



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE  
SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS  
“DR. IGNACIO CHÁVEZ”  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

“EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN ORAL DEL EXTRACTO ACUOSO DE  
HOJAS DE GALEANA (*SPATHODEA CAMPANULATA*) SOBRE LA CANTIDAD  
DE OSTEOCLASTOS EN RATAS CON PERIODONTITIS”

**T E S I S**

PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD**

P R E S E N T A:  
**Cirujano Dentista**  
**TOMAS CRUZ VELASQUEZ**

DIRECTORA DE TESIS:  
**D. C. BERTHA FENTON NAVARRO**

CO-DIRECTOR DE TESIS:  
**M. C. MANUEL LÓPEZ RODRÍGUEZ**

MORELIA, MICHOACÁN, MÉXICO  
AGOSTO 2022



El Comité Tutorial designado por la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo aprobó la tesis presentada por:

Cirujano Dentista

Tomas Cruz Velasquez

**COMITÉ TUTORAL:**

**Presidente:**

**D.C. MARTHA EVA VIVEROS SANDOVAL**

**Vocal 1:**

**D.C. RUBÉN ABRAHAM DOMÍNGUEZ PÉREZ**

**Vocal 2:**

**D.C. CARLOS CORTÉS PENAGOS**

## DEDICATORIA

*A mi mamá, papá, hermanos y hermanas por el apoyo incondicional que he recibido durante toda mi vida.*

*A mis sobrinos, quienes me han servido de inspiración para ser mejor persona cada día.*

*A Betty, por el apoyo y comprensión en esta nueva etapa llena de aprendizajes.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la División de Estudios de Posgrados de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH).

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

A mi directora de tesis, D.C. Bertha Fenton Navarro, por guiarme durante toda la etapa de la maestría, y por ayudarme a ampliar un pensamiento científico con mayor profundidad de análisis. Gracias por su tiempo invertido, paciencia y por todo el conocimiento que me transmitió como docente y como directora de este trabajo de tesis.

A mi codirector de tesis, M.C. Manuel López Rodríguez por apoyarme en la parte metodológica desde el inicio del proyecto, por sus recomendaciones y aportaciones al trabajo de tesis, gracias por su paciencia y disponibilidad para facilitarme la realización del proyecto.

A mi comité tutorial, D.C. Martha Eva Viveros Sandoval, D.C. Rubén Abraham Domínguez Pérez y D.C. Carlos Cortés Penagos, por enriquecer este proyecto con sus valiosas observaciones en cada avance de tesis.

Al M.V.Z. Adrián Sánchez Orozco encargado del Laboratorio de Histopatología de la Unidad de Servicios Auxiliares de Diagnóstico (USAD) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UMSNH, por sus aportaciones en técnicas histológicas y brindarme la confianza de disponer de las instalaciones del laboratorio.

A los docentes de la Maestría en Ciencias de la Salud quienes me impartieron clase, por transmitirme parte de su vasto conocimiento para crecer en esta infinita área de la investigación.

La Maestría en Ciencias de la Salud de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad – Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

El alumno de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de la Maestría en Ciencias de la Salud, Generación 2020-2022.

No. de Becario: 765981

CVU: 1043018

Matrícula: 1344104G

La presente investigación se realizó en:

Laboratorio de Glicobiología

División de Estudios de Posgrado

Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

A cargo de la D.C. **Bertha Fenton Navarro**

Laboratorio de Histopatología

Unidad de Servicios Auxiliares de Diagnóstico (USAD)

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

A cargo del M.C. **Manuel López Rodríguez**



## ÍNDICE GENERAL

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Índice de figuras</b>  | <b>8</b>  |
| <b>Índice de tablas</b>   | <b>10</b> |
| <b>Resumen</b>  | <b>11</b> |
| <b>Abstract</b>   | <b>12</b> |
| <b>1. Introducción</b>  | <b>13</b> |
| <b>1.1 Antecedentes</b>   | <b>13</b> |
| 1.1.1 Periodontitis   | 13        |
| 1.1.2 Clasificación de enfermedades periodontales               | 17        |
| 1.1.3 Tratamiento de la periodontitis                           | 17        |
| 1.1.4 Periodontitis en modelo animal                            | 20        |
| 1.1.5 Periodontitis inducida con LPS en modelo animal de rata   | 21        |
| 1.1.6 Plantas medicinales en el tratamiento de la periodontitis | 24        |
| 1.1.7 Planta Galeana ( <i>Spathodea campanulata</i> )           | 26        |
| <b>2. Planteamiento del problema</b>                            | <b>27</b> |
| <b>3. Justificación</b>   | <b>31</b> |
| <b>4. Hipótesis</b>   | <b>32</b> |
| <b>5. Objetivos</b>   | <b>32</b> |
| <b>5.1 Objetivo general</b>                                     | <b>32</b> |
| <b>5.2 Objetivos particulares</b>                               | <b>32</b> |
| <b>6. Material y métodos</b>                                    | <b>33</b> |
| <b>6.1 Universo de estudio</b>                                  | <b>33</b> |



