sus respectivos promedios de pendientes donde se observo una disminucion en los pacientes con gingivitis ,una importante disminucion en los pacientes con periodontitis que utilizaron enjuague extracto.

a)



b)

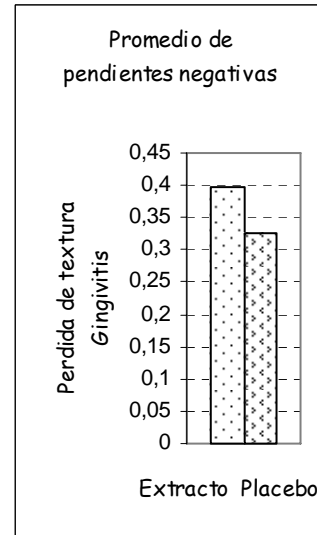
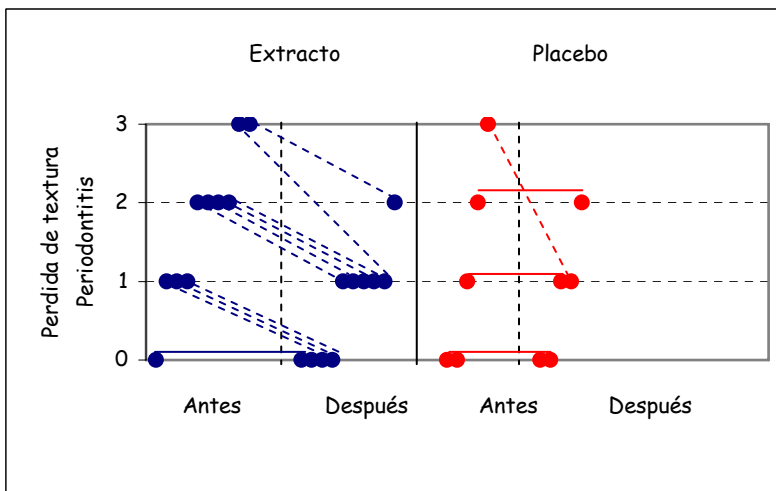


Figura. 28 **Evaluación semicuantitativa de la perdida de textura y promedio de pendientes.** a) Pacientes con gingivitis antes y después del tratamiento con el enjuague bucal extracto y placebo. Los puntos representan el grado de severidad de la enfermedad. , 0: ausencia, 1: leve, 2: moderado y 3: avanzado. .b) Diferencia del promedio de las pendientes negativas.

a)



b)

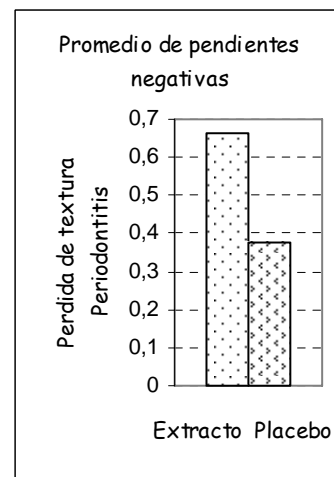


Figura. 29.**Evaluación semicuantitativa de la perdida de textura y promedio de pendientes.** a) Pacientes con periodontitis antes y después del tratamiento con el enjuague bucal extracto y placebo. Los puntos representan el grado de severidad de la enfermedad, 0: ausencia, 1: leve, 2: moderado y 3: avanzado. b) Diferencia del promedio de las pendientes negativas.

Las figuras 30 y 31 muestran el dolor presente antes y después del tratamiento de los pacientes tanto con gingivitis y periodontitis con sus promedios de pendientes. No se observó diferencia en ambos casos de pacientes, entre los tratados con el enjuague extracto con respecto a los pacientes que utilizaron enjuague placebo.

a)

b)

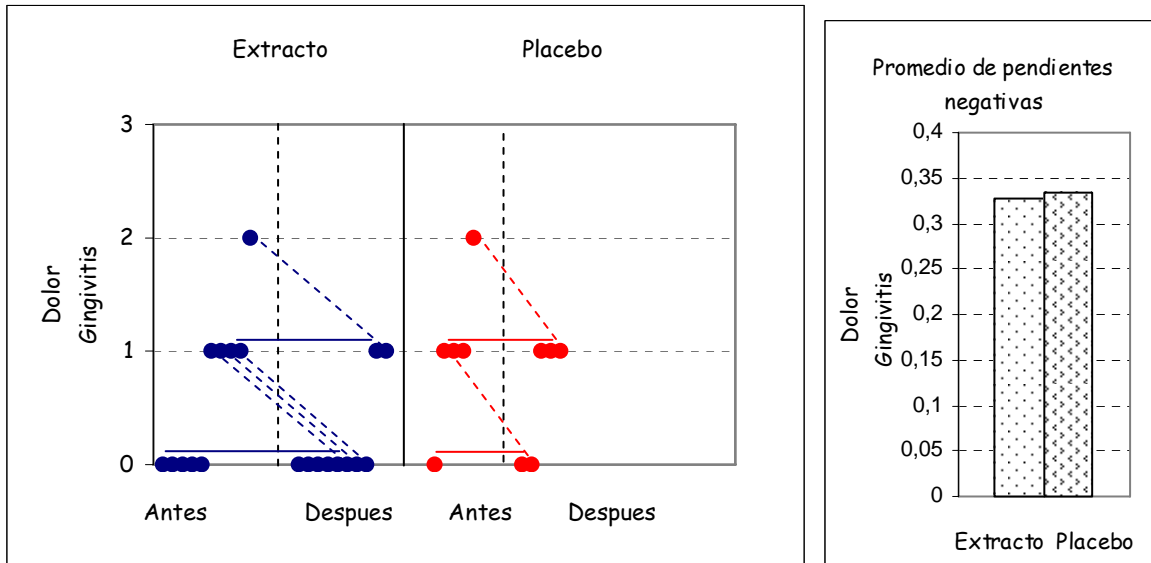


Figura 30. **Evaluación semicuantitativa de la presencia de dolor y promedio de pendientes.** a) Pacientes con gingivitis antes y después del tratamiento con el enjuague bucal extracto y placebo. Los puntos representan el grado de severidad de la enfermedad. , 0: ausencia, 1: leve, 2: moderado y 3: avanzado. b) Diferencia del promedio de las pendientes negativas.

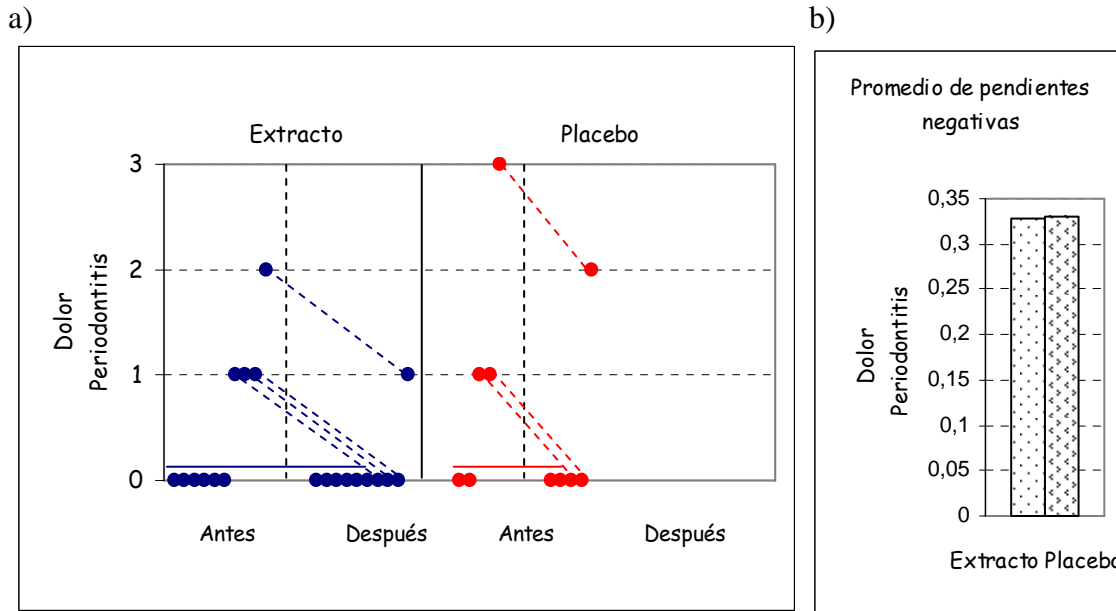


Figura 31. Evaluación semicuantitativa de la presencia de dolor y promedio de pendientes. a) Pacientes con periodontitis antes y después del tratamiento con el enjuague bucal extracto y placebo. Los puntos representan el grado de severidad de la enfermedad. , 0: ausencia, 1: leve, 2: moderado y 3: avanzado. b) Diferencia del promedio de las pendientes negativas.

La Fig. 32 y 33 nos muestra la pérdida de función de los pacientes que cursaban gingivitis /o periodontitis antes y después del tratamiento, donde no encontró un número de pacientes que tuvieran la pérdida de función, no encontrando valores comparativos significativos en los promedios de pendientes.

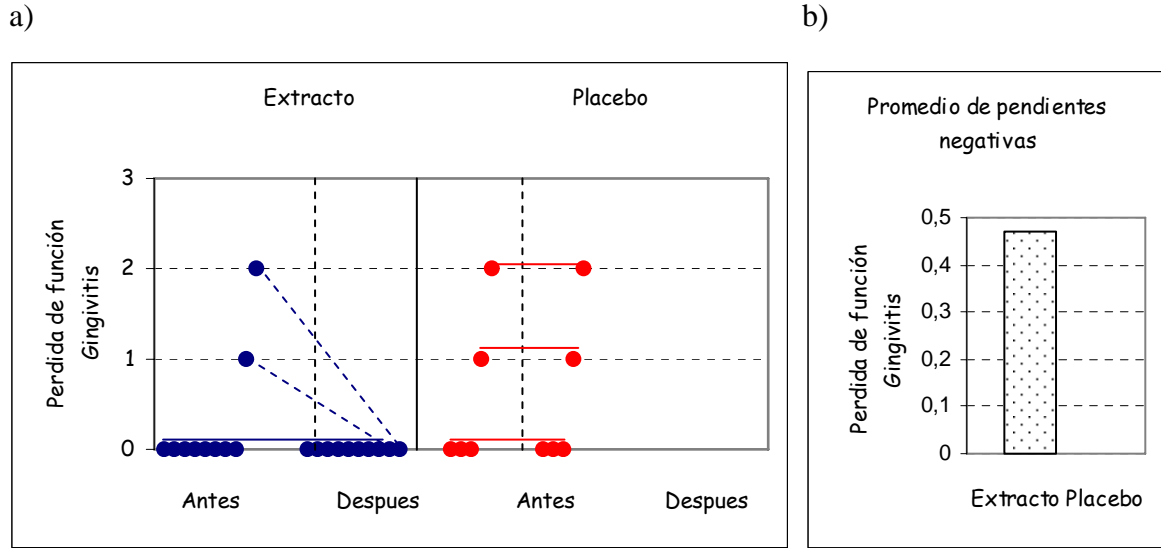


Figura. 32. **Evaluación semicuantitativa de la pérdida de función y promedio de pendientes.** a) Pacientes con gingivitis antes y después del tratamiento con el enjuague bucal extracto y placebo. Los puntos representan el grado de severidad de la enfermedad. , 0: ausencia, 1: leve, 2: moderado y 3: avanzado. b) Diferencia del promedio de las pendientes negativas.

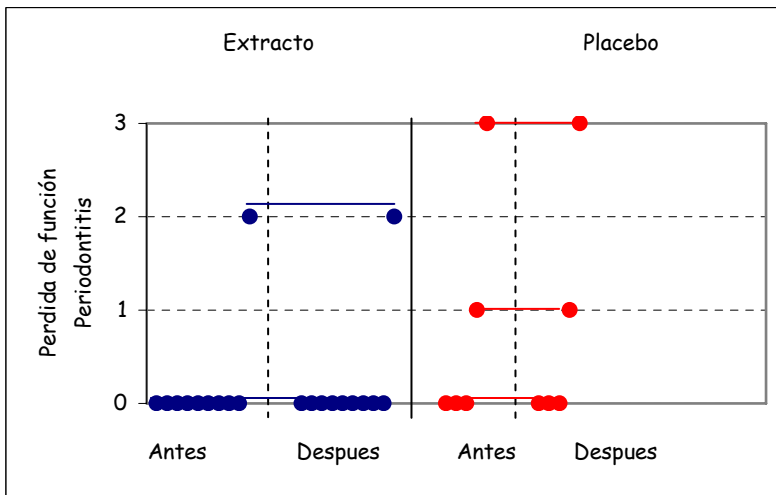
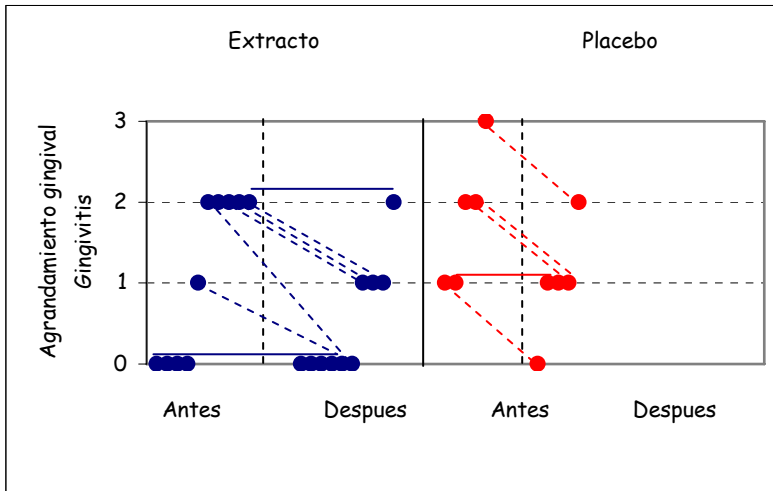


Figura. 33. **Evaluación semicuantitativa de la pérdida de función y promedio de pendientes.** a) Pacientes con periodontitis antes y después del tratamiento con el enjuague bucal extracto y placebo. Los puntos representan el grado de severidad de la enfermedad. , 0: Ausencia, 1: leve, 2: moderado y 3: avanzado.

En la evaluación del agrandamiento gingival antes y después del tratamiento de los pacientes tanto con gingivitis y periodontitis Figuras 34 y 35 con sus promedios de pendientes, al realizar el examen se observó una disminución en ambos casos de pacientes, viéndose una mayor disminución en la severidad del síntoma en los pacientes con gingivitis que utilizaron enjuague extracto que se evidenció en el promedio de pendientes, con respecto a los pacientes que utilizaron enjuague placebo.

a)



b)

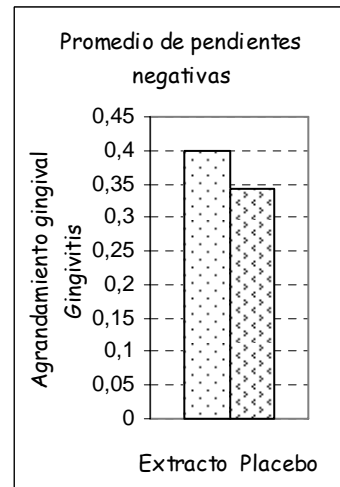
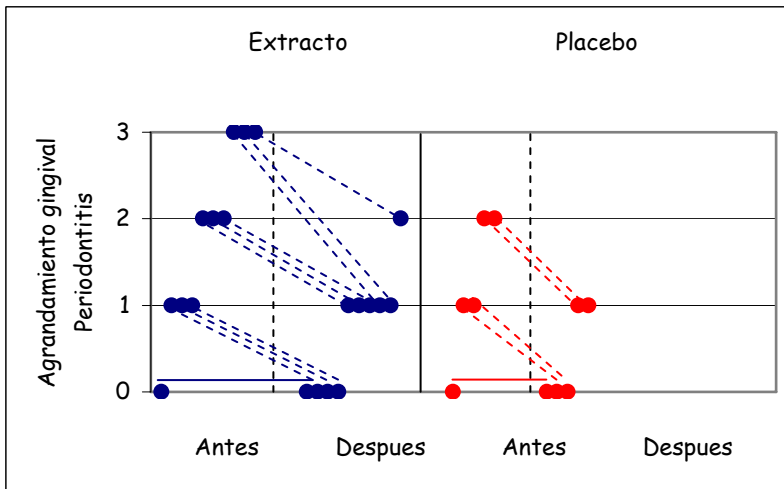


Figura. 34. Evaluación d semicuantitativa del agrandamiento gingival y promedio de pendientes. a) .Pacientes con gingivitis antes y después del tratamiento con el enjuague bucal extracto y placebo. Los puntos representan el grado de severidad de la enfermedad. , 0: ausencia, 1: leve, 2: moderado y 3: avanzado. b) Diferencia del promedio de las pendientes negativas.

a)



b)

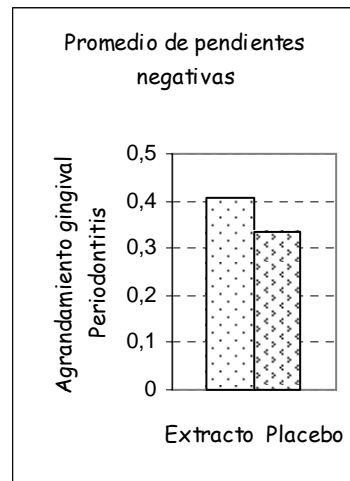
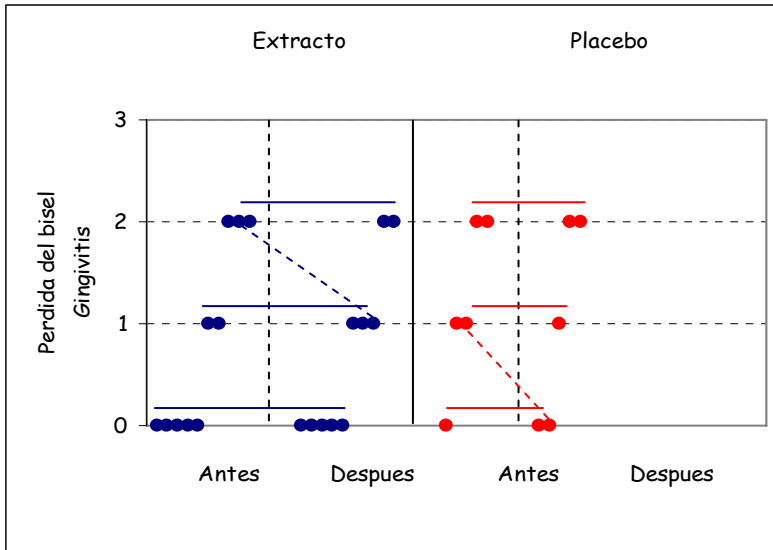


Figura.35. Evaluación semicuantitativa del Agrandamiento gingival y promedio de pendientes. a) .Pacientes con periodontitis antes y después del tratamiento con el enjuague bucal extracto y placebo. Los puntos representan el grado de severidad de la enfermedad. , 0: ausencia, 1: leve, 2: moderado y 3: avanzado) Diferencia del promedio de las pendientes negativas.

La evaluación de la perdida del bisel en los pacientes con gingivitis y periodontitis, antes y después de la utilización del enjuague extracto y placebo como muestran las Figuras 36 y 37 se observaron diferencias importantes en la disminución de la severidad de este síntoma en los pacientes con gingivitis y periodontitis que utilizaron enjuague extracto.

a)



b)

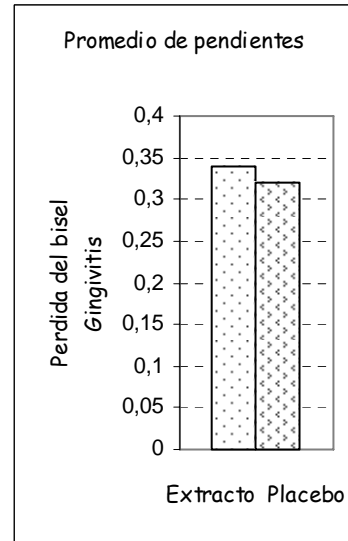
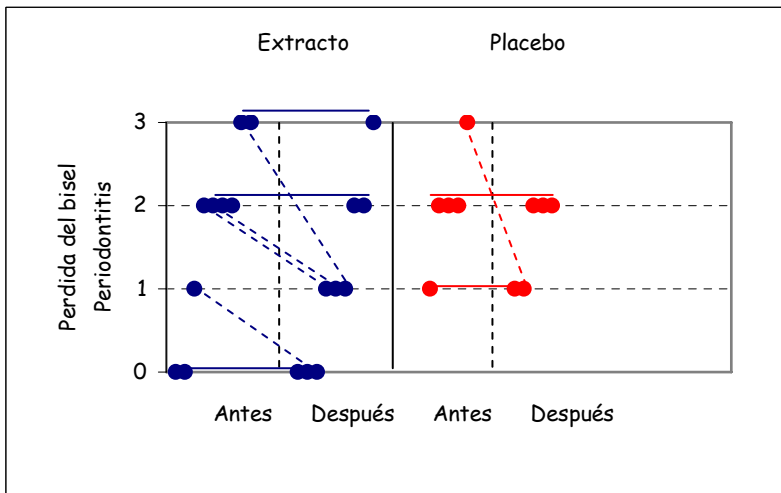


Figura. 36. Evaluación semicuantitativa de la pérdida del bisel y promedio de pendientes . a) Pacientes con gingivitis antes y después del tratamiento con el enjuague bucal extracto y placebo. Los puntos representan el grado de severidad de la enfermedad. , 0: Ausencia, 1: leve, 2: moderado y 3: avanzado. .b) Diferencia del promedio de las pendientes negativas.

a)



b)

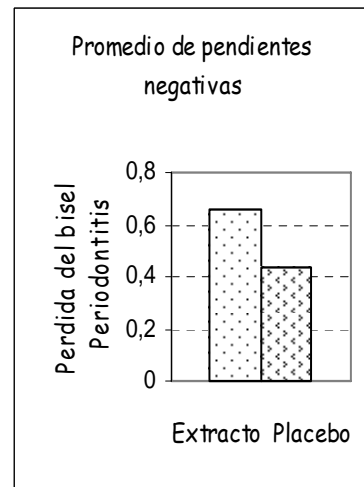
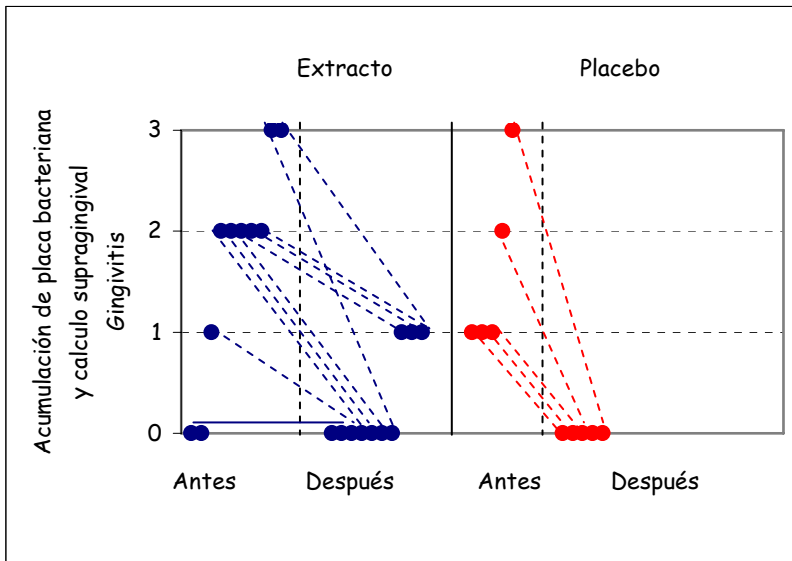


Figura. 37. Evaluación semicuantitativa de la pérdida del bisel y promedio de pendientes. a) Pacientes con periodontitis antes y después del tratamiento con el enjuague bucal extracto y placebo. Los puntos representan el grado de severidad de la enfermedad. , 0: ausencia, 1: leve, 2: moderado y 3: avanzado. .b) Diferencia del promedio de las pendientes negativas.

Las Figuras. 38 y 39 nos muestran la acumulación de placa bacteriana y calculo supragingival de los pacientes con gingivitis y periodontitis, con tratamiento antes y después de la utilización del enjuague extracto y placebo. Se observo una disminución de la severidad en los pacientes con gingivitis y periodontitis que utilizaron enjuague extracto y el placebo. Al reportar conviene recordar que ambos grupos (placebo y extracto) fueron sometidos a curetaje, lo cual explica el hecho de la disminución.

a)



b)

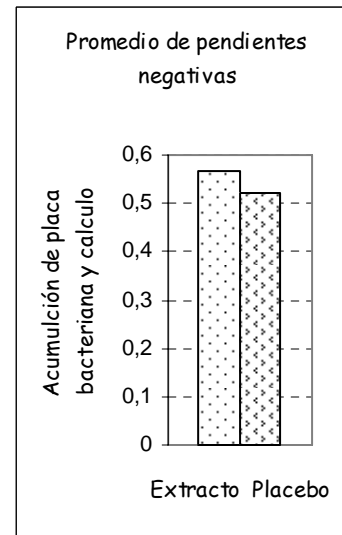
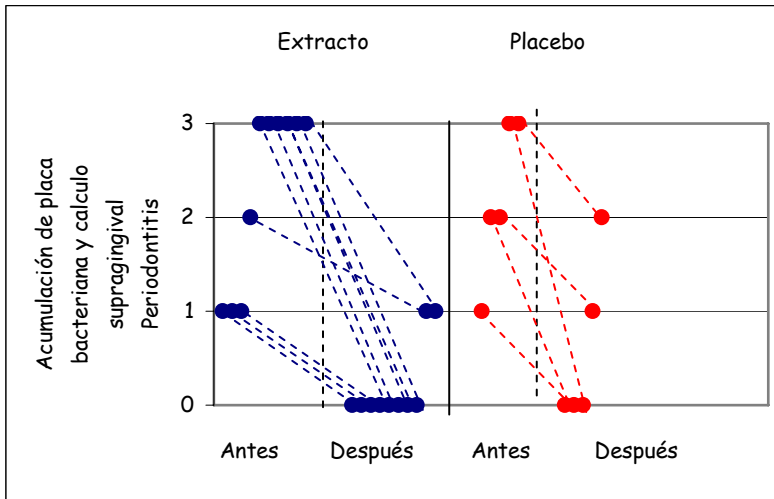


Figura. 38. Evaluación semicuantitativa de la .Acumulación de placa bacteriana y calculo supragingival y promedio de pendientes . a) Pacientes con gingivitis antes y después del tratamiento con el enjuague bucal extracto y placebo. Los puntos representan el grado de severidad de la enfermedad. , 0: ausencia, 1: leve, 2: moderado y 3: avanzado. b) Diferencia del promedio de las pendientes negativas.

a)



b)

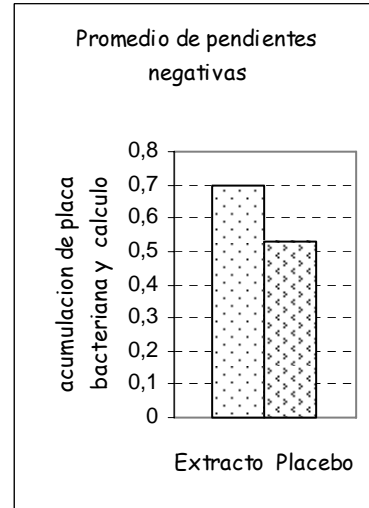


Figura. 39. Evaluación semicuantitativa de Acumulación de placa bacteriana y calculo supragingival y promedio de pendientes. a) Pacientes con periodontitis antes y después del tratamiento con el enjuague bucal extracto y placebo. Los puntos representan el grado de severidad de la enfermedad. 0: ausencia, 1: leve, 2: moderado y 3: avanzado. b) Diferencia del promedio de las pendientes negativas.

Las Figuras 40 y 41 nos muestra la acumulación de calculo subgingival antes y después del tratamiento de los pacientes con gingivitis y periodontitis, donde se observo una disminución en la severidad tanto en los pacientes con gingivitis como en los de periodontitis que utilizaron enjuague extracto y placebo. En la comparación del promedio de pendientes en los pacientes que utilizaron enjuague placebo, no mostrando diferencia entre ambos enjuagues.

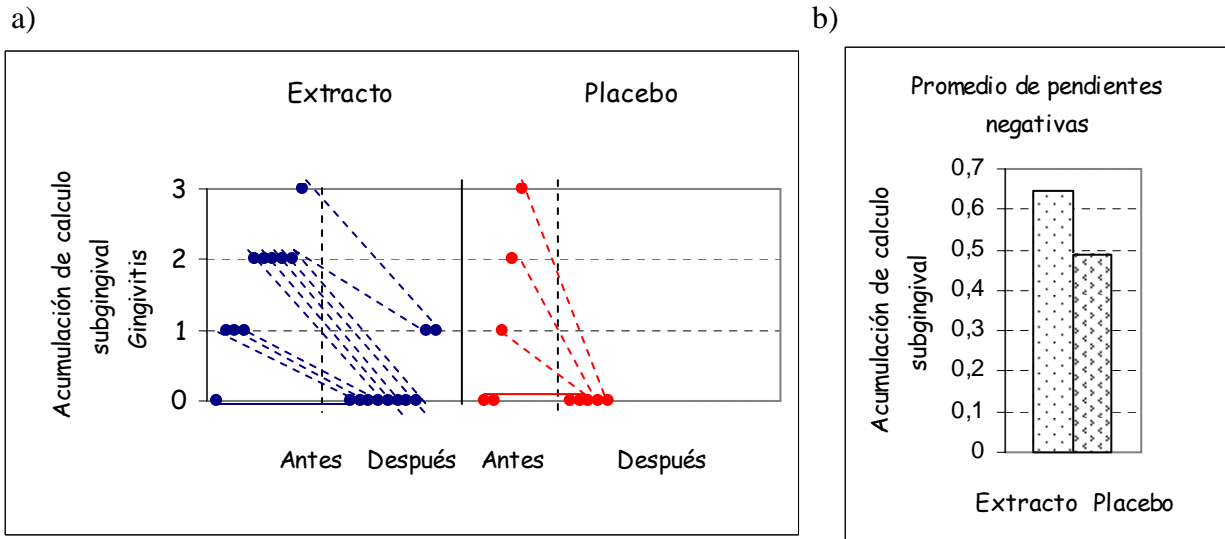


Figura. 40 Evaluación semicuantitativa de la acumulación de calculo subgingival y promedio de pendientes. a) Pacientes con gingivitis antes y después del tratamiento con el enjuague bucal extracto y placebo. Los puntos representan el grado de severidad de la enfermedad. , 0: ausencia, 1: leve, 2: moderado y 3: avanzado. b) Diferencia del promedio de las pendientes negativas.

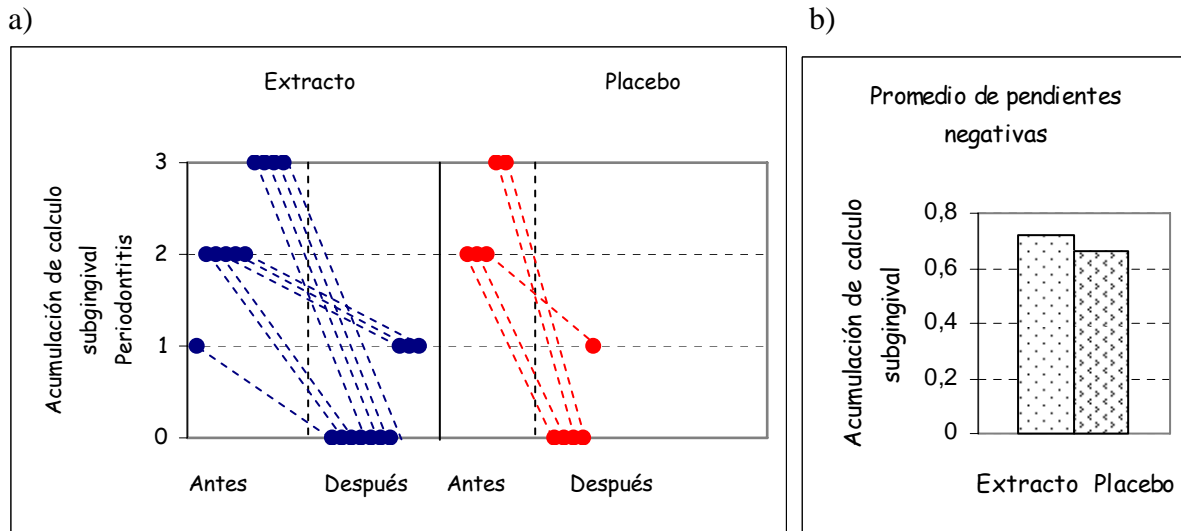
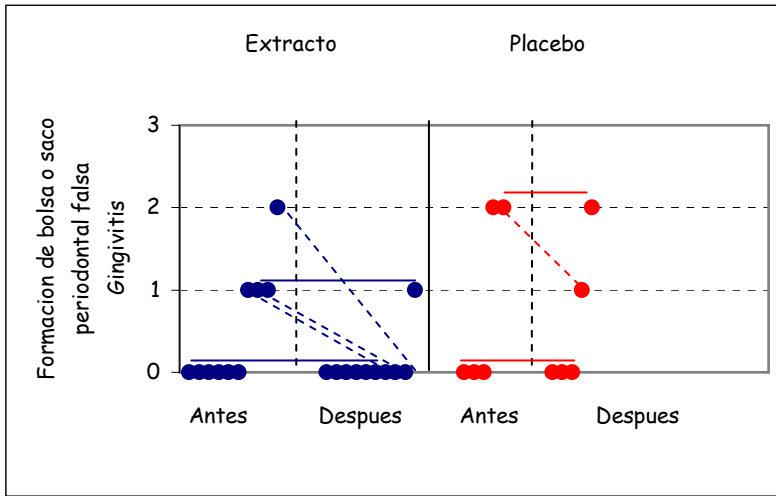


Figura. 41 .Evaluación semicuantitativa de la acumulación de calculo subgingival y promedio de pendientes. a) Pacientes con periodontitis antes y después del tratamiento con el enjuague bucal extracto y placebo. Los puntos representan el grado de severidad de la enfermedad. , 0: ausencia, 1: leve, 2: moderado y 3: avanzado. b) Diferencia del promedio de las pendientes negativas.

La evaluación de la formación de la bolsa o saco periodontal falsa figuras 42 y 43 de los pacientes con gingivitis y periodontitis, muestra una disminución en la formación de la bolsa en los pacientes con gingivitis y periodontitis que utilizaron enjuague extracto, levemente mejoría en los pacientes que utilizaron enjuague placebo.

a)



b)

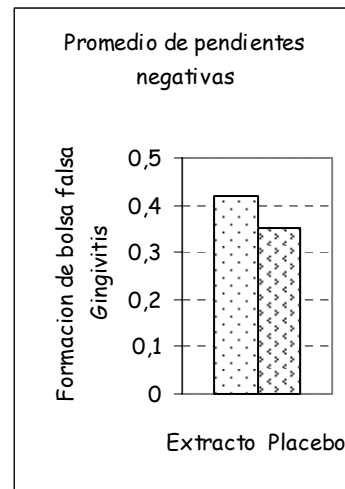
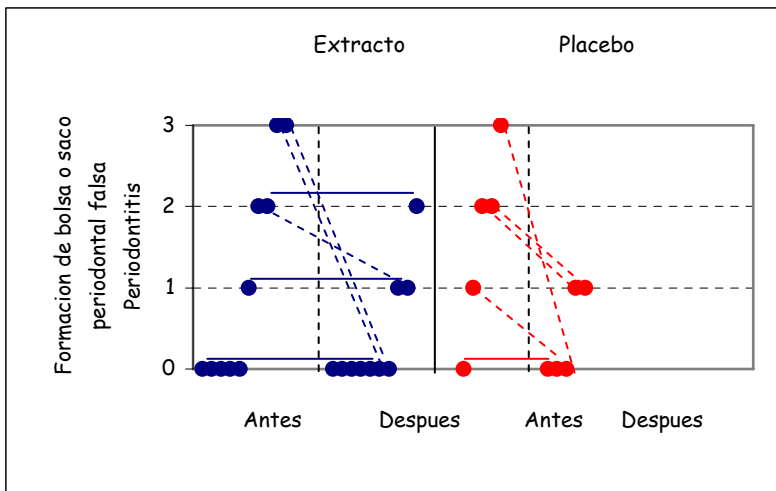


Figura. 42. **Evaluación semicuantitativa de la formación de bolsa o saco periodontal falsa y promedio de pendientes.** a) Pacientes con gingivitis, antes y después del tratamiento con el enjuague bucal extracto y placebo. Los puntos representan el grado de severidad de la enfermedad. 0: ausencia, 1: leve, 2: moderado y 3: avanzado. b) Diferencia del promedio de las pendientes negativas.

a)



b)

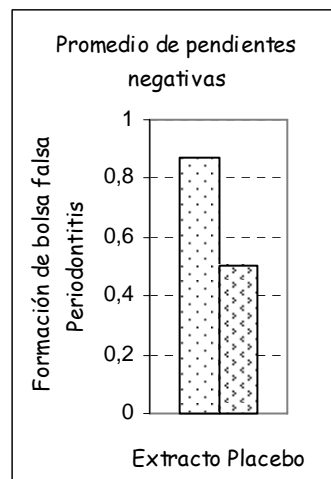
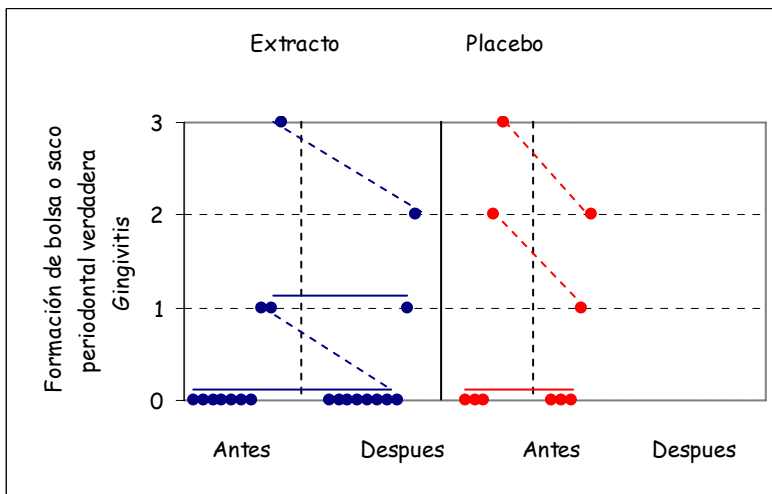


Figura. 43 **Evaluación semicuantitativa de la formación de bolsa o saco periodontal falsa y promedio de pendientes.** a) Pacientes con periodontitis antes y después del tratamiento con el enjuague bucal extracto y placebo. Los puntos representan el grado de severidad de la enfermedad. 0: ausencia, 1: leve, 2: moderado y 3: avanzado. b) Diferencia del promedio de las pendientes negativas.

La evaluación de la formación de la bolsa o saco periodontal verdadera en los pacientes que realizaron el tratamiento, solo mostró una disminución en los pacientes con periodontitis que utilizaron enjuague extracto, en comparación de los pacientes con gingivitis, donde no se observó diferencia en los pacientes que utilizaron enjuague placebo como muestran las Figuras 44 y 45. Si bien la diferencia de promedio de pendientes es elevada en el caso de los pacientes con periodontitis, cabe aclarar que tal diferencia es falsa por el hecho de que en los pacientes que recibieron placebo no hubo cambio en la bolsa, al final la disminución fue debida a que ambos grupos recibieron el curetaje.

a)



b)

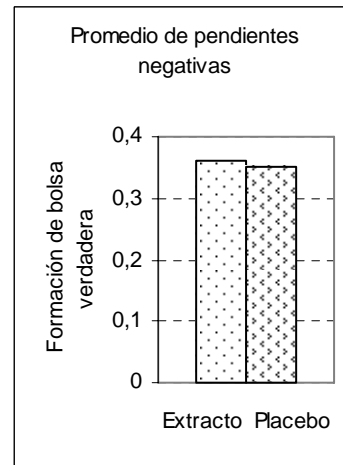
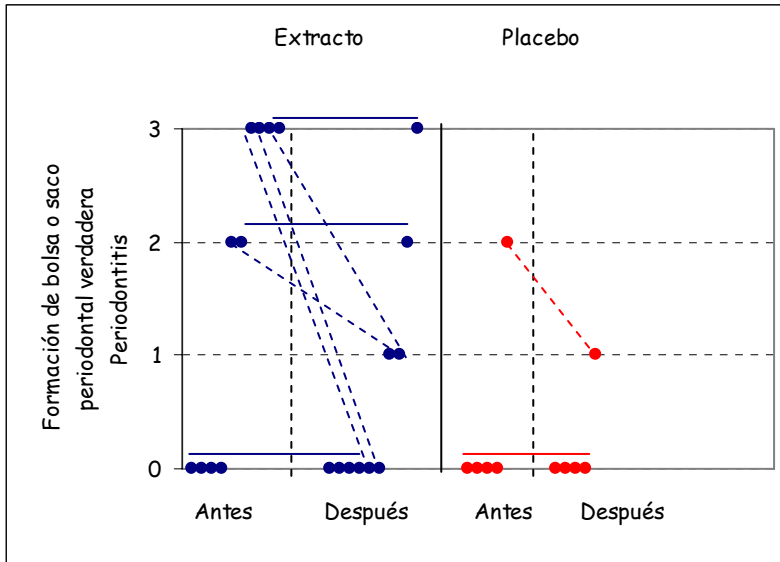


Figura. 44. **Evaluación semicuantitativa de la formación de bolsa o saco periodontal verdadera y promedio de pendientes.** a) Pacientes con gingivitis, antes y después del tratamiento con el enjuague bucal extracto y placebo. Los puntos representan el grado de severidad de la enfermedad. , 0: ausencia, 1: leve, 2: moderado y 3: avanzado. b) Diferencia del promedio de las pendientes negativas.

a)



b)

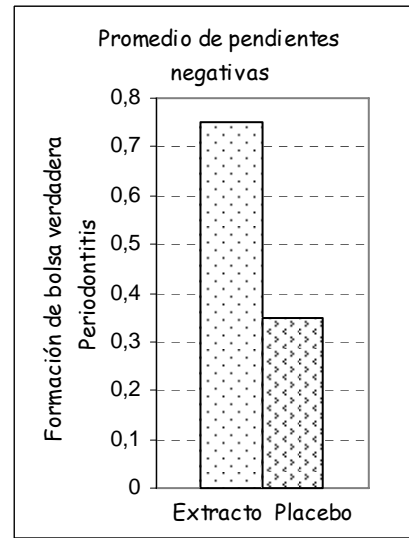


Figura. 45. **Evaluación semicuantitativa de la formación de bolsa o saco periodontal verdadera y promedio de pendientes.** a) Pacientes con periodontitis antes y después del tratamiento con el enjuague bucal extracto y placebo. Los puntos representan el grado de severidad de la enfermedad. , 0: ausencia, 1: leve, 2: moderado y 3: avanzado. b) Diferencia del promedio de las pendientes negativas.