|  |           |
|--|-----------|
| <b>6.2 Obtención del extracto acuoso de <i>Spathodea campanulata</i> (EASC)</b>      | <b>33</b> |
| <b>6.3 Estandarización de la descalcificación de las muestras</b>                    | <b>34</b> |
| <b>6.4 Animales y diseño experimental</b>  | <b>35</b> |
| <b>6.5 Temperatura y peso corporal</b>   | <b>38</b> |
| <b>6.6 Inflamación gingival clínica</b>  | <b>38</b> |
| <b>6.7 Evaluación histopatológica</b>  | <b>39</b> |
| 6.7.1 Análisis histológico y cuantitativo del infiltrado inflamatorio (H&E)          | 41        |
| 6.7.2 Análisis histológico y cuantitativo del número de osteoclastos (TRAP)          | 42        |
| <b>6.8 Análisis bioestadístico</b>   | <b>45</b> |
| <b>6.9 Aspectos éticos</b>   | <b>45</b> |
| <b>7. Resultados</b>   | <b>46</b> |
| <b>7.1 Estandarización de la descalcificación de muestras</b>                        | <b>46</b> |
| 7.1.1 Radiografías (rayos-X)   | 46        |
| 7.1.2 Análisis histológico   | 48        |
| <b>7.2 Estandarización de la administración de LPS</b>                               | <b>49</b> |
| <b>7.3 Temperatura corporal</b>  | <b>50</b> |
| <b>7.4 Peso corporal</b>   | <b>50</b> |
| <b>7.5 Inflamación gingival clínica</b>  | <b>53</b> |
| <b>7.6 Análisis histológico y cuantitativo del infiltrado inflamatorio (H&amp;E)</b> | <b>54</b> |
| <b>7.7 Análisis histológico y cuantitativo del número de osteoclastos (TRAP)</b>     | <b>60</b> |
| <b>8. Discusión</b>  | <b>67</b> |
| <b>9. Conclusión</b>   | <b>77</b> |
| <b>10. Perspectivas</b>  | <b>77</b> |
| <b>11. Referencias bibliográficas</b>  | <b>78</b> |



## Índice de figuras

| No. |  | Pág. |
|-----|--|------|
| 1   | Mediadores inflamatorios en la patogénesis de la periodontitis                                 | 17   |
| 2   | Periodontitis inducida por LPS   | 23   |
| 3   | Efectos benéficos de los polifenoles sobre las enfermedades óseas                              | 31   |
| 4   | Obtención del extracto acuoso de <i>Spathodea campanulata</i> (EASC)                           | 34   |
| 5   | Grupo 1 solución salina (días: 1-3 del experimento)  | 36   |
| 6   | Grupo 2 EASC (días: 1-3 del experimento)   | 37   |
| 7   | Grupo 3 LPS (días: 1-3 del experimento)  | 37   |
| 8   | Grupo 4 coadministración de LPS+EASC (días: 1-3 del experimento)                               | 38   |
| 9   | Grupo 4 LPS (días: 1-3) -- EASC (días: 4-8)  | 39   |
| 10  | Secuencia del tratamiento de las muestras biológicas   | 40   |
| 11  | Programa automatizado de procesador de tejidos / Histokinete                                   | 41   |
| 12  | Procedimiento histológico  | 41   |
| 13  | Tinción de hematoxilina & eosina   | 42   |
| 14  | Ilustración esquemática de las regiones donde se realizó el conteo del infiltrado inflamatorio | 42   |
| 15  | Ilustración esquemática de las regiones donde se realizó el conteo de células osteoclasticas   | 45   |
| 16  | Radiografías (rayos-X)   | 47   |
| 17  | Estandarización de la descalcificación de muestras   | 48   |
| 18  | Inflamación gingival clínica   | 49   |
| 19  | Temperatura corporal de las ratas  | 51   |