Las Figuras 46 y 47 nos muestra la evolución del sangramiento de los pacientes que realizaron el tratamiento con el enjuague, se observó una disminución de la severidad en la mayoría de los pacientes con gingivitis, también en los que utilizaron enjuague extracto como en los del placebo. Sin embargo en 2 pacientes con enjuague extracto y 1 de 5 que son placebo hubo incremento del sangrado. Los anterior muestra que no hubo efecto del extracto en esos casos de gingivitis. En cambio en la periodontitis en todos los casos que usaron el extracto hubo disminución, no así en lo del placebo en los cuales no hubo disminución del sangrado.

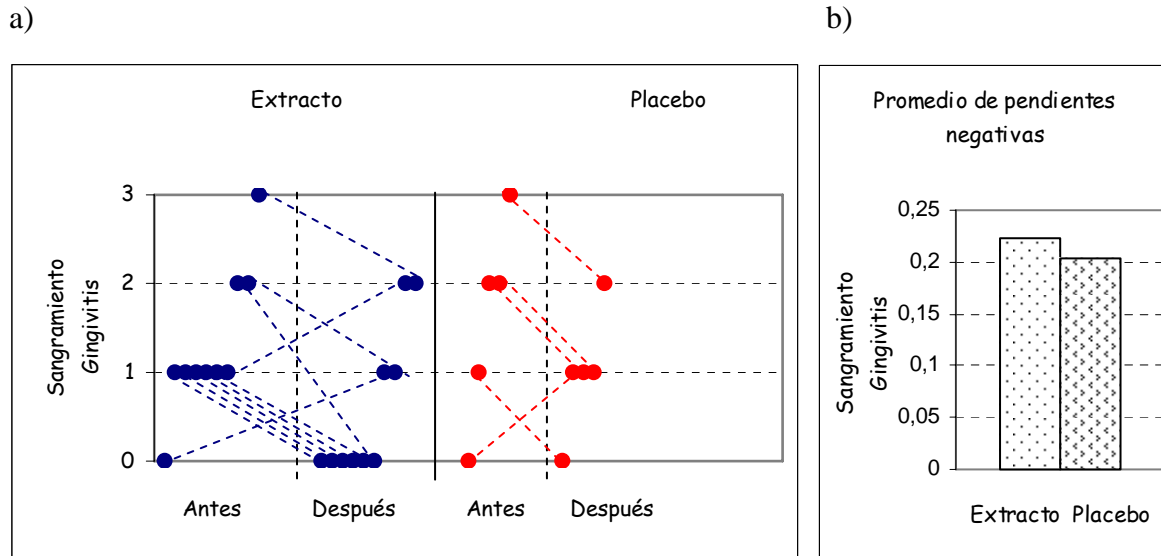


Figura. 46. **Evaluación semicuantitativa del sangramiento y promedio de pendientes.** a) Pacientes con gingivitis, antes y después del tratamiento con el enjuague bucal extracto y placebo. Los puntos representan el grado de severidad de la enfermedad. , 0: ausencia, 1: leve, 2: moderado y 3: avanzado. b) Diferencia del promedio de las pendientes negativas.

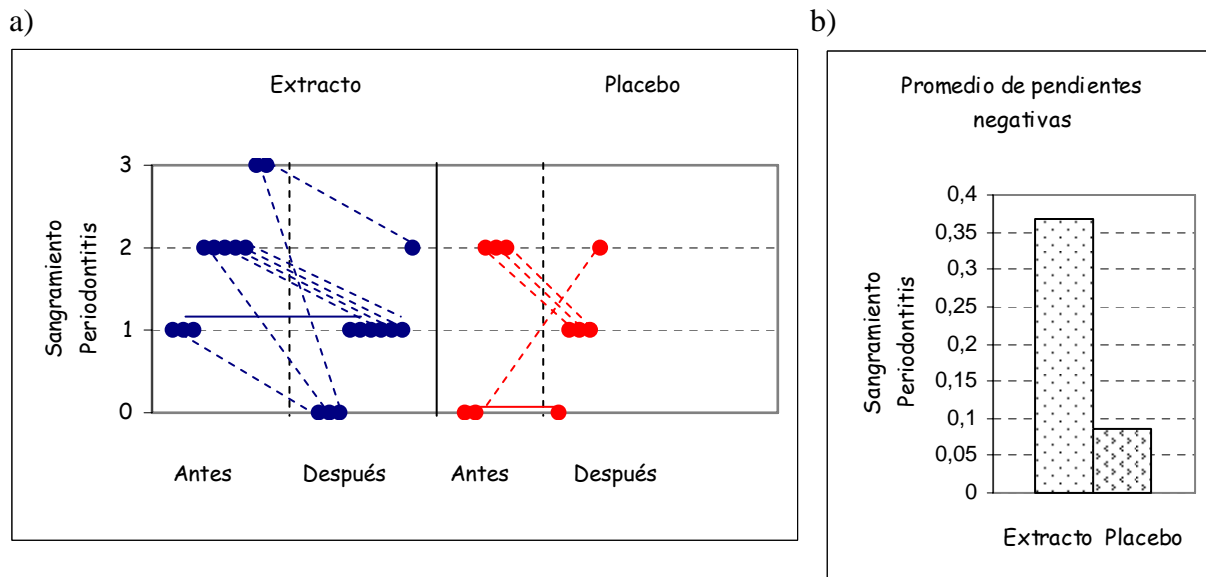
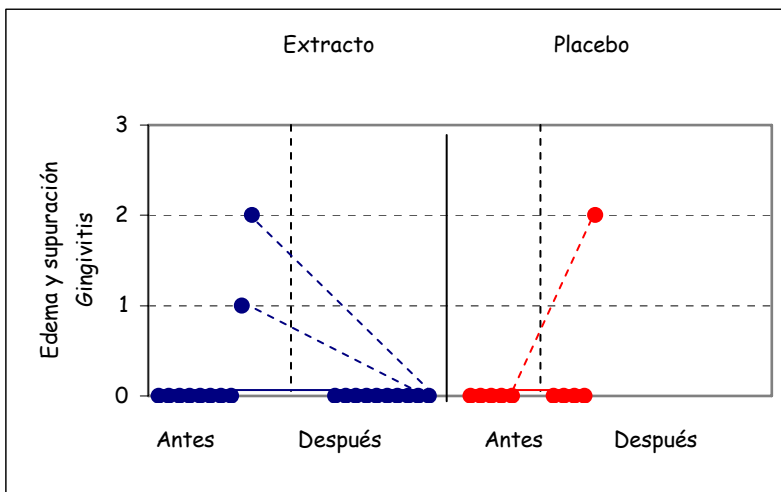


Figura. 47 **Evaluación semicuantitativa del sangramiento y promedio de pendientes.** a) Pacientes con periodontitis antes y después del tratamiento con el enjuague bucal extracto y placebo. Los puntos representan el grado de severidad de la enfermedad. , 0: ausencia, 1: leve, 2: moderado y 3: avanzado. b) Diferencia del promedio de las pendientes negativas.

Las Figuras 48 y 49 nos muestran los valores encontrados de edema y supuración en los pacientes que cursaban gingivitis y periodontitis. En los pacientes con gingivitis que utilizaron el enjuague extracto solo dos tenían edema y supuración, en ambos casos hubo disminución, en cambio en los pacientes que utilizaron enjuague placebo solo un caso existió incremento después del tratamiento esto debido a que persistían algunas bacterias piógenas. En el caso de la periodontitis en todos los casos hubo una disminución en los pacientes que utilizaron extracto.

a)



b)

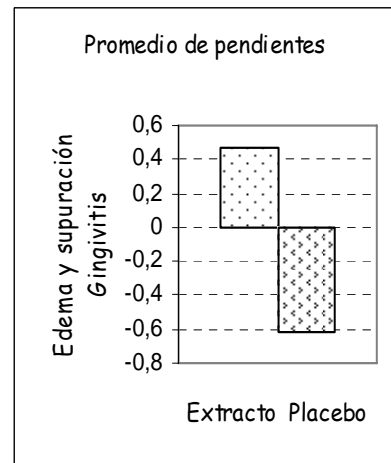
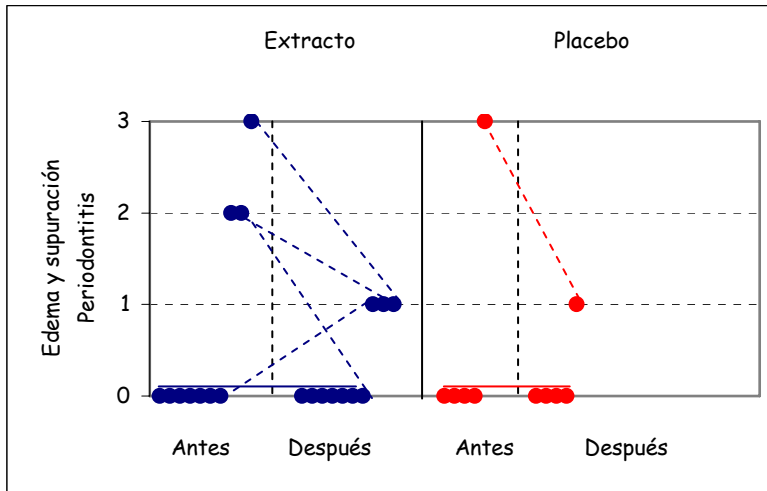


Figura. 48. **Evaluación semicuantitativa de edema y supuración y promedio de pendientes** a) Pacientes con gingivitis, antes y después del tratamiento con el enjuague bucal extracto y placebo. Los puntos representan el grado de severidad de la enfermedad. , 0: ausencia, 1: leve, 2: moderado y 3: avanzado. b) Diferencia del promedio de las pendientes negativas.

a)



b)

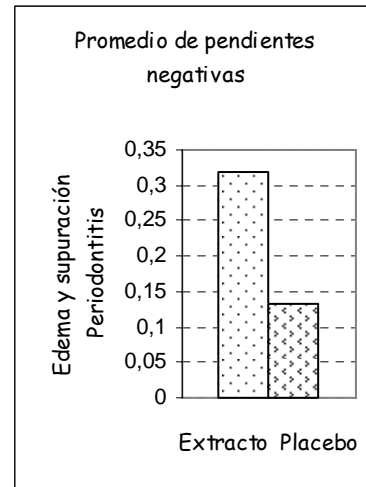
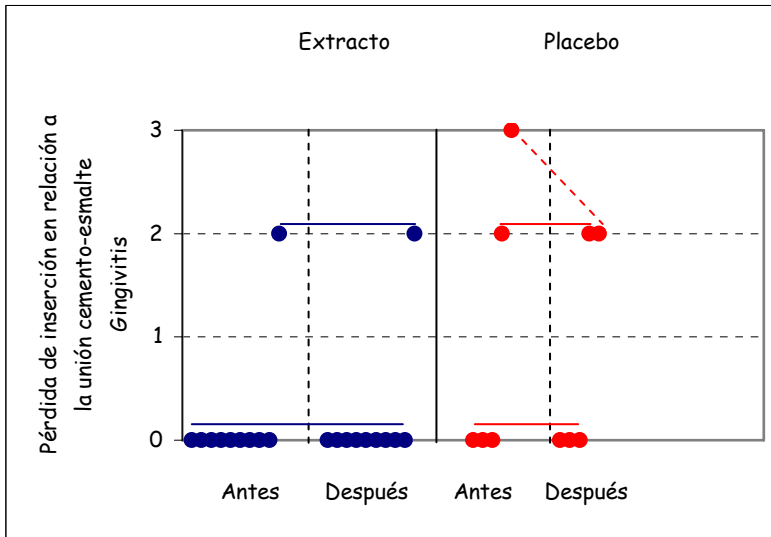


Figura. 49. **Evaluación semicuantitativa de edema y supuración y promedio de pendientes.** Edema y supuración en pacientes con periodontitis antes y después del tratamiento con el enjuague bucal extracto y placebo. Los puntos representan el grado de severidad de la enfermedad. , 0: ausencia, 1: leve, 2: moderado y 3: avanzado. b) Diferencia del promedio de las pendientes negativas.

En el estudio realizado de la pérdida de inserción en relación a la unión cemento esmalte, como se observa en las Figuras 50 y 51 no se encontraron numerosos pacientes que tuvieran este síntoma, viéndose solo en uno del placebo, se noto que disminuyo la severidad. En los pacientes con periodontitis que utilizaron enjuague extracto, a varios casos donde hubo disminución de la severidad a los que utilizaron placebo un caso incremento y otro disminuyo en el promedio de pendientes se encontró que un ligero aumento en los pacientes con periodontitis que utilizaron enjuague extracto y ninguno en el placebo.

a)



b)

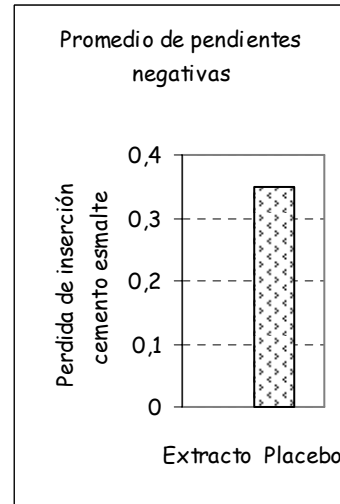
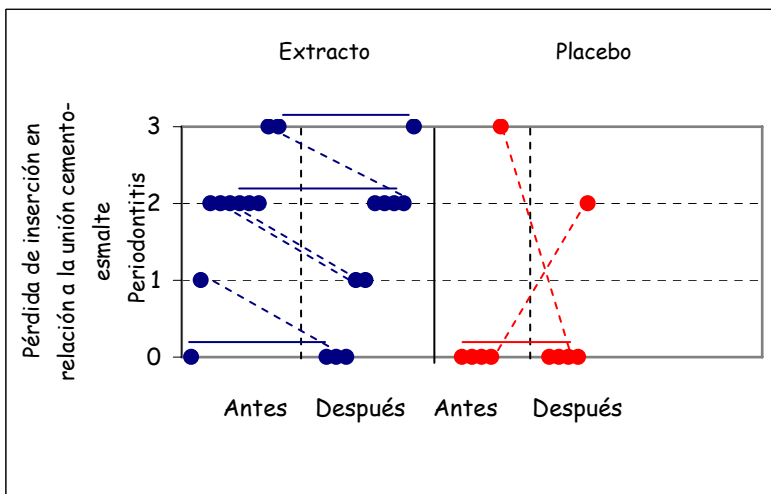


Figura. 50. Evaluación semicuantitativa de la pérdida de inserción a la unión cemento-esmalte y promedio de pendientes. a) Pacientes con periodontitis antes y después del tratamiento con el enjuague bucal extracto y placebo. Los puntos representan el grado de severidad de la enfermedad. , 0: ausencia, 1: leve, 2: moderado y 3: avanzado. b) Diferencia del promedio de las pendientes negativas.

a)



b)

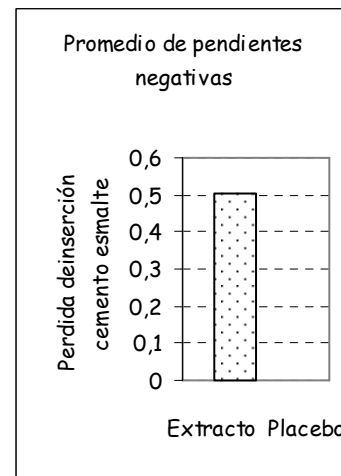
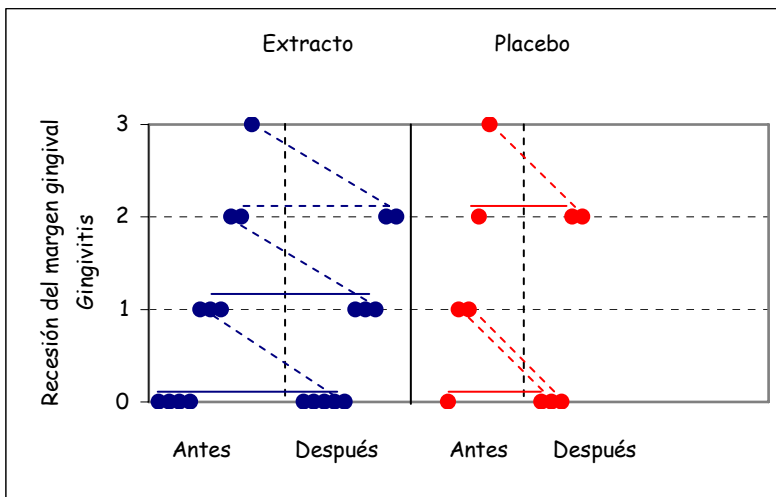


Figura. 51 Evaluación semicuantitativa de la pérdida de inserción en relación a la unión cemento-esmalte y promedio de pendientes. a) Pacientes con periodontitis antes y después del tratamiento con el enjuague bucal extracto y placebo. Los puntos representan el grado de severidad de la enfermedad. , 0: ausencia, 1: leve, 2: moderado y 3: avanzado. b) Diferencia del promedio de las pendientes negativas.

Las figuras 52 y 53 nos muestran los resultados hallados sobre la evaluación de la recesión del margen gingival en ambas enfermedades. Se encontro en los pacientes con gingivitis que utilizaron enjuague extracto, un perfil de disminución similar al de los pacientes que hicieron el tratamiento con enjuague placebo. En los pacientes con periodontitis se encontró disminución distinta en 3 de los 15 casos que usaron el extracto en cambio en los pacientes que usaron placebo solo uno disminuyo otro incremento lo que dio un promedio igual a la del promedio.

a)



b)

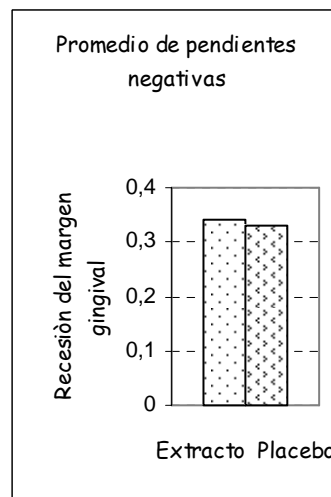


Figura. 52 Evaluación semicuantitativa de la recesión del margen gingival y promedio de pendientes.
a) Pacientes con gingivitis antes y después del tratamiento con el enjuague bucal extracto y placebo. Los puntos representan el grado de severidad de la enfermedad. , 0: ausencia, 1: leve, 2: moderado y 3: avanzado. b) Diferencia del promedio de las pendientes negativas.

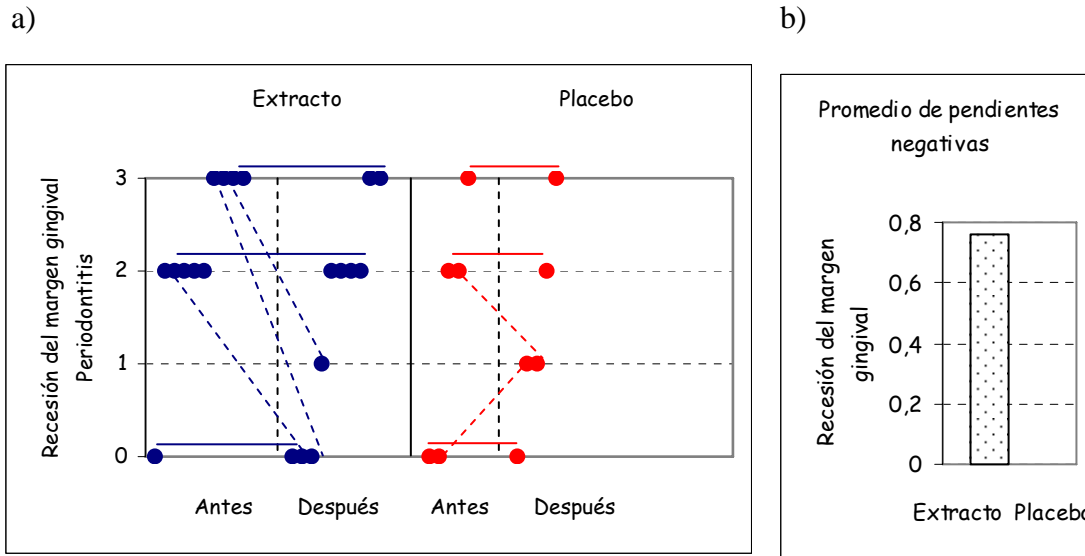


Figura 53 **Evaluación semicuantitativa de la recesión del margen gingival y promedio de pendientes.** a) Pacientes con periodontitis antes y después del tratamiento con el enjuague bucal extracto y placebo. Los puntos representan el grado de severidad de la enfermedad. , 0: ausencia, 1: leve, 2: moderado y 3: avanzado. b) Diferencia del promedio de las pendientes negativas. b) Diferencia del promedio de las pendientes negativas.

En cuanto a la movilidad dentaria encontrada antes y después del tratamiento los resultados encontrados no muestran cambios importantes con la utilización del enjuague extracto, ya que gran parte de los pacientes no refería este signo un paciente que tuvo aumento después del tratamiento con extracto o placebo en como se observa en las figuras 52 y 53 los casos de gingivitis redujeron este signo tanto en los que usaron extracto como placebo, lo que muestra que este es un efecto del curetaje.

a)

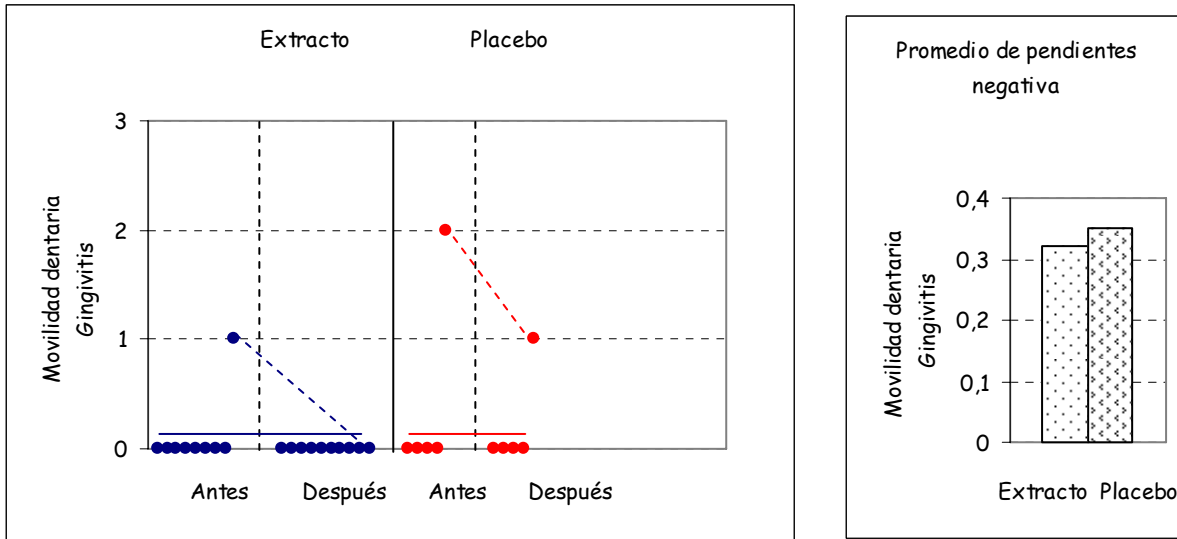
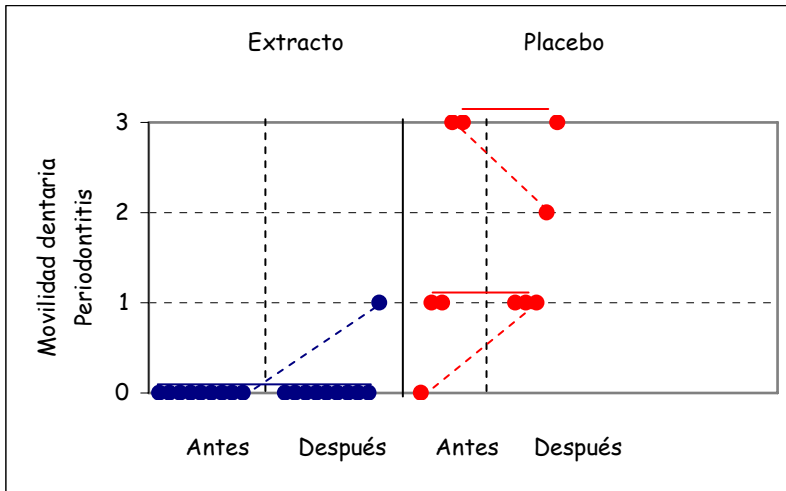


Figura 52 **Evaluación semicuantitativa de la movilidad dentaria y promedio de pendientes.** .a) Pacientes con gingivitis antes y después del tratamiento con el enjuague bucal extracto y placebo. Los puntos representan el grado de severidad de la enfermedad. , 0: ausencia, 1: leve, 2: moderado y 3: avanzado. b) Diferencia del promedio de las pendientes negativas.

a)



b)

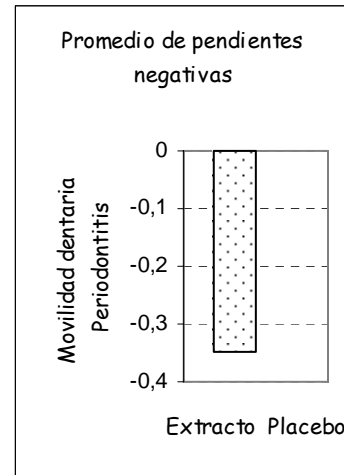
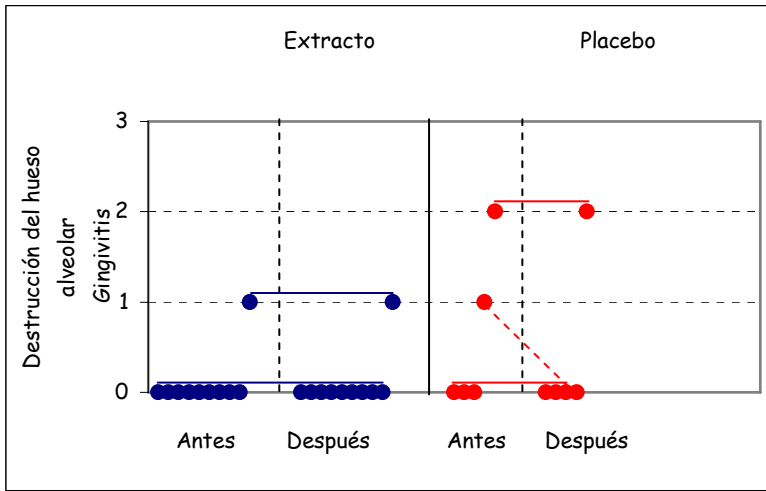


Figura 53. Evaluación semicuantitativa de la movilidad dentaria encontrada y promedio de pendientes.
 a) Pacientes con periodontitis antes y después del tratamiento con el enjuague bucal extracto y placebo. Los puntos representan el grado de severidad de la enfermedad. 0: ausencia, 1: leve, 2: moderado y 3: avanzado. b) Diferencia del promedio de las pendientes negativas.

La Figura 54 y 55 nos muestra que la destrucción del hueso alveolar, en gingivitis no sufrió modificación (la mayor parte de los casos no presento este signo), en los que utilizaron enjuague extracto y se encontró solo un descenso de la severidad en los pacientes que utilizaron enjuague placebo; los promedios de pendientes encontrados en ambas enfermedades solo tuvo una significancia en los pacientes con periodontitis , y no así para los que utilizaron placebo donde solo se encontraron dos casos.

a)



b)

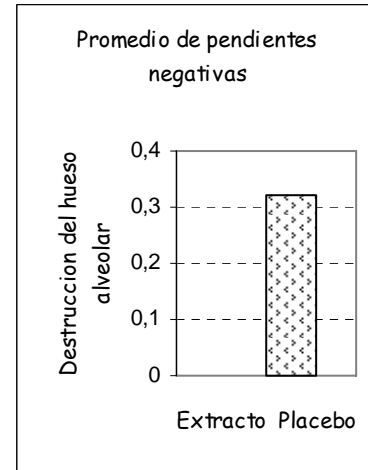
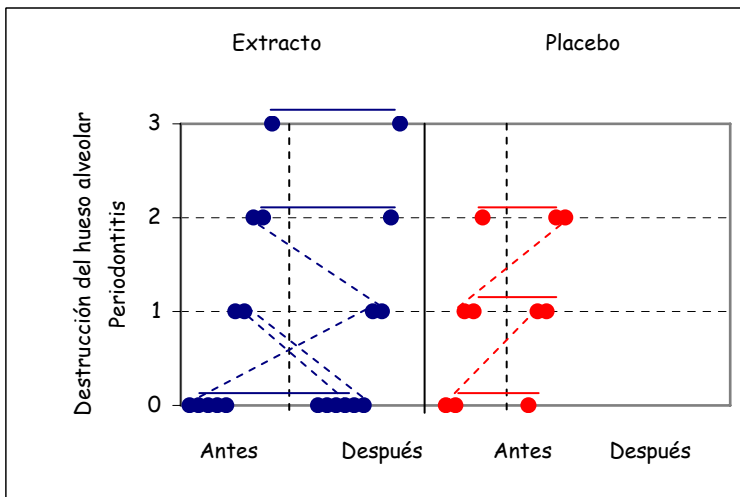


Figura. 54. Evaluación semicuantitativa de la destrucción del hueso alveolar y promedio de pendientes. a) Pacientes con gingivitis antes y después del tratamiento con el enjuague bucal extracto y placebo. Los puntos representan el grado de severidad de la enfermedad. , 0: ausencia, 1: leve, 2: moderado y 3: avanzado. b) Diferencia del promedio de las pendientes negativas.

a)



b)

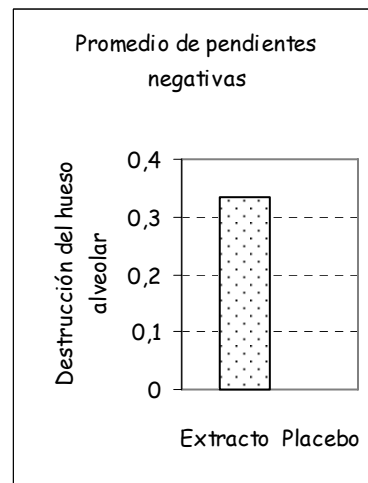
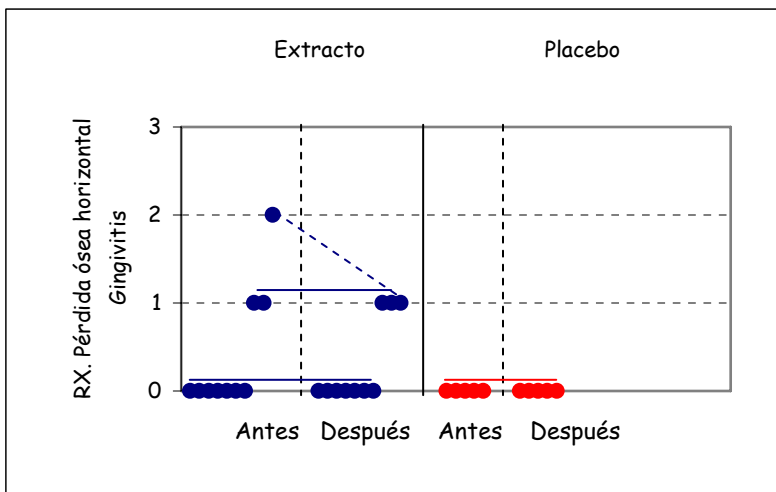


Figura. 55. Evaluación semicuantitativa de la destrucción del hueso alveolar y promedio de pendientes. a) Pacientes con periodontitis antes y después del tratamiento con el enjuague bucal extracto y placebo. Los puntos representan el grado de severidad de la enfermedad. , 0: ausencia, 1: leve, 2: moderado y 3: avanzado. b) Diferencia del promedio de las pendientes negativas.

En la evaluación radiográfica de la pérdida ósea horizontal en los pacientes tanto con gingivitis y periodontitis se encontró un descenso en el único paciente que tenía este signo y que utilizó el enjuague extracto. Al no existir pacientes con este signo entre los que usaron placebo no existieron parámetros de comparación. En cuanto a los pacientes con periodontitis, 3 de los 4 pacientes que presentaron este signo y que recibieron el extracto, tenían disminución. Entre los que recibieron placebo 3 de 5 disminuyeron y uno incremento levemente, no mostrando una diferencia importante.

a)



b)

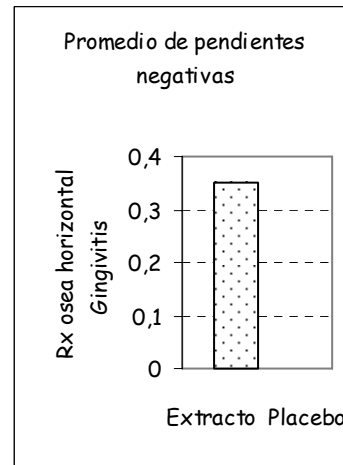


Figura.56. Evaluación semicuantitativa radiográfica de la pérdida ósea horizontal y promedio de pendientes. a) Pacientes con gingivitis antes y después del tratamiento con el enjuague bucal extracto y placebo. Los puntos representan el grado de severidad de la enfermedad. , 0: ausencia, 1: leve, 2: moderado y 3: avanzado. b) Diferencia del promedio de las pendientes negativas.

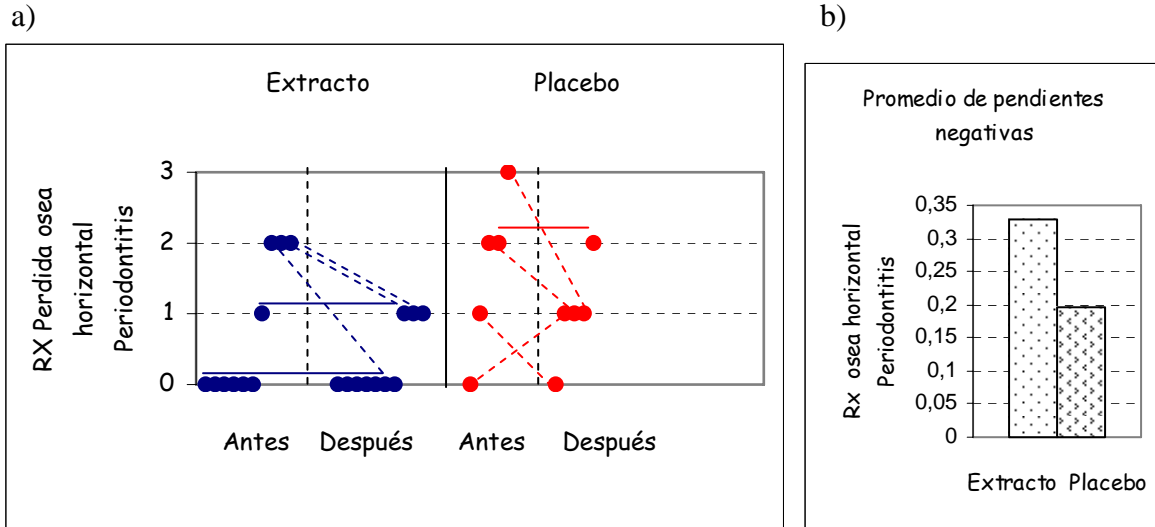


Figura. 57. Evaluación semicuantitativa radiográfica de la pérdida ósea horizontal y promedio de pendientes. a) Pacientes con periodontitis antes y después del tratamiento con el enjuague bucal extracto y placebo. Los puntos representan el grado de severidad de la enfermedad. , 0: ausencia, 1: leve, 2: moderado y 3: avanzado. b) Diferencia del promedio de las pendientes negativas.

En la evaluación radiográfica de la pérdida ósea vertical, no se encontraron a pacientes con gingivitis que reportaran esta pérdida figura 58 tan solo se observó un descenso importante de la severidad en los pacientes con periodontitis que utilizaron el enjuague extracto como se observa la figura 59 que se observó nítidamente comprobando teniendo en el promedio de pendientes .

a)

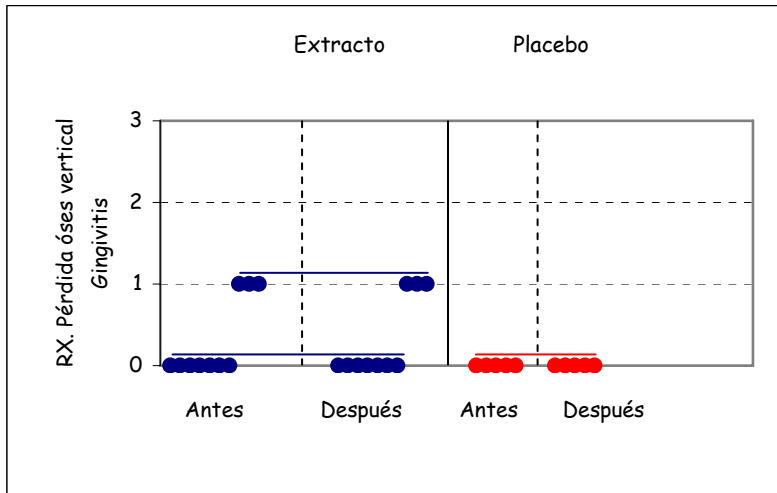


Figura. 58. **Evaluación semicuantitativa radiográfica de la pérdida ósea vertical.** a) Pacientes con gingivitis antes y después del tratamiento con el enjuague bucal extracto y placebo. Los puntos representan el grado de severidad de la enfermedad. 0: ausencia, 1: leve, 2: moderado y 3: avanzado.

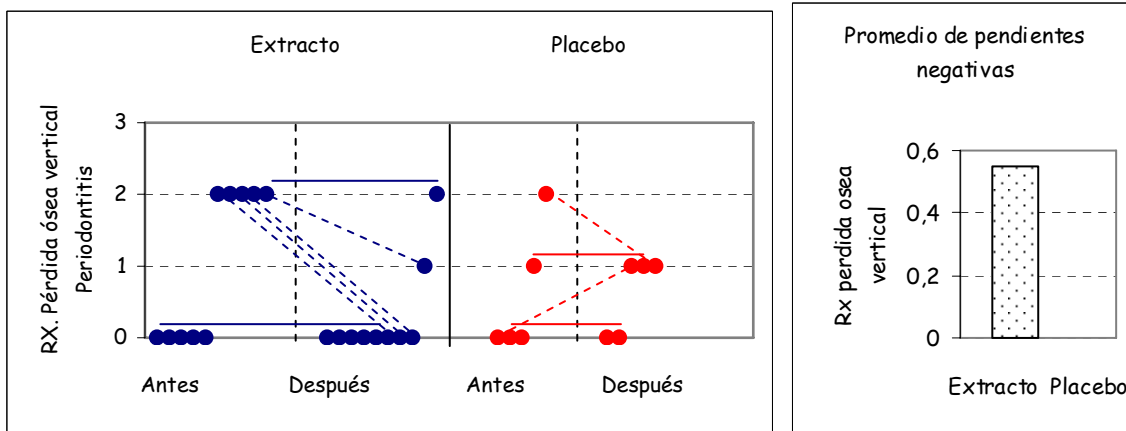
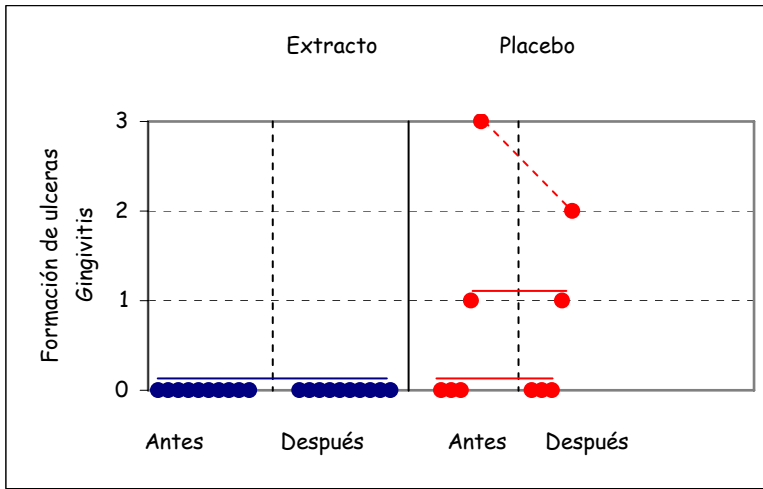


Figura. 59. **Evaluación semicuantitativa radiográfica de la pérdida ósea vertical y promedio de pendientes.** a) Pacientes con periodontitis antes y después del tratamiento con el enjuague bucal extracto y placebo. Los puntos representan el grado de severidad de la enfermedad. 0: ausencia, 1: leve, 2: moderado y 3: avanzado. b) Diferencia del promedio de las pendientes negativas.