|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| <b>20</b> | <b>Normalización de pesos</b>  | <b>52</b> |
| <b>21</b> | <b>Infiltrado inflamatorio</b>   | <b>55</b> |
| <b>22</b> | <b>Microfotografías de cortes histológicos (H&amp;E) de grupos 1-3</b>   | <b>56</b> |
| <b>23</b> | <b>Microfotografías de cortes histológicos (H&amp;E) de grupos 4 y 5</b> | <b>57</b> |
| <b>24</b> | <b>Osteoclastos teñidos mediante H&amp;E de grupos 2-5</b>               | <b>58</b> |
| <b>25</b> | <b>Osteoclastos teñidos mediante H&amp;E de grupos 1-5</b>               | <b>59</b> |
| <b>26</b> | <b>Medias y errores estándar del número de osteoclastos</b>              | <b>62</b> |
| <b>27</b> | <b>Microfotografías de cortes histológicos (TRAP) de grupos 1-3</b>      | <b>63</b> |
| <b>28</b> | <b>Microfotografías de cortes histológicos (TRAP) de grupos 4 y 5</b>    | <b>64</b> |
| <b>29</b> | <b>Cresta ósea alveolar (TRAP) de grupos 1-5</b>                         | <b>65</b> |
| <b>30</b> | <b>Microfotografías de osteoclastos multinucleados (TRAP)</b>            | <b>66</b> |



### Índice de tablas

| No. |   | Pág. |
|-----|---|------|
| 1   | Grado de inflamación gingival de Löe (1967) en los grupos 1, 3, 4 y 5             | 53   |
| 2   | Metabolitos secundarios en extracto acuoso de <i>Spathodea campanulata</i> (EASC) | 69   |



## RESUMEN

**Introducción:** La periodontitis es una enfermedad inflamatoria multifactorial asociada con biofilms de placa dental en disbiosis. Sus principales manifestaciones incluyen la pérdida de soporte del tejido periodontal, donde los osteoclastos se ven afectados, manifestándose radiográficamente por la pérdida de hueso alveolar, presencia de bolsas periodontales, sangrado gingival y pérdida de la adherencia epitelial. La periodontitis es un problema importante de salud pública debido a su alta prevalencia, en México se ha reportado una prevalencia del 67.2% y se presenta principalmente en adultos de 30 años en adelante. Los pacientes del sexo masculino y mayores de 45 años suelen tener mayor tendencia a padecer esta enfermedad.

**Objetivo general:** Evaluar el efecto de la administración oral del extracto acuoso de hojas de *Spathodea campanulata* sobre el número de osteoclastos en la periodontitis inducida por la administración de LPS.

**Material y métodos:** Se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley (N=30) a partir de 200g. Extracto acuoso de *Spathodea campanulata* (EASC). Se conformaron los siguientes grupos: 1 (control negativo I) con ratas sanas + solución salina (SS); grupo 2 (control negativo II) de ratas sanas con administración de EASC; grupo 3 tratado con LPS (control positivo); grupo 4 coadministración de LPS+EASC (días 1-3), y un grupo 5 con administración de LPS (días 1-3) seguido de EASC (días 4-8). La inyección de LPS se realizó en la papila interdental de la encía, entre el primer y segundo molar del maxilar y de la mandíbula. Se obtuvieron ambos maxilares de los animales para ser descalcificados en EDTA 10%. Se realizó un análisis histológico con cortes histológicos (7µm) teñidos con tinción histoquímica fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP), así como la técnica de hematoxilina & eosina en todas ratas de cada grupo.

**Resultados:** En el grupo 1 SS las estructuras anatómicas permanecieron sanas en todas las muestras, no hubo destrucción de la cresta ósea alveolar (CA), y se contabilizaron osteoclastos ( $0.66 \pm 0.13$ ). El grupo 2 EASC no mostró alteración en estructuras anatómicas de interés y se contabilizaron osteoclastos ( $4.66 \pm 0.34$ ). En el grupo 3 LPS hubo pérdida ósea notoria en la CA, y se contabilizaron osteoclastos ( $8 \pm 0.54$ ), presentando diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.01$ ) con todos los grupos. El grupo 4 no presentó daño notorio en CA, y se contabilizaron osteoclastos ( $3 \pm 0.49$ ). En el grupo 5 se observó una alteración en la CA, y se contabilizaron osteoclastos ( $5.16 \pm 0.56$ ).

**Conclusión:** La administración del EASC reduce la cantidad de células osteoclásticas en ratas con periodontitis inducida con LPS.