Las figuras 60 y 61 nos muestra la evaluación de la formación de úlceras en pacientes tanto con gingivitis como en periodontitis, al realizar el estudio se encontró que los pacientes que utilizaron como tratamiento el enjuague extracto no presentaban formación de úlceras, en cambio los pacientes tratados con el enjuague placebo que presentaron úlceras solo uno hizo un leve descenso la severidad de la úlcera. Por no haber pacientes de comparación no se dio una significancia a este estudio.

a)



b)

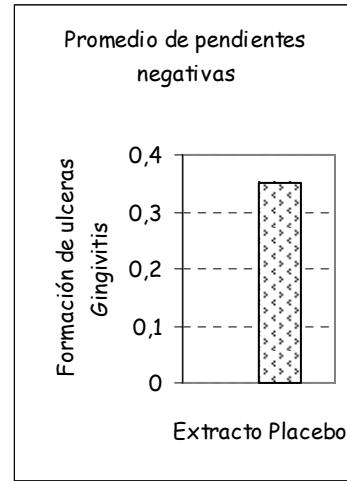
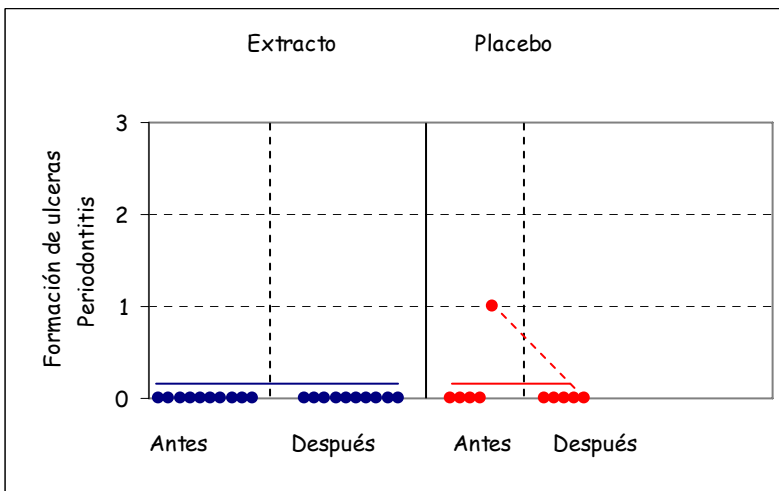


Figura.61. Evaluación semicuantitativa de la formación de úlceras y promedio de pendientes .
a) Pacientes con gingivitis antes y después del tratamiento con el enjuague bucal extracto y placebo. Los puntos representan el grado de severidad de la enfermedad, 0: ausencia, 1: leve, 2: moderado y 3: avanzado.
b) Diferencia del promedio de las pendientes negativas.

a)



b)

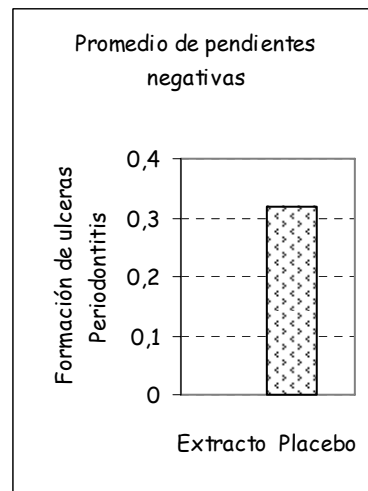
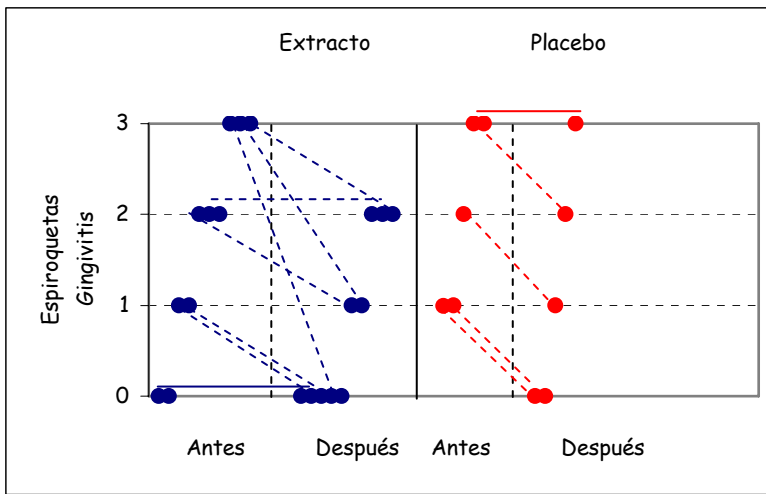


Figura. 62. Evaluación semicuantitativa de la formación de úlceras y promedio de pendientes. a) Pacientes con periodontitis antes y después del tratamiento con el enjuague bucal extracto y placebo. Los puntos representan el grado de severidad de la enfermedad. , 0: ausencia, 1: leve, 2: moderado y 3: avanzado. b) Diferencia del promedio de las pendientes negativas.

Las Figuras. 63 y 64 muestran la evaluación microbiológica en fresco y en cultivo, realizada de las muestras tomadas del surco gingival realizada por tinción Gram. y campo oscuro, que revelan que el enjuague extracto tanto en gingivitis y periodontitis tuvieron un descenso importante en la presencia de espiroquetas en el surco gingival, confirmado en la comparación del promedio de pendientes cuya diferencia fue mayor en los casos de gingivitis (Figura 63).

a)



b)

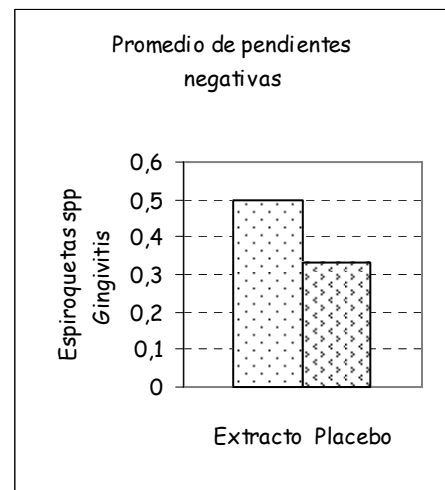
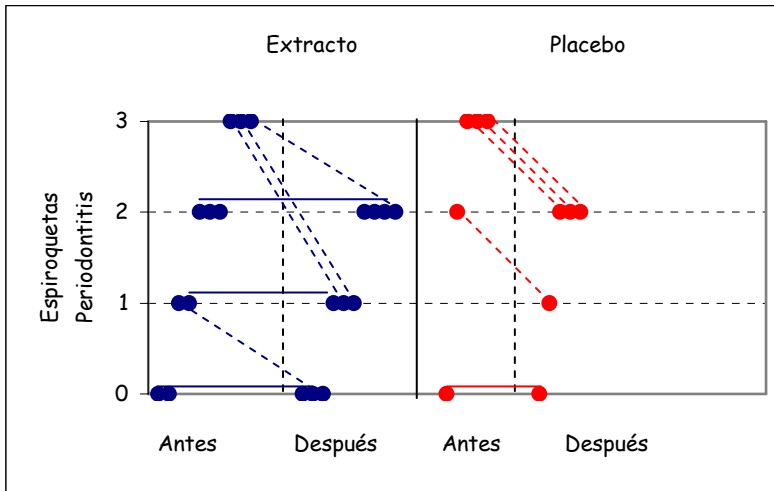


Figura 63. Evaluación microbiológica semicuantitativa de Espiroquetas spp. en surco gingival y promedio de pendientes. a) Promedio de placas evaluadas de muestras del surco gingival en fresco y cultivo evaluadas por los métodos de campo oscuro y tinción Gram en pacientes con gingivitis antes y después del tratamiento con el enjuague bucal extracto y placebo. Los puntos representan el grado de severidad de la enfermedad. , 0: ausencia, 1: leve, 2: moderado y 3: avanzado. b) Diferencia del promedio de las pendientes negativas.

a)



b)

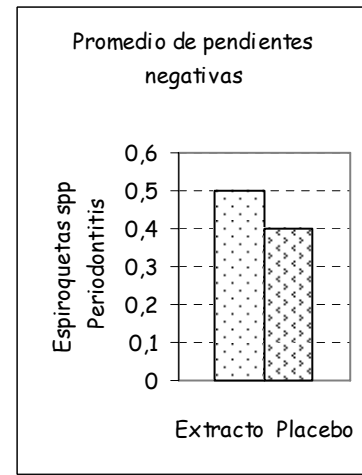


Figura. 64. **Evaluación microbiológica semicuantitativa de Espiroquetas spp. en surco gingival y promedio de pendientes.** a) Promedio de placas evaluadas de muestras del surco gingival en fresco y cultivo evaluadas por los métodos de campo oscuro y tinción Gram. en pacientes con periodontitis antes y después del tratamiento con el enjuague bucal extracto y placebo. Los puntos representan el grado de severidad de la enfermedad. , 0: ausencia, 1: leve, 2: moderado y 3: avanzado. b) Diferencia del promedio de las pendientes negativas.

Las Figuras 65 y 66 muestran la evaluación microbiológica realizada de las muestras tomadas del surco gingival en fresco y en cultivo realizadas por tinción Gram. , que revelan que con el enjuague extracto tanto los pacientes con gingivitis como los de periodontitis tuvieron un descenso importante en la presencia de Fusobacterias spp. en el surco gingival, confirmado con la comparación de promedios de pendientes.

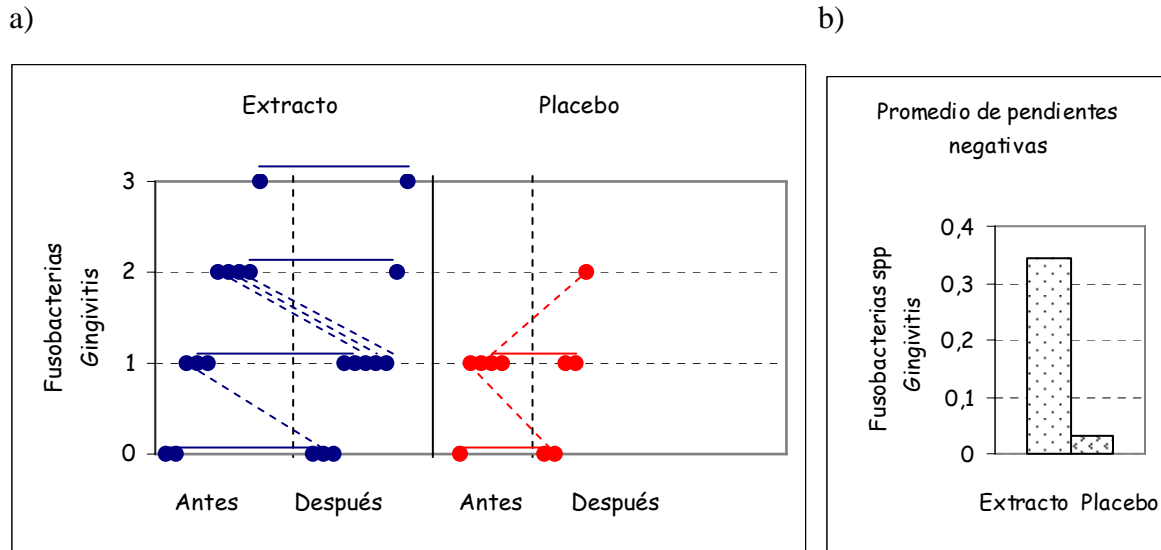


Figura. 65. Evaluación microbiológica semicuantitativa de Fusobacterias spp. en surco gingival y promedio de pendientes. a) Promedio de placas evaluadas de muestras del surco gingival en fresco y cultivo evaluadas por los métodos de campo oscuro y tinción Gram. en pacientes con gingivitis antes y después del tratamiento con el enjuague bucal extracto y placebo. Los puntos representan el grado de severidad de la enfermedad. , 0: ausencia, 1: leve, 2: moderado y 3: avanzado. b) Diferencia del promedio de las pendientes negativas.

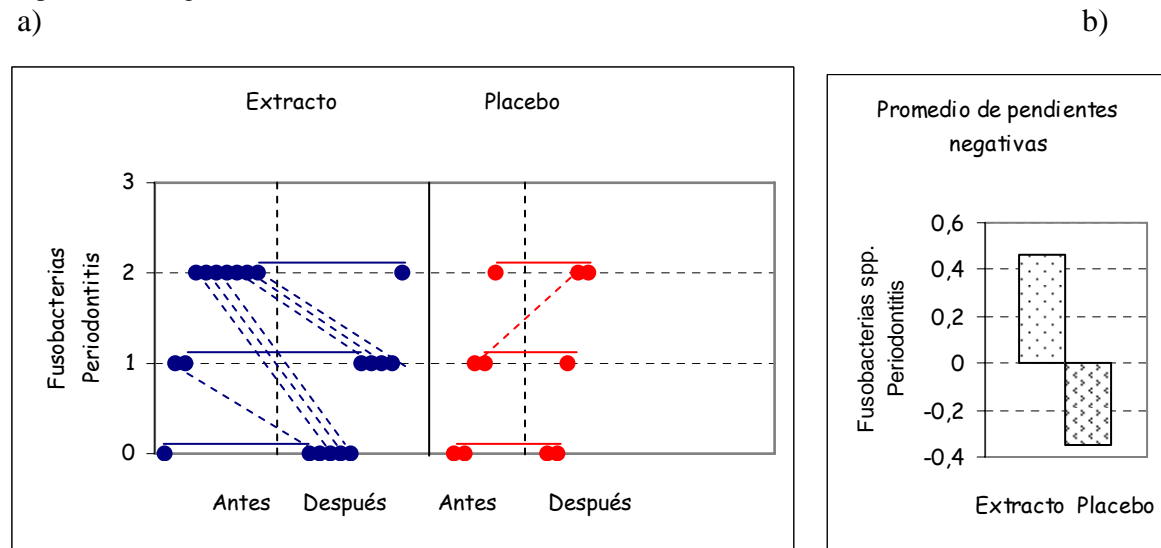
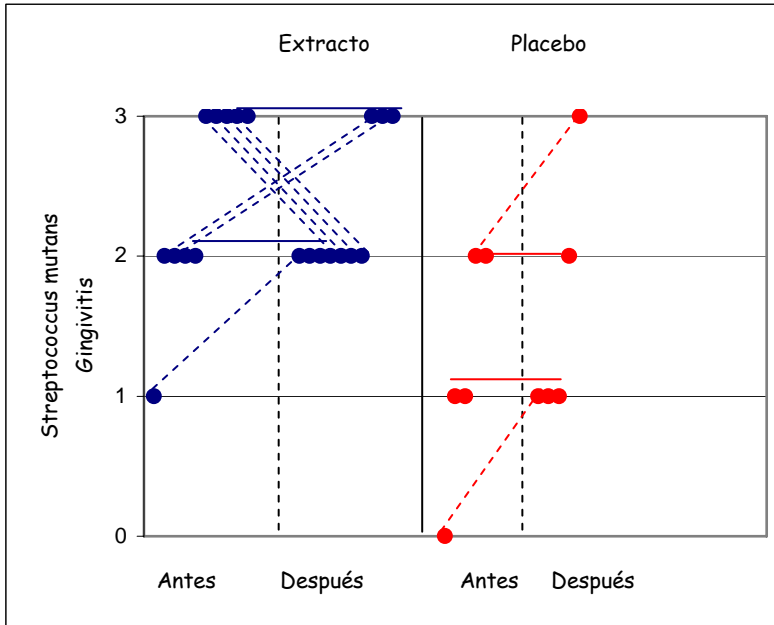


Figura. 66. Evaluación microbiológica semicuantitativa de Fusobacterias spp. en surco gingival y promedio de pendientes. a) Promedio de placas evaluadas de muestras del surco gingival en fresco y cultivo evaluadas por los métodos de campo oscuro y tinción Gram. en pacientes periodontitis antes y después del tratamiento con el enjuague bucal extracto y placebo. Los puntos representan el grado de severidad de la enfermedad. , 0: ausencia, 1: leve, 2: moderado y 3: avanzado. b) Diferencia del promedio de las pendientes negativas.

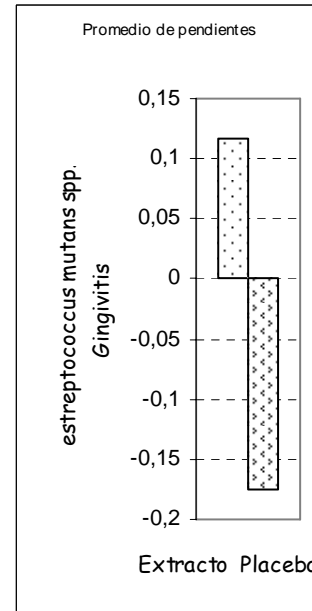
Las figuras 67 y 68 muestran la evaluación microbiológica realizada de las muestras tomadas del surco gingival en fresco y en cultivo realizadas por tinción Gram. , que revelan

que el enjuague extracto en gingivitis en 4 de 10 pacientes, 3 incrementaron su presencia. Con el placebo ninguno disminuyó y dos aumentaron. En los pacientes con periodontitis en todos los casos disminuyeron de manera ostensible comparado al placebo

a)



b)



Figuras. 67. Evaluación microbiológica semicuantitativa de Streptococcus mutans spp. en surco gingival y promedio de pendientes. a) Promedio de placas evaluadas de muestras del surco gingival en fresco y cultivo evaluadas por los métodos de campo oscuro y tinción Gram. en pacientes con gingivitis antes y después del tratamiento con el enjuague bucal extracto y placebo. Los puntos representan el grado de severidad de la enfermedad. , 0: ausencia, 1: leve, 2: moderado y 3: avanzado. b) Diferencia del promedio de las pendientes negativas.

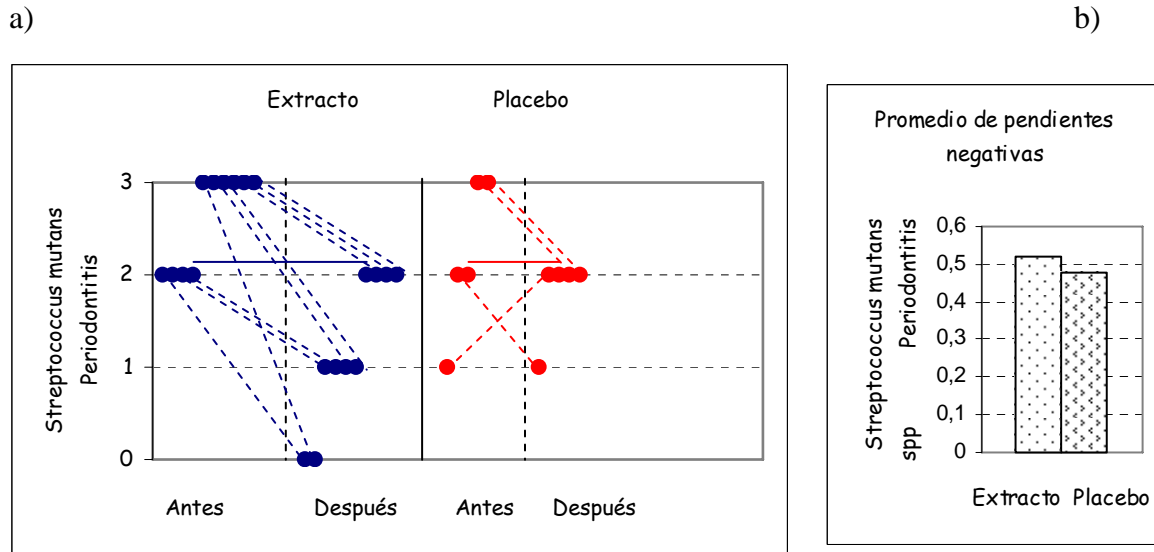


Figura. 68. Evaluación microbiológica semicuantitativa de *Streptococcus mutans* spp. en surco gingival y promedio de pendientes. a) Promedio de placas evaluadas de muestras del surco gingival en fresco y cultivo evaluadas por los métodos de campo oscuro y tinción Gram. en pacientes con periodontitis, antes y después del tratamiento con el enjuague bucal extracto y placebo. Los puntos representan el grado de severidad de la enfermedad. , 0: ausencia, 1: leve, 2: moderado y 3: avanzado. b) Diferencia del promedio de las pendientes negativas.

IX. Discusión

El uso de plantas medicinales para el manejo y prevención de patologías orales se está acentuando en épocas recientes; un porcentaje cada vez más importante de las pastas dentales y enjuagues bucales incorpora en su composición plantas con efecto medicinal. Esto demuestra que existe predisposición en el mundo odontológico para combatir las enfermedades orales con el uso de productos naturales.

Varios materiales que se usan en odontología son derivados de productos naturales. Así, el Eugenol que se usa en el tratamiento de conductos, proviene del clavo de olor (droga conocida con el nombre de Clavo de especia proveniente de plantas de la familia mirtáceas), la Gutapercha (pasta para tratamiento de conductos) proviene del Palaquium (ebano), árbol que crece en la India. El Alginato para impresiones dentales en prótesis es polímero natural de algas marinas.

La herbolaria local usa también estos productos que van dirigidos a tratamientos y procesos de enfermedades orales. En este caso se reporta, el antecedente del uso de la Akhana que es componente de la flora medicamentosa nativa del norte de Potosí de nuestro país. Se usa infusiones de la planta para dolencias de la encía, con resultados benéficos según reportes testimoniales de los pobladores de la región, no teniendo toxicidad aparente. Estos alcances se vincularon con los hallazgos realizados en nuestro laboratorio, donde este producto natural ha sido motivo de varios estudios, se evidenció los componentes fitoquímicos, como flavonoides, taninos. También se realizó estudios preliminares de cultivo *in vitro*, *in vivo* donde se demostraron su efecto bactericida contra algunas bacterias de la cavidad oral^(9,10). Aunque los antecedentes de uso tradicional y consumo humano sugieren que *Aphyllocladus spartioides weddell* no posee actividad tóxica evidenciable; es importante verificar este hecho en laboratorio, por lo cual nos motivó a implementar un modelo de estudio pre-clínico de citotoxicidad *in vitro*, toxicidad local *in vivo* y un modelo de investigación clínica y microbiológica.

Como primer paso se evaluó la actividad tóxica de este producto natural en diferentes sistemas de cultivo celular. Para esto se utilizaron líneas continuas establecidas en células (BHK-21) y de cultivo primario (esplenocitos murinos y linfocitos humanos), siguiendo la técnica ya establecida de optimización de cultivos celular antes, durante y después del cultivo.

En un primer paso se establecieron características celulares por microscopía para establecer los parámetros citológicos de las células BHK-21. Una vez establecidas estas características se expuso a las células al tratamiento a diferentes tiempos de exposición y concentraciones del extracto, para la determinación de un tiempo óptimo, en el que las células tengan una adecuada adaptación al cultivo *in vitro*, y su viabilidad sea óptima; el tiempo en el cual las células tenían un buen porcentaje de viabilidad fue a las 48 horas, por lo cual a partir de este hallazgo se trabajó con ese tiempo de exposición.

En la evaluación de la toxicidad de *Aphyllocladus espartioides weddell* en cultivo de líneas continuas con células BHK-21 (figura 3) por el método de Azul Tripan, se

evidencio un efecto toxico solo a concentraciones mayores a 0.2 mg/mL , al realizar el siguiente ensayo con diluciones intermedias 3x , se encontró inocuidad entre estas dos diluciones 0.06-0.02 mg/mL, Los hallazgos se constituyeron la base para encontrar la CC50 de 0.1336mg/mL, dosis a la cual no presentaría ningún daño las células.

En el ensayo del 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio (MTT) que refleja la actividad de varias enzimas deshidrogenasas dependientes del NADH, la sal de MTT es reducida por la enzimas mitocondriales de las células viables y metabolicamente activas a cristales de Formazan, producto que al ser solubilizado puede ser cuantificado espectrofotometricamente.El valor nos muestra la proporcionalidad de las células viables presentes en el cultivo. ^(45,18, 22, 35, 37, 62) Al realizar el ensayo con la línea BHK-21 y las diferentes concentraciones del extracto se encontró una proporcionalidad del numero de células presentes en el cultivo Figura.4 mostrando un descenso en la viabilidad solo las concentraciones mayores de 2 mg/mL a 0.2 mg./mL y un aumento en la viabilidad en las concentraciones de 0.06mg/mL, 0.02mg/mL, esto puede deberse a que los componentes del extracto no alteraron a las células biológicamente activas y que pueden tener ejercer un efecto sobre las enzimas deshidrogenasas dependientes de NADH ya que la sal de tetrazolio es reducida por las enzimas mitocondriales, dando en el ensayo un porcentaje incrementado de la viabilidad , guardando relación con el perfil de toxicidad , esto por los métodos realizados.

En los ensayos de citotoxicidad de *Aphyllocladus spartioides weddell* en cultivos primarios de esplenocitos murinos de ratón y linfocitos humanos , los ensayos reportaron inocuidad del producto en concentraciones bajas de 0.06 -0.02mg/mL y una citotoxicidad marcada en la concentraciones mayores de 2 mg/mL, notándose una visible disminución gradual de la viabilidad celular , demostrando que *Aphyllocladus spartioides weddell* no es toxica para las células y que el decremento de la viabilidad es debido al proceso normal de afectación de las células de cultivo primario , por ser un sistema mas sensible , a todo tipo de agentes extraños o en este caso a la utilización del extracto utilizado. Los resultados de ambos ensayos nos dio una base para el calculo de el CC50 obteniendo los valores de

0.1401mg/mL y 0.1121mg/mL que mostraron una similitud con el valor encontrado de la CC50 con la línea BHK-21 como se observan en las figuras 4 y 5

Con los resultados obtenidos del estudio de la citotoxicidad *in vitro* realizada con el extracto en cultivos continuos y primarios se procedió a realizar el estudio de toxicidad local *in vivo* evaluando la toxicidad subaguda de 45 días en los animales de experimentación utilizando el gel con el extracto a la concentración promedio, de las concentraciones citotóxicas medias (CC50) de los cultivos continuos y primarios, teniendo una concentración de 0,1228mg/mL, el gel placebo sin extracto. Al animal control no se le aplicó ningún gel. Estos tres grupos experimentales nos sirvieron para realizar una evaluación comparativa del posible efecto del producto natural y del propio gel sobre la mucosa oral.

En principio se pudo observar que los animales no sufrieron cambios en el comportamiento ni en la apariencia, ni en la ingestión alimenticia líquida/sólida; su crecimiento fue normal, el aumento de su peso fue adecuado a su crecimiento, no habiendo cambios considerables en los tres grupos de experimentación.

Los linfocitos que son leucocitos mononucleares no granulados, que presentan un núcleo teñido intensamente de azul pálido, son un producto del tejido linfoide y tienen un papel importante en la inmunidad, como defensa del organismo. El estudio de los cortes de la mucosa lateral y anterior de la lámina propia mostraron un ligero aumento en el promedio tanto en el gel extracto y placebo, y no así en el control negativo, este ligero incremento puede ser debido a la reacción de la mucosa frente al extracto, este aumento no es significativo, permite considerar que el extracto da un leve daño en la mucosa.

La fibrosis es la formación de tejido conjuntivo alveolar laxo, aumentada por una estimulación de fibroblastos que producen un incremento de fibras colágenas en el corium. En la evaluación realizada, solo se encontró un aumento considerable en el número de muestras, cuando se administró el gel con extracto, este aumento es debido a la acción del mismo extracto.

La evaluación de los vasos congestivos en el corium nos permite observar si los vasos que son conductos de pequeño diámetro que transportan nutrientes, sangre o algún líquido, están interferidos en su función; en algunos casos el flujo sanguíneo se torna lento, produciendo una éxtasis sanguínea a reacción de esto se presenta una mayor dilatación de los vasos y capilares sanguíneos; esto generalmente ocurre en procesos inflamatorios, que se explica la presencia de vasos congestivos en los animales que recibieron gel extracto y placebo, como efecto de la acción mecánica de aplicación de los geles.

La hiperplasia que es un aumento en el número de células normales, (con una disposición normal que genera un aumento de volumen), se vio disminuida tanto en el gel extracto como en el gel placebo, posiblemente a que ambos geles preparados en su composición tenían gel de aloe vera y que por sus conocidas propiedades antiinflamatorias^(59,67,113,120,) produjo esta disminución en relación al control negativo que presentó una considerable hiperplasia que podría considerarse como propia de la mucosa oral. En cuanto a la hiperplasia pseudoepiteliomatosa, este espesor aumentado a expensas del estrato intermedio solo se dio con el gel extracto, lo que permite proponer que este producto provoca un estímulo en la reepitelización a nivel del estrato intermedio.

Las proyecciones verrucosas y papilares encontradas como resultado de la irritación a expensas de la dermis, se explican por la acción mecánica de aplicación de los geles sobre en la mucosa. La queratinización, donde las células superficiales acumulan queratina en su citoplasma, no tuvo mayor relevancia considerándose como normal en una mucosa oral al realizar las comparaciones entre el gel extracto, gel placebo y control negativo.

Los eosinófilos que son leucocitos granulados con núcleos conectados por filamentos delgados de cromatina, con gránulos toscos redondeados uniformes que generalmente se ven aumentados en un proceso alérgico o parasitario, no se encontraron modificados, excluyendo la posibilidad de que el extracto pudiera causar algún proceso alérgico.

La mitosis que es la división indirecta de una célula en la que los dos núcleos hijos reciben normalmente complementos idénticos, con características idénticas de la especie. En la evaluación se observó un incremento considerable en el promedio en los animales que recibieron del gel extracto; esto podría deberse a que este gel extracto estimula a la reepitelización de las capas de la mucosa y se ve aumentados los campos de mitosis.

El estudio de las diferentes capas de la mucosa nos sirvió para observar si alguna de las capas de la mucosa podría estar disminuida o afectada por los geles utilizados. Al realizar la evaluación de la mucosa papilar, espesor total y mucosa estrato superficial no se observó un incremento considerable tanto en los animales que utilizaron gel extracto como en el control.

Lo contrario ocurre en el número de capas encontradas en el estrato intermedio de la mucosa papilar y estrato intermedio de la encía; ya que en ambos casos hubo un marcado aumento en el número de capas, confirmando así que el gel extracto actuó al nivel de esos estratos, comparados con el gel placebo y control negativo que no presentaron un aumento considerable.

Una vez evaluados los resultados de cito toxicidad *in vitro* y toxicidad local *in vivo* se decidió realizar el estudio clínico, pero utilizando enjuague bucal ante la posibilidad de que el gel produzca reacciones congestivas (asociadas al efecto mecánico), considerando también que estas enfermedades presentan microulceraciones en las encías que sangran fácilmente al tener un contacto directo.

Considerando lo anterior se realizó el estudio clínico, se caracterizó cuidadosamente las enfermedades periodontales, en pacientes con gingivitis y periodontitis, por cuestiones de orden procedimental, se elaboró un consentimiento informado (ver anexo) los sujetos dieron aceptación escrita, expresa y consciente para la utilización del enjuague después de haber sido informados.

En principio se evaluaron los signos clínicos gingivoperiodontales de ambos grupos, antes de la utilización del enjuague extracto(*Retamox* al 0.03g/100mL) evaluando el cambio de color , sabiendo que el color normal de las encías es de un color rosa coral pálido , un enrojecimiento u oscurecimiento , suele indicar inflamación y por tanto enfermedad. Realizada las evaluaciones clínicas antes y después de la utilización del enjuague extracto y enjuague placebo en los pacientes con gingivitis y periodontitis y obtenida la diferencia de promedio de pendientes se encontró una importante disminución del cambio de color en ambas enfermedades en los pacientes que utilizaron enjuague extracto. Esto nos indica una mayor recuperación del color normal de la encía.

La textura normal superficial de la encía es graneada, “parecida a la cáscara de naranja “; esta se altera por la infección teniendo una textura lisa a áspera debido al aumento de placa bacteriana ; en varios de los pacientes se observo una textura lisa antes del tratamiento . En la evaluación posterior al tratamiento en ambas enfermedades se encontró una mayor variabilidad de la textura en los pacientes que utilizaron enjuague extracto, dando indicios de un descenso en la infección. El aumento de volumen se debe al edema producido por la acumulación de fluidos en los tejidos como resultado de una permeabilidad vascular aumentada, se encontró mayor numero de variabilidad en pacientes con gingivitis que utilizaron el extracto, con respecto a los pacientes con periodontitis .Vale aclarar que este aumento de volumen es mas frecuente en pacientes con gingivitis, lo cual nos indica un efecto del enjuague extracto ante este síntoma.

La evaluación del agrandamiento gingival y recesion del margen gingival permite evaluar si el margen de la encía (que en una situación de salud debe estar al nivel del cuello del diente), ante situaciones persistentes de enfermedad, la encía aumenta o disminución su tamaño respecto al cuello del diente. En los resultados obtenidos se encontró una disminución ostensible en ambos casos de enfermedad, dando a entender que el enjuague extracto , tubo efecto importante en la disminución de estos signos.

El bisel, que es la ubicación normal de las piezas dentarias con relación a la encia, se ve alterado en la enfermedad periodontal a lo que denominan “perdida de bisel “, esto se

presenta con mayor frecuencia en los casos de periodontitis. El resultado obtenido en los pacientes con periodontitis que utilizaron enjuague extracto muestra disminución ligera en la pérdida de bisel.

-El dolor que solo está presente en casos de periodontitis avanzada, abscesos periodontales y en las gingivitis y periodontitis ulceros- necrosantes (muy dolorosa por la exposición del tejido conectivo, debido a la erosión del epitelio), porque la mayoría de las enfermedades periodontales son relativamente indoloras, en este caso no hubo cambios considerables después del tratamiento.

La acumulación de placa bacteriana, es la película blanquecina adherente, que recubre la encía y piezas dentarias, generalmente esta compuesta se microorganismos y sus productos bacterianos, sales, proteínas, células epiteliales descamadas, leucocitos. El calculo o sarro cuyo factor etiológico no esta claro , y que simplemente se considera como placa bacteriana calcifica, su localización es en el tercio gingival de los dientes y sobre grietas, rugosidades . Al realizar el tratamiento con el producto natural se observo una disminución significativa con respecto a los tratados con enjuague placebo, lo mismo ocurrió con la acumulación de calculo subgingival que se ubica generalmente en el surco gingival y bolsa periodontal.

La formación de bolsa o saco periodontal, se forma de una persistente infección en el surco gingival , esta se detecta mediante una sonda milimetrada , donde normalmente la profundidad del surco gingival es de 2 a 3 mm , un aumento nos indica la formación de bolsas periodontales, estas bolsas pueden ser verdaderas en los casos de periodontitis y no así en los casos de gingivitis donde se forman bolsas que desaparecen con el tratamiento. Evaluando con sondaje antes y después del tratamiento en los pacientes que utilizaron el enjuague extracto y placebo, se noto una mayor disminución en la formación de bolsas verdaderas y falsas.

El sangrado, es el dato mas fiable de actividad infecciosa o inflamatoria, Se produce por Micro ulceraciones en la pared blanda del saco y los numeroso vasos sanguíneos., que permite diagnosticar cuando se pone en contacto el saco con la sonda. En los resultados obtenidos se encontró una evidente disminución en aquellos pacientes que recibieron enjuague extracto, lo que nos indicaría un reducción en la actividad infecciosa o inflamatoria.

La perdida de inserción en la unión-cemento esmalte se refiere a la perdida de capas en la región del esmalte que en su composición presentan fibras colagenas y proteínas no colágenas como los proteoglicanos, glicoproteinas, que cumplen una función importante en de reparación del daño de la superficie radicular, se presenta generalmente en casos de periodontitis. Al realizar el estudio, solo hubo disminución en los pacientes que cursaban con periodontitis que utilizaron el enjuague extracto, sugiriendo que el producto natural estimula a la reparación de esta perdida.

En la evaluación radiográfica de perdida ósea horizontal y vertical se encontró un ligera disminución de la perdida ósea después del tratamiento con el enjuague bucal, esto podría ser que el curetaje realizado o limpieza bucal la inflamación o infección hizo, que hubiera una regeneración mucho mas rápida del tejido óseo.

El estudio microbiológico se delimito a examinar los microorganismos mas patógenos en la mucosa oral los o relacionados con la enfermedad periodontal, debido a que el surco gingival presenta una flora bacteriana considerada normal que evoluciona en diferentes estadios de estas patologías, por lo anterior se examino la presencia de las bacterias anaerobias responsables de la gingivitis y/o periodontitis : *Espiroquetas spp*, *Fusobacterias*, y *Streptococcus mutans spp*, que aparte de ser una bacteria cariogenica, es responsable de la enfermedad periodontal ^(1,3,8,26,29,)

En referencia al efecto de la planta, los resultados muestran que al final del tratamiento es observable una modificación de la cantidad y variedad de microorganismos respecto a la

flora encontrada al inicio del manejo. Pero demostrando una significativa disminución, en el caso de las *Espiroquetas spp*, y *Estreptococcus mutans*, pero donde se noto un considerable descenso fue en las *Fusobacterias spp* no ocurriendo tal efecto en los casos que recibieron placebo.

En lo referente a la evolución clínica se pudieron advertir diferencias entre los sujetos sometidos a enjuague extractos y los que utilizaron enjuague placebo, no obstante el hecho de que todos fueron sometidos a limpieza del surco gingival (tratamiento convencional) lo que reduce los estímulos imitativos, y da como consecuencia una disminución de la inflamación en los días siguientes. En los pacientes tratados con enjuague extracto hubo una disminución considerable en los signos de inflamación e infección dato correlacionado con la disminución de placa bacteriana y en las bacterias patógenas.

Para evaluar diferencias más ostensibles y sostenidas seria necesario el tratamiento con este producto para después evaluar la reinstalación o no de la placa bacteriana. Por lo tanto, ya que las diferencias que se encontraron fueron esencialmente clínicas y bacteriológicas, puede aseverarse que el tratamiento con el enjuague bucal, tiene efecto complementario, especialmente en las enfermedades gingivales / periodontales crónicas, pero de ninguna manera suplementario. Las diferencias que pueden esperarse se basan en la diferente calidad de flora que se logra con la administración de este producto.

Sin embargo estudios previos de la planta mostraron la presencia de Flavonas, Taninos, que estos podrían ser los responsables de la actividad antibacteriana, (38,40,52,68,70,81) ya que se reporto este efecto por la presencia de sus oxidrilos sobre la pared. Por su parte los taninos podrían estar involucrados en la disminución del proceso inflamatorio, se reporta esta actividad en el numero de moléculas que tienen actividad química al ser este producto natural utilizado en forma cruda (sin aislar moléculas en especie), se estaría administrando un conjunto de principios activos que activan sinérgica mente, lo cual respalda la idea de tener mas ventajas en el uso de formulados que incluyen extractos totales y no sustancias

aisladas, lo que a su vez reportes de la medicina tradicional validan y valoran el conocimiento ancestral de nuestras poblaciones.

X. Conclusiones

Los estudios realizados permiten concluir en lo siguiente:

- La Akhana, al ser evaluada en cultivos continuos (celulas BHK-21) y cultivos primarios (esplenocitos murinos y linfocitos humanos) mostró una toxicidad marcada, solo en concentraciones en una concentraciones mayores de 2 mg/mL y una inocuidad del producto en concentraciones bajas de 0.06 -0.02mg/mL, presentando una concentración citotóxica media (CC50) en cultivos continuos y primarios de 0.1401mg/mL y 0.1121mg/mL
- En la evaluación de inocuidad local *in vivo*, bajo los criterios histopatológicos se concluyo que el producto vegetal utilizando el equivalente de las CC50 tiene un efecto reepitelizante a nivel del estrato intermedio, esto basado en el aumento de mitosis observado. Los demás parámetros estudiados no tuvieron mayor relevancia, en lo referido a posibles daños en la mucosa.

En el estudio *in vivo* realizado en los pacientes que se sometieron al tratamiento completo con el enjuague bucal de *Aphyllocladus spartiodes weddell* al realizar la valoración clínica odontológica se encontraron diferencias apreciables en la evolución de la infección e inflamación , ya que se observo una disminución de la inflamación , el cambio de color y sangrado de las encías y descenso en la profundidad del surco gingival, perdida de textura entre los mas importantes . Entre algunos pacientes que utilizaron el enjuague extracto y el placebo se observo a pesar de que todos los pacientes recibieron tratamiento odontológico de curetaje o tartrectomia.

- En el estudio microbiológico realizado en las bacterias patógenas de los surcos gingivales demostraron una importante actividad inhibitoria sobre las Fusobacterias spp, Espiroquetas spp y Estreptococcus mutans spp. Tales hallazgos coinciden ampliamente con lo reportado en trabajos anteriores ^(13,14) con procedimientos *in vitro e in vivo*, con el enjuague de *Aphyllocladus spartioides weddell*.

- Se concluye que la Akhana constituye un recurso fitofarmacológico de amplias perspectivas en el manejo de procesos gingivoperiodontales. Sobre todo para el tratamiento complementario de las enfermedades periodontales crónicas, pero de ninguna manera suplementario, al de la limpieza o curetaje.

XI.Recomendaciones

Los resultados obtenidos son hallazgos importantes, que obliga a ser continuados con un mayor numero de pacientes, para reforzar la consistencia de los resultados encontrados., también se recomienda realizar estudios microbiologicos, efectuando la caracterización de las especies, y realizar un estudio profundo de la fitoquímica de la planta.

XII. Referencias bibliograficas:

1. José Liébana; Ana Maria Castillo, Marta Álvarez. (2004), *Enfermedades Periodontales: Consideraciones Microbiológicas*. Med Oral Patol. Oral Bucal Suppl: S591. Pp.1-13.
2. Libana Ureña, Jose (2000). *Microbiología Oral* .1º ed. Mc Graw- Hill, Interamericana Editores S.A. C.V. Mexico D.F. Pp. 457-468,527-648.
3. Noguero B. Liébana. J. Sanz Herrera D. Mesa F (2002), *Microbiología periodontal y periimplantaria*. Microbiología Oral 2º ed.Madrid. Mc Grall Hill Interamericana

4. Ximenez – Fyvie L.A. Haffajje. A.D. Socransky S. (1999). *Compararison of the microbiota of supra and sub gingival plaue in health and periodontitis*. Journal of Clinical Periodontology . Pp.25-36.
5. TOPALIAN, K. Monica (2002), *Efecto citotóxico de los cementos selladores utilizados en endodoncia sobre tejidos periapical*.
<http://www.carlosboveda.com/odontologosfolder/odontoinvitadoold/odontoinvitado23.htm>.
6. MULLET, Pascual Luis, (2004). *Principios tóxicos y síntomas de intoxicación*.
http://www.podernatural.com/varios/informacion_interes.htm.
7. Ross, Philip, Holbrook, W. Meter (1987), *Microbiología Bucal y Clínica*. 1ª edición. Editorial Cientifica, S.A. de C.V. México D.F. Pp.115-145.
8. Carranza A. Fermín. (1993), *Periodontología Clínica de Glickman*, 7ª edición, Mc Graw-Hill Interamericana Editores S.A. de C.V. México D.F.
9. Castro GDC (2006), *Opperman Association Between psychosocial factoras and periodontitis: A case –control study*, Journal of Clinical Periodontology; 109-114.
10. Ylöstalo Pv, Jävelin MR, Laitinen J. Knautla ML (2006), *Gingivitis, dental caries and tooth loss: risk factoras for cardiovascular diseases or indicadores of elevatef health risks*, Journal of Clinical Periodontology; 33:92-101.
11. Van der Weijden G.A. Timmer C. Timmerman M.F (1998). *The efect of herbal extracts in an experimetal mouthrinse on established plaque and gingivitis in man*. J. Clin Periodontol ; 25: 399-403

12. Haffajee AD, Uzel NG, Arguello (2004), *Clinical and microbiological changes associated with the use of combined antimicrobial therapies to treat "refractory" periodontitis*. J Clin Periodontol; 31: 869-877.
13. Juana Cordero Aleman (1999), *Investigaciones preliminares del poder Antimicrobiano in vitro del Aphyllocladus spartioides weddell en microorganismos causantes de procesos gingivales*. Tesina para optar el grado de Licenciatura en Bioquímica.
14. Ruth Guzman Canaviri. (2001) *Determinación de la actividad de Aphyllocladus spartioides weddell en pacientes con procesos periodontales*. Tesina para optar el grado de licenciatura en Bioquímica.
15. Van der Weijden.(1998). *The effect of herbal extracts in an experimental mouthrise on established plaque and gingivitis*. J. Clin Periodontol .Pp. 399-403.
16. K.M. Park. (2003) *Kunamon G: an antibacterial agent from the roort bark of Morus alba against oral pathogens*. Jorunal of Ethnopharmacology . Pp 181-185.
17. Van der Mei HC; White DJ (2006), *A method to study sustained antimicrobial activity of rinse and dentifrice componebts on biofilm viability in vivo*. J. Clin Periodontol; 33: 14-20.
18. V. Prashanth Kumar, Neelam S (2006), *Search for antibacterial and antifungal agents from selected Indian medicinal plants*. Journal of Ethnopharmacology. Pp.1-7.
19. Haffajee AD. (2006), *Systemic antibiotics: to use or not to use in the treatment of periodontal infectionas*. That is question. J Clin Periodontol ; 33: 359-361.

20. Maria Raquel Ferreira de Lima (2004) *Anti-bacterial activity of some brazilian medicinal plants*. Journal of Ethnopharmacology. Pp. 137-147.
21. R. Yatsuda. P.L. Rosalen (2005), *Effects of Mikania genus plants on growth and cell adherence of mutans streptococci*. Journal of Ethnopharmacology .Pp. 183-189.
22. B. Moulari, Y Pellequer (2006), *Isolation and in vitro antibacterial activity of astilbin, the biactive flavonone from the leaves of Hurungana madagascariensis Lam. Ex Poir (hypericaceae)*. Journal of Ethnopharmacology; Pp.272-278.
23. Sule Sonmez, levent Kirilmaz (2005). *The effect of bee propolis on oral pathogens and human gingival fibroblasts*. Journal of Ethnopharmacology. Pp. 371-376.
24. Matthijs S, Adriaens P.A (2002). *Chlorhexidine barnices: a review*. J. Clin Periodontol .Pp. 1-8.
25. Paul Cos, Arnold J (2006). *Anti-infective potencial of natural products: How to develop a stronger in vitro “Prof. – of – concept”*. Jornal of Ethnopharmacology .Pp. 1-13.
26. Grössner-Schrelber B. Fetter t (2006). *Prevalence of dental caries and periodontal disease in patients with inflammatory bowel disease: a case –control study*. J. Clin Periodontol .Pp. 478-484.
27. Azcon, J (1993), *Fisiologia y bioquímica vegetal*. 2da ed mc graw-Hill Interamericana. España .Pp58-78.
28. Girault. Louis (1987). *Kallaway Cuadernos Itinerantes de los Andes UNICEP-OPS* La Paz- Bolivia .Pp. 48-51.

29. Lennette, J (1986), *Manual of Clinical Microbiology*, 4ta ed Washisngton D.C. American Society for Microbiology. Pp.37-40.
30. Lock, Olga de Ugaz (1988), *Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales*. Ed. Fondo Editorial de la Pontifica Universisdad Catolica del Perú. Lima- Perú. Pp. 25-30.
31. *Mc Fadin, J (1990). Pruebas Bioquímicas para la identificación de la Bacteria de importacia clínica*. México D.F. Médica Panamericana. Pp. 73-81.
32. Strasburger, E y otros (1974). *Tratado de Botanica*. 6ta ed. Artes gráficas grijelmo. Pp17-22.
33. Burnett, Gorge y Shuster, Gorge (1982). *Microbiologia Oral y Enfermedades Infecciosas*. Viamonte (Buenos Aires), Ed Médica Panamericana, (San José Imp. Médica Panamericana) P p. 504-520.
34. Jawetz, Ernet y otros (1990). *Microbiología Médica*. Trad. Por Maria del Rosario Carsolio 13 Ed México C.F. Manual Moderno. Pp245-260.
35. Koneman, Elmer y otros (1992). *Diagnostico Microbiológico*. Buenos Aires, Médica Panamericana .Pp 78-98.
36. Smith, David y otros (1997). *Microbiologia de Zinsser*. 3 Ed. México D.F. Unión tipografica Editorial Hispanoamaricana .Pp.254-261.
37. Montaña, Mario (1992), *Guía Etonografica Lingüística de Bolivia*. Ed Don Bosco. Tomo III. Pp9-15.
38. Marcano, et. All. (1997) *Fitoquímica Organica*. Caracas-Venezuela.

39. Bustillos, Lourdes.(1995) *Placa Bacteriana, Caries y Enfermedad Gingival*.
40. Mendizabal, William. (1997). *Pruebas Preliminares de Toxicidad y Evaluación in vitro de Actividad Antibacteriana de Especies Vegetales utilizado en Medicina tradicional*. Pp40-52.
41. Vega, R., Carrillo., C.,(1997) *Efecto sobre la motilidad intestinal y toxicidad aguda oral del extracto fluido de Ocimum gratissimum. L (Oregano Cimarron)*. Rev. Cubana de Plantas Medicinales. V.2 N^o2. Ciudad de la Habana.
42. Rodriguez, J., Quezada, W., Perez R. (2004), *Evaluacion de la toxicidad por administración única del producto QT2 B21 en ratas Sprague Dawley*. Rev. Cubana de Plantas medicinales V9 N^o1 Ciudad de la Habana.
43. Lagarto. A. Tillan. (1997). *Toxicidad aguda oral del extracto fluido de Mentha spicata L. (hierbabuena)*. Rev. Cubana de Plantas Medicinales. V2. N^o2 Ciudad de la Habana. Mayo-Agosto.
44. Terrazas K I.(1997).*Estudios sobre la Savia de Musa paradisiaca: Ensayos Analíticos Preliminares y Evaluación de la Actividad Biologica in vitro*. Tesis para optar el grado de Licenciatura en Bioquímica y Farmacia. UMSA. La Paz- Bolivia.
45. Zapata, A., Gonzáles. R. Garriga. S., Melo. M., (1998). *Investigación Biomédica*.17 (3): 208-13 Rev. Cubana.
46. Guevara I., Rodríguez. C y Col. (2003).*Ensayo de Toxicidad Aguda Oral de un Fitofarmaco obtenido a partir del Pseudotallo de Musa paradisiaca L*. Acta faro. Bonaerense.22 (I):57:-9.

47. Alfonso. H. Aparicio. (1992), *En principales compuestos tóxicos, sus efectos en la población animal y la conducta veterinaria*. La Habana Centro Veterinario para Prevención en Caso de Desastres. 1-3.
48. Miranda. M. (1995) *Programa Nacional de Plantas Medicinales*. Conferencia Sección Plantas medicinales y Síntesis. Rev. Cubana Farm. 30 Supl:205.
49. Vargas. A. Silv. G., y col (1991), *Screening of plants used in South Brazilian Fol. Medicine*. J. Ethnopharmacol.35:165-71.
50. Klaassen. C. Watkins. J.,(2001). *Manual de Toxicología*. 5ª. Edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana.México. Pag. 12-592.
51. Chan Pk. Hayes W. (1986).*Principales and Methods for acute and sub chronic toxicity*. In: *Principles and methods of toxicology*. New Cork: Raven Press; p 1-51.
52. Xiaorui. Z. (1999) *Research guidelines for the evaluation of the safety and efficacy of herbal medicines*. Manila, World Health Organization Regional Office for the Western Pacific. Annex II. 35-40.
53. Rios. J. (1998) *Patología Bucal*. Tomo II. 3ª Ed. Librería Editorial Juventud. La Paz, Bolivia. Pag. 39.
54. Pardo. F. (1998), *Compendio de Anatomía Patológica*. Editorial. Harcourt. Brace. España.Pag. 1-2-10-41-49.
55. David H. Cormack. (1988) *Histología de HAM*. Editorial Mexicana. Mexico D.F. Pag.589-605.
56. Rios. J., (1996), *Patología Especial Tomo II*. 2º Ed. Librería Editorial Juventud. La Paz- Bolivia .Pág. 67-69.

57. Lezazcue A. (2000), *Hierbas, algunas hierbas de Uruguay y otras plantas de valor curativo*. Universidad Abierta de San José UNAMA.
58. Baños. M. (2003), *Cuidado y manejo de animales de laboratorio*, INLASA. La Paz – Bolivia. Pág. 8-9-10-11.
59. Garcia. A., (2001), *Estudio toxicogenetico de un polisacarido del gel de Aloe Vera.L*. Rev. Cubana de Plantas Medicinales Vol. I N°. 2 Ciudad de la Habana.
60. Garcia. M. Coto. T. y col. (2002) *Toxicidad sub aguda del extracto acuoso de las hojas y los brotes florales de Stachytarpheta jamaicensis*. Rev. Cubana de Plantas Medicinales. Vol.7. N°. 2.
61. Martinez. J., *Desarrollo e investigación clínica de un medicamento*. Novartis de Colombia. S.A.
62. *Pautas para la evaluación de medicamentos a base de productos naturales*. Anonimo.
63. *Sub-Chronic oral toxicity test. Repeated dose 90 day oral toxicity study in rodents*. Anonimo.
64. *Acute oral toxicity – fixed dose procedure* .Anonimo.
65. Adams D. O. (2001), *Molecules, Membrana and Macrophage Activation Immunology Today*, 3: 11: 285-287.
66. Afroun. S Oswald. (2000), *Simulation of Antimycobacterial Activity in Mouse Periotoneal Macrophages by Priming with Trehalose Dymicolate (TDM)*, *Immunology Today*, Pp174-182.

67. RIVERO Reinaldo, RODRIGUEZ Eduardo, MEÑENDEZ Rosa, et. al. (2002), *Obtención y caracterización preliminar de un extracto de Aloe vera con actividad antiviral*. RevCubanaPlantMed, 7(1), p.32-28.
68. . FRESQUET Freber, BLANQUER Rosello, GALINDO Dobon, et. al. (2001), *Inventario de las plantas medicinales de uso popular en la ciudad de Valencia*. GRAAULT Louis, (1984), *Kallawaya*, Paris: IORSTOM, p.326-328.
69. Medicina y ciencias sociales. <http://www.uv.es/medciensoc>.
70. DEL VITTO L, PETENATTI E, PETENATTI M, *Recursos herbolarios de San Luis (Argentina). Segunda parte: plantas exóticas cultivadas, adventicia y/onaturalizadas*. http://www3.cricyt.edu.ar/multiequina/indice/pdf/07/7_4.pdf
71. CAÑIGUERAL Salvador, VILA Roser, *Fitoterapia: Concepto y limites. Fuente de información*. http://www.podernatural.com/varios/información_interes.htm.
72. GUERRA Maria, TORRES Dinorah, MARTINEZ Leticia, (2001), *Validación del uso tradicional de plantas medicinales cultivadas en Cuba*. Rev. Cubanaplantmed, 2, p. 48-51.
73. OMS/TRM/98,1, *Situación Reglamentaria de los Medicamentos*. <http://www.who.int/medicines/espanol/who-trm-98-1-sp.pdf>
74. BASUALDO Juan Angel, COTO Celia, DE TORRES Alberto, (1996), *Microbiología Biomédica*, 8va ed, Buenos Aires: Atlanta, talleres de litografía, p. 1188.

75. RESTREPO Angela, ROBLEDO Jaime, LEIDERMAN, Eduardo, (2004), *Enfermedades infecciosas*, CIB-Corporación para investigaciones biológicas, OPS-OMS.
76. HOBERMAN A, PARADISE J, (2000), *Otitis media aguda: Diagnóstico y manejo en el año 2000*. *Pediatric Annals*, 29, p. 609-620.
77. FARSLow T, STITES D, TERR A, (2001), *Medical Immunology*, 10ed, New York: McGraw-Hill, p.814
78. JOSHI M Anita, *Animal cell biotechnology*.
<http://www.tulane.edu/~dmsander/articler/mass.html>
79. REINA Manuel, *Técnicas de estudio de líneas celulares*.
<http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/cap3.htm>.
80. ORDOÑEZ Maria Guerra, TORREZ Dinorah, MARTINEZ Leticia, (2001), *Validación del uso tradicional de plantas medicinales en Cuba*. *RevCubanaplantmed*, (2), p.48-51.
81. MURPHY Cowan Marjorie (1999), *Plants, Products as Antimicrobial Agents*, *Clinical Microbiology Reviews*, Oct. 12 (4), p. 564-582.
82. Boletín Epidemiológico Semanal (2003), *Semana Epidemiológica*, Instituto Nacional de Salud, Colombia.
83. Infosalud. Año4/No1,048.
<http://imgbiblio.vaneduc.edu.ar/pinfoSalud/2003/Junio2003/Programa%20InfoSalud%2026-06-03%20mat.htm>

84. PROSIN; *Estadísticas de Salud*, Ministerio de Salud y Deportes. Sistema Nacional de Información en Salud. <http://www.ops.org.bo>.
85. SIGMA, *Biochemical and Reagents*. For life science research, 2000-2001.
86. SIGMA ALDRICH, *Fundamental techniques in cell culture...a laboratory handbook*. ecaoa70
87. REINA Manuel, *Las contaminaciones*.
<http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/cap5.htm>
88. RPMI-1640, Cell Culture Reagents. Catalog.
89. PARDO Georgina, ALMORA Ernesto, FIDALGO Odalys, *Ensayo in vitro para detectar la presencia de agentes adventicios en un banco de células de trabajo*. Instituto Finlay. Centro de investigación. Producción de vacunas y sueros
90. Biochemicals and Reagents ICN biomedical Inc. Catalog 2002-2003
91. Técnicas de contaje celular, [http://www.ub.es/biocel/wba/tecnicas/contaje celular.htm](http://www.ub.es/biocel/wba/tecnicas/contaje_celular.htm)
92. FLORENCE B, CHAMBERS T, WIEDBRAUK D, (1992), *Virology A Laboratory Manual*, California: ACADEMIA PRESS, p.360.
93. RODRIGUEZ Vicente, ORTEGA Vicente, CARDENAS Jordana, (1997), *Valor del ensayo colorimétrico con MTT en el estudio del crecimiento y citotoxicidad in vitro de líneas de melanoma*. Patología 30(1), p.18-27.
94. VELLONEM Kati-Sisko, HONKAKOSKI Paavo, URTTI Arti (2004), *Substrates and inhibitors of efflux proteins interfere with the MTT assay in cells and may lead*

- to under estimation of drug toxicity*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 25(2), p. 181-188.
95. TWENTYMAN P, LUSCOMBE M, (1987), *A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based cell growth and chemosensitivity*. J.Cancer, Sept. 56(3), p.279-285.
96. ROSLEV Peter, KING Gary, (1993), *Application of a Tetrazolium Salt with a Water-Soluble formazan as an Indicator of Viability in Respiring Bacteria*. Applied and environmental Microbiology. Sept. 59(9), p. 2891-2896.
97. GEBRAN S, NEWTON C, YAMAMOTO Y, (1994), *A Rapid Colorimetric Assay for Evaluating Legionella pneumophila Growth in Macrophages In Vitro*. Journal of Clinical Microbiology, 32(1), p.127-130
98. KAWADA Kazuhiko, YONEI Toshiro, VEOKA Hiroshi, et. al. (2002), *Comparison of Chemosensitivity Tests: Clonogenic Assay versus MTT Assay*. Acta Medica Okayama, 55(3), p.129-134.
99. ATCC-MTT Cell Proliferation Assay instructions. Catalog Number 30-1010K. <http://www.atcc.org/pdf/30-1010k.pdf>.
100. BERNAS Tytus, DOBRUCKI Jurek, (2002), *Mitochondrial and Non mitochondrial Reduction of MTT: Interaction of MTT With TNRE, JC-1, and NAO Mitochondrial Fluorescent Probes*, Cytometry, 47, p. 236-242.
101. BERRIDGE V., Michael, TAN An, McCOY Kathy, et. al. (1996), *The biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium salts*, Biochemical, (4), p.16-19.

102. Kuriyama, Tomoari, Karasawa, Tadahiro. (2000), *Bacteriologic features and antimicrobial susceptibility in isolates from orofacial odontogenic infections*. Oral surg Oral med Oral pathol Oral radiol Endod .Pp1-17.
103. Seltzer, Samuel. (1994). *Microbiologic factors in endodontology*. Orla Surg Oral Med Oral Pathol.; 78: 634-45.
104. Maroni Hilda, (2004), *Bacterias Orales y enfermedades sistemicas: una revision*. Odontol. sanmarquina . 8 (1) : 30-34
105. Gutiérrez-Pérez JL, (2004). *Infecciones orofaciales de origen odontogénico*. Med Oral; 9:280-7.
106. Medina, Myriam L. (2003), *Manifestaciones clinicas y hallazgos microbiologicos en enfermedades gingivoperiodontales*. Departamento de Bacteriología - Instituto de Medicina Regional - UNNE. Ed. Argentina. Pag. 1-4.
107. Bascones Martinez A. (1989). *Diagnóstico y tratamiento de la Enfermedad Periodontal*. Avances en Odontoestomatología 3. Ed. España. Pp.105-127.
108. Hiskin Sergio. (2005), *Nuevos metodos de diagnostico Periodontal* Universidad Santa María - Facultad de Odontología Ed. Argentina. Pag.1-6.
109. Muñoz José, Castañeda Victoria, (1999), *Afección sistémica y periodontal relacionadas con el tabaquismo* .Revisión bibliográfica Vol. LVI, No. 3 Ed. Mexicopp 108-112.
110. Dra. Iriam Baldemira Rodríguez, Dra. Zaida T. Iliasastigui Ortueta. (1996) *Sangramiento gingival y flora bacteriana en la gingivitis y la periodontitis*, Rev Cubana Estomatol ;33(2)

111. Costerton, J.W., Stewart, P.S., and Greenberg, E.P. (1999) *Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections*. Science 284: 1318-1322.
112. Dr. Jose de Paula Silva, Lic. Antonio Martins de Siqueira (2000), *Acción antibacteriana de extractos hidroalcohólicos de rubus urticaefolius*. Rev. cubana Plant med ;5(1):26-9
113. Nancy Torres Casales. (2001)*Fármacos Anti-inflamatorios y plantas con propiedades anti-inflamatorias*. Rev. Universidad de Puebla. pp 2-5.
114. Dra. Estela Gispert Abreu, Dra. Elena Cantillo Estrada,(2004), *Crema dental con manzanilla, efecto estomatológico*, Centro Provincial de Investigaciones Estomatológicas Ciudad de La Habana pp.1-5.
115. Sistemas de Salud Tradicionales en América Latina y el Caribe: **Información de Base** Noviembre de 1999 .Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. pp1-25.
116. Lic. Marta Guerra Ordóñez, Lic. Dinorah Torres.(2001)*Validación del uso tradicional de plantas medicinales cultivadas en cuba*.Rev cubana plant med ; (2):48-51
117. Mireya Gonzales, Veronica Quiroz.(2001),*Sanguinaria Mexicana (Polygonum Aviculare) aplicaciones y beneficios*. Ciencia Ergo. Vol 2. Pp118-123.
118. Lic. Talía Romay Penabad, Dra. María del Carmen Sotolongo Baró (1996), *Toxicología subcronica bucal del extracto fluido de **Plantago lanceolata***. Rev cubana plant med 1(2):24-26, mayo-agosto,

119. Lic. Alicia Lagarto Parra, Dra. Viviana Bueno Pavón, MSc. (2003) *Toxicidad aguda oral e irritación sobre mucosa bucal del extracto oleoso de Melanthera deltoidea Mich.* Rev Cubana Plant Med ;8(3)
120. Lic. Arilia García López, Lic. Angel Vizoso Parra, (2001), *Estudio toxicogenético de un polisacárido del gel de aloe vera l.* Rev cubana plant med ; (2):52-5
121. Daysi Díaz Obregón, Luis Lloja Lozano,(2004), *Estudios preclínicos de cucurbita máxima (semilla de zapallo) un antiparasitario intestinal tradicional en zonas urbano rurales.* Estudios prelinicos rev. gastroenterol. Perú; 24: 323-327.
122. Francisco Farias Rodríguez. (2000), *Enfermedad Periodontal y microorganismos periodontopatogenos.* Facultad de Odontología Carabobo. pp 1-22.
123. Guillermo Quindós, Rocío Alonso Vargas, María Teresa Ruesga Alonso (2001), *Procesamiento de muestras de la cavidad oral y otorrinonaringológicas,* Revista Iberoamericana de Micología . pp 1-8.
124. .Miriam Cabrera Yañez.(2004) *Estudio microbiológico de la bacteria Prevotella intermedia en el surco gingival de gestantes en diferentes grados de placa bacteriana Hospital Nacional Docente Madre –Niño San Bartolomé .*Tesis Para optar el título de cirujano dentista Lima – Peru .pp 1-78.
125. . Georgina Pardo, Ernesto Almora, Odalys Fidalgo, Arelys Zamora, Niurka Rodríguez y Ela María Pérez. (2004), *Ensayo in vitro para detectar la presencia de agentes adventicios en un banco de células de trabajo Centro de Investigación– Producción de Vacunas y Sueros.* Ciudad de La Habana, Cuba.. pp.1-5.

126. . Vargas F., Díaz, Y(200),. *Estudios in vitro de los mecanismos fotooxidantes y antioxidantes de los principios activos de la Aloe Vera*. Revista de la facultad de farmacia vol. 45 (1).
127. .Kristensen F, Kristensen B, Lazary S (1982). *The lymphocytes stimulation test in veterinary immunology*. Vet Immunol mitógeno y determinada por medio de la incorporación Vet Immunopathol; 3:203-277.
128. Carlos Ramón Bautista Garfias. Elizabeth Acosta García.(2000). *Evaluación del bioensayo de MTT para determinar la proliferación in vitro de linfocitos de bovino, frescos y congelados*. Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México, Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, Pp.3-6.
129. .Maria Jose Contreras, Alain Ramirez, (2003).*Estudio reologico e interaccion de geles binarios de carbopol y acido Hialuronico: indice se sinergia viscosa*. Departamento de Farmacia y tecnología farmaceutica. Madrid España.
130. Gale KR, Gartside MG, Dimmock CM, Zarkzewski H, Leatch G(1996). *Peripheral blood lymphocyte proliferative responses in cattle infected with or vaccinated against Anaplasma marginale*. Parasitol Res; 82:551-562.
131. Teresa Velilla G. (.2002), *Propiedades termodinámicas de macromoléculas en solución; caso de estudio: polivinilpirrolidona*. Curso: IQ761 Termodinámica Avanzada pp1-7.
132. Alvaro Dueñas L., M.D, William David Criollo(1996), *Enfermedad perinatal y viabilidad celular renal postmortem in vitro en el Hospital Universitario del Valle, Cali* Colombia Médica Vol. 27 N° 3-4,. pp.1-8.

133. Gasbarre LC, Romanowski RD, Douvres FW(1985). *Supresión of antigen- and mitogen-induced proliferation of bovine lymphocytes by excretory-secretory products of Oesophagostomum radiatum*. Inf Immun; 48:540-545.
134. N. López Moratalla. G. Herranz.(1999), *Alternativas al empleo de animales en experimentación*. Centro de Documentación de Bioética, Aregentina .pp1-15.
135. Pedro Antonio Martínez-Carpio, Miguel Ángel Navarro Moreno(2003). *El cultivo celular en la investigación básica del cáncer de mama* .Rev Oncología,; 05 - 04 p. 184 – 191.
136. J. M. Zubeldia (2001), *Modelos animales de experimentación en Alergología*. *Alergol Inmunol Clin*;16: 265-266 pp1-5.
137. Norberto Barassi, Fernando Benavides, Alejandro Ceccarelli (1996). *Etica en el uso de animales de experimentación medicina* - Volumen 56 - Nº 5/1, 1996 MEDICINA (Buenos Aires). Pp1-8.
138. J. Obregón, P. Ramos, J. Aponte. (1984). *Cultivo de células BHK₂₁ clon 13 en suspensión: construcción y operación de un fermentador experimental*. Veterinaria tropical. Vol. 9: 3-15.pp1-9.
139. .Lic. Alicia Aguilar Barroso, Dr. Nevis Amin Blanco, Lic. Luis Morier Díaz. Dra. Ela María Pérez Hernández.(2005). *Evaluación de la infectividad de cepas de dengue 1 en las líneas celulares HepG2 y Vero*. Rev cubana med trop;57(2):105-10.Pp.1-6
140. John S. Greenspan PhD.(2004) *Enfermedades bucales locales que comprenden mecanismos Inmunitarios*. Inmunologia Basica y Clinica. Pp.607-614.
141. R. B. Lucas *Bacteriologia aplicada a la Odontologia*.(1959).Ed junin. Buenos Aires. Impreso en Argentina. Pp. 251-256.

142. . W. P. Holbrook .(1987).*Microbiología Bucal y Clínica*. Ed. Científico. Impreso en Mexico. Pp.58-71.
143. Fermin A Carranza. (1988).*Periodontología Clínica de Glickman*. Ed. Mac Graw Hill. Impreso en Mexico.Pp.104-109.
144. Abraham Abranovich. (1986).*Histología y Embriología dentaria*. Editorial medica Panamericana. Buenos Airwa. Pp.256-277.
145. Jeffrey L. Ebersole. (1985) *Effect of Subgibival on Systemic Antibody Responses to Oral Microorganisms*. Infection and Immunity. Pp. 534-539.
146. . W. j. Loesche(1978)..*Bacteriology of Human Experimental Gingivitis: Effect of Plaque and Gingivitis Score*.Infection and immunity., p. 830-839.
147. Arie j. Van Winkelhoff. (1985).*Bacteroides endodontalis and Other Black-Pigmented Bacteroides Species in Odontogenic Abscesses*.Infection and immunity., p. 494-497
148. Dr. Ernesto Muller.(1997).*Tratamiento de la gingivitis y de la periodontitis*.Journal of Periodontology, Volumen 68, N° 12, . Pp.1-7.
149. Symonne Pimentel Castro de Oliveira Lima Parizotto(2003), *Effectiveness of low cost tooth brushes, with or with out den tifice, in the re moval of bacterial plaque in de ciduosteeth* Pesqui Odontol Bras;17(1):17-23.
150. Mariane Ponzio de Azevedo Galvão (2003). *Effects of lig ature-induced periodontitis in preg nant Wistar rats*Pesqui Odontol Bras; 17(1):51-5 Pp. 1-5.
151. Dahle´n G, Leonhardt (2006), *A new checkerboard panel for testing bacterial markers in periodontal disease* Oral Microbiology Immunology: 21: 6–11.

152. Dra. Elena Morán López (2001), *Enfermedades bacterianas del periodonto y tejidos adyacentes en el paciente portador de sida*. Facultad de Estomatología Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana. Pp.1-11.

153. Clay B. Walker (1998). *Agar medium for use in Susceptibility testing of bacteria From Human periodontal Pockets*. Antimicrobial agents and Chemotherapy.. Pp. 452-457.

154. José Liébana , Ana María Castillo , Marta Álvarez (2004). *Enfermedades periodontales: consideraciones microbiológicas*. Med Oral Patol Oral Cir Bucal;9. Suppl:S75-91.

155. Clay b. Walker, Jeffrey m. Gordon (2004), *Gingival Crevicular Fluid Levels of Clindamycin Compared with Its Minimal Inhibitory Concentrations for Periodontal Bacteria*. Antimicrobial agents and chemotherapy, p. 867-871

156. Harold Marcotte. Marc C. Lavoie (1998). *Oral Microbial Ecology and the Role of Salivary Immunoglobulin A*. Microbiol Mol Biol Rev. March; 62(1): 71–109.

157. Linda j. Laatsch. (1982), *Antibiotic Susceptibility of Black-Pigmented Bacteroides Isolates from the Human Oral Cavity*. Antimicrobial agents and chemotherapy, p. 698-700.

158. Clay b. Walker (1981). *Gingival Crevicular Fluid Levels of Clindamycin Compared with Its Minimal Inhibitory Concentrations for Periodontal Bacteria*. Antimicrobial agents and chemotherapy, p. 867-871.

159. Brenda Modak, Abel Arrieta, Rene Torres, Alejandro Urzua. (1998) *Actividad antibacteriana de flavonoides aislados del exudado resinoso de heliotropium sinuatum: efecto del tipo de estructura*. Facultad de Química y Biología, Departamento de Ciencias Químicas, Universidad de Santiago de Chile Pp.1-8.

160. José L. Castellanos (2002). *Mucosa bucal*. Revista de la Asociación Dental Mexicana Vol. LIX, No. 2 p 73.

161. Alberto Caballero (2001). *Directrices y recomendaciones para las comisiones éticas europeas*. Ethics Working Party, del European Forum for Good Clinical Practice. Forum. Suiza.. Pp. 1-21.

162. Sule Sonmez.(2005) *The effect of bee propolis on oral pathogens and human gingival fibroblasts*. Journal of Ethnopharmacology. Pp371-376.

163. Haffajee AD.(2006). *Sistemic antibiotic: to use or not to use in the treatment of periodontal infections*. Tha is the question. J. Clin. Periodontol .Pp. 359-361

ANEXOS

ANEXO N°1

RPMI no suplementado: RPMI -1640
Glutamina 2 mM
Bicarbonato de Na 2 %
N-2 hidroxietil piperizina N-2 acido etanos
Sulfonato (Hepes) 24 mM
Penicilina 100 u /mL
Estreptomocina 100 u/ mL

ANEXO N°2

PBS Cl Na 0.75 mM
Na₂ H P O₄ 0.018 mM
K H₂ P O₄ 0.018 mM

ANEXO N° 3

RPMI-S 5% suplementado RPMI -1640
Glutamina 2 mM
Bicarbonato de Na 2%
N- 2 hidroxetil piperazina
N- 2 acido estano sulfonato (hepes) 24 mM
Penicilina 100 U / mL
Estreptomocina 100 U / mL
Suero fetal bovino 5%
2 – Mercaptoetanol 5 x10⁵ M

ANEXO N° 4

Versene Cl Na 1.5 mM
K₂ P O₄ 1.4 mM
Cl K 2.7 mm
Na₂ H P O₄ 1.4 mM
EDTA 0.2 g

PREPARACION DE REACTIVOS

TINCION GRAM:

Crsital violeta	2.0 g	Solucion A
Etanol 95%	20	
Oxalato de amonio	0.8 g	Solucion B
Agus destilada	80 mL	

Disolver 2 g. de Cristal violeta en 20 mL de etanol (Solución A)

Disolver 0.8 g de oxalato de amonio en 80 mL de agua destilada (Solucion B)

Mezclar la solucion Ay B, guardar durante 24 horas y luego filtrar.

YODO GRAM (Lugol):

Yoduro de Potasio	2.0g
Yodo (cristales)	1.0g
Agua destilada	100 mL

Pesar los reactivos secos y disolverlos en agua destilada, depositar la solución en frasco de vidrio color ambar.

DECOLORANTE:

Acetona	50 mL
Alcohol de 95 %	50 mL

Mezclar la acetona con el alcohol y colocar en un frasco.

CONTRA COLOR:

Fuscina basica fenicada	0.5g
Alcohol de 95%	100 mL

PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO

CALDO TIOGLICOLATO

Tiocolato (Difco)	2.9 g
Agua destilada	100 mL

El caldo tioglicolato fraccionado en tubo se lleva a baño de agua hirviendo durante 10 minutos, dejar enfriar: listo para la toma de muestra de bacterias anaerobias.

AGAR MITIS SALIVARIUS

Base Thayer Martin Agar para 250 mL

Agar Thayer Martin	9.75 g
Triptosa	2.5 g
Azul tripán	0.019 g
Cristal violeta	0.00002 g
Telurito de Potasio	0.025 mL (solución de Chapman)

Se prepara los medios en agua destilada con los colorantes y autoclavar, luego a 57°C agregar el telurito de Potasio en condiciones esteriles.

AGAR SANGRE

Agar Thayer Martin (Difco)	3.9 g
Agua destilada	100 mL
Sangre desfibrinada	5 mL

Preparar el medio en agua destilada y autoclavar, luego agregar la sangre desfibrinada en condiciones esteriles.

AGAR CHOCOLATE

Agar nutritivo (Difco) 2.3 g
Agua destilada 100 mL
Sangre desfibrinada 5 mL

Preparar el medio en agua destilada y autoclavar, agregar la sangre desfibrinada y someter este agar a una temperatura de 80°C, de esa forma la hemoglobina se transforma en metahemoglobina, dándole el aspecto de chocolate.

SOLUCION FISIOLÓGICA

Na Cl 0.9 g
Agua destilada 100 mL

Se preparo en un frasco esteril, se autoclavo y se alicuto en tubos esteriles.

ANEXO 5

Enjuague Retamox



ANEXO 6

SIGNOS CLINICOS GINGIVOPERIODNTALES	Leve +	Moderado++	Severo+++
Cambio de color			
Aumento de volumen			
Pérdida de textura			
Agrandamiento gingival			
Pérdida de bisel			
Dolor			
Ulceración			
Pérdida de función			
Acumulación de placa bacteriana y cálculo supragingival.			
Acumulación de calculo subgibgival			
Formación de bolsa o saco periodontal falsa.			
Formación de bolsa o saco periodontal verdadera.			
Sangramiento			
Edema y supuración			
Pérdida de inserción en relación a la unión cemento –esmalte			
Recesión del margen gingival			
Movilidad dentaria			
Destrucción de hueso alveolar			
RX. Pérdida de hueso alveolar			
RX. Pérdida ósea horizontal			
RX. Perdida ósea vertical			

ANEXO 7

Estudio Microbiológico

Paciente.....

Código.....

Fecha.....

Examen en fresco: Muestra del surco gingival en solución fisiológica

	Primera muestra			Segunda muestra		
	+	++	+++	+	++	+++
Espiroquetas						

Tinción Gram. : Examen en fresco surco gingival.

	Primera muestra			Segunda muestra		
	+	++	+++	+	++	+++
Fusobacterium spp						
Streptococcus spp						
Staphylococcus spp						

Tinción gram: Muestra del surco gingival, incubado 48 horas en caldo tioglicolato.

	Primera muestra			Segunda muestra		
	+	++	+++	+	++	+++
Fusobacterium spp						
Streptococcus spp						
Staphylococcus spp						

Cultivo: Siembra de las muestras cultivadas en tioglicolato

ANEXO 8

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

La Paz.....

Señor:

Presente.-

Uno de los problemas mas frecuentes en épocas actuales son las afecciones bucales entre estas una de las frecuentes es la gingivitis/periodontitis, que es una inflamación a nivel de la encía o del soporte del diente causada por bacterias patogenas que causan daño a su encía y a su dentadura.

Ante esto la Universidad Mayor de San andres a través del Instituto de Servicios de Laboratorio en Salud y Diagnostico (SELADIS), han realizado esfuerzos para solucionar este problema mediante la generación de un producto natural que puedan ayudar a mejorar el daño causado por la enfermedad.

Para tal efecto, se ha dispuesto la ejecucion un protocolo de investigacion en el que se administre el extracto de una planta en forma de enjuague bucal a diverdas personas que cursen gingivitis.

Para observar los efectos terapeuticos, se tomaran muestras del surco gingival para diagnostico microbiologico y estudio de parametros clínicos antes y despues de recibir el enjuague bucal durante 7 dias.

Producto estudiado: Es una planta usada en la medicina tradicional en el tratamiento de procesos infecciosos gingivales y /o periodontales en forma de infusión para enjuagues, por lo que se evaluo su actividad bactericida, demostrando su inocuidad y se concluyo que no genera reacciones adversas o efectos no deseados, a la dosis y forma utilizada.

Con base en todo lo anterior, usted ha sido invitado a participar en este protocolo, en el marco de lo anteriormente mencionado. Sin embargo usted no tiene ninguna obligación de aceptar su incorporación ya que esta es enteramente voluntaria. En caso de que acepte, sera necesario que usted siga todos las instrucciones que le dará su medico.

Todos los participantes reciban de forma gratuita el enjuague bucal, el estudio microbiológico no tendra costo.

Cualquier molestia sera atendida con el cuidado necesario para asegurar su bienestar.

Si usted tiene preguntas sobre este estudio, no dude en realizarlos al personal del grupos de investigadores al Dr. Roger Carvajal (Cel.....) o la Dra Gilda Menacho (Cel.....) o acudir a la Facultad de Odontologia area de Periodoncia.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

He leído cuidadosamente la información en la sección anterior y he tenido toda la oportunidad de hacer preguntas necesarias que me aclaren a conformidad sobre el estudio propuesto. De manera libre manifiesto mi acuerdo para participar en este estudio, para lo cual firmo al pie del original y copias que serán entregadas.

Firma y nombre del participante
CI

Fecha
N^a de inclusión

Firma y nombre del medico
Responsable

Fecha
Grado academico