Palabras clave: Periodontitis, LPS, Rata, Galeana, *Spathodea campanulata*, Osteoclastos



## ABSTRACT

**Introduction:** Periodontitis is a multifactorial inflammatory disease associated with dental plaque biofilms in dysbiosis. Its main manifestations include loss of periodontal tissue support, where osteoclasts are affected, manifesting radiographically by alveolar bone loss, presence of periodontal pockets, gingival bleeding and loss of epithelial adhesion. Periodontitis is an important public health problem due to its high prevalence, in Mexico a prevalence of 67.2% has been reported and it occurs mainly in adults 30 years of age and older. Male patients over 45 years of age tend to have a greater tendency to suffer from this disease.

**Objective:** To evaluate the effect of oral administration of the aqueous extract of *Spathodea campanulata* leaves on the number of osteoclasts in periodontitis induced by the administration of LPS.

**Materials and methods:** Male Sprague-Dawley rats (N=30) from 200g were used. Aqueous extract of *Spathodea campanulata* (AESC). The following groups were formed: 1 (negative control I) with healthy rats + saline solution (SS); group 2 (negative control II) of healthy rats with administration of AESC; group 3 treated with LPS (positive control); group 4 co-administration of LPS+ AESC (days 1-3), and group 5 with administration of LPS (days 1-3) followed by AESC (days 4-8). The LPS injection was performed in the interdental papilla of the gingiva, between the first and second molars of the maxilla and mandible. Both jaws of the animals were obtained to be decalcified in EDTA 10%. Histological analysis was performed with histological sections (7 $\mu$ m) stained with tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) histochemical staining and with hematoxylin & eosin technique in all rats of each group.

**Results:** In group 1 SS, the anatomical structures remained healthy in all samples, there was no destruction of the alveolar bone crest (AC), and osteoclasts were counted (0.66  $\pm$  0.13). Group 2 AESC did not show alteration in anatomical structures of interest and osteoclasts were counted (4.66  $\pm$  0.34). In group 3 LPS there was notorious bone loss in the AC, with a total of 8  $\pm$  0.54 osteoclasts, presenting a statistically significant difference (P<0.01) with all groups. Group 4 did not present noticeable damage in AC, and osteoclasts (3  $\pm$  0.49) were counted. In group 5, an alteration in AC was observed, and osteoclasts were counted (5.16  $\pm$  0.56).

**Conclusion:** AESC administration reduces the number of osteoclastic cells in rats with LPS-induced periodontitis.

**Keywords:** Periodontitis, LPS, Rat, Galeana, *Spathodea campanulata*, Osteoclasts



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Antecedentes

#### 1.1.1 Periodontitis

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria multifactorial asociada con biofilms de placa dental en disbiosis (Papapanou et al., 2018; Tonetti et al., 2018). La formación de biofilm de placa dental en el margen gingival es un factor iniciador de la periodontitis, caracterizada por la destrucción progresiva del aparato de soporte del diente (Botero y Bedoya, 2010). Sus principales manifestaciones incluyen la pérdida de soporte del tejido periodontal, manifestado mediante la pérdida de la adherencia epitelial (unión cemento-esmalte), radiográficamente por pérdida de hueso alveolar, presencia de bolsas periodontales y sangrado gingival (Papapanou et al., 2018; Tonetti et al., 2018; Greenstein, 1984).

La periodontitis es un problema importante de salud pública debido a su alta prevalencia, en México se ha reportado una prevalencia del 67.2% y se presenta principalmente en adultos de 30 años en adelante (Rojo et al., 2011). Los pacientes del sexo masculino y mayores de 45 años suelen tener mayor tendencia a padecer esta enfermedad periodontal. Del mismo modo, los individuos con enfermedad cardiovascular tienen mayor prevalencia (27%) de periodontitis entre todos aquellos con alguna enfermedad sistémica como diabetes mellitus (Plaza y Soto, 2014). La periodontitis es capaz de provocar pérdida de dientes, afectando negativamente la función de masticación, estética, afecta la calidad de vida, y podría ser una fuente de desigualdad social. Representa una proporción sustancial de edentulismo y disfunción masticatoria, da como resultado costos significativos de atención dental y puede tener un impacto negativo en la salud general (Papapanou et al., 2018; Tonetti et al., 2018).

Dentro de las principales especies bacterianas involucradas en la periodontitis predominan bacterias Gram-negativas anaerobias como, *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Campylobacter rectus*, *Eubacterium nodatum*, *Peptostreptococcus micros*, *Streptococcus intermedius*, *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema denticola* (Zhang et



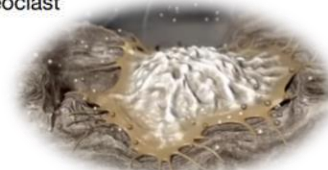
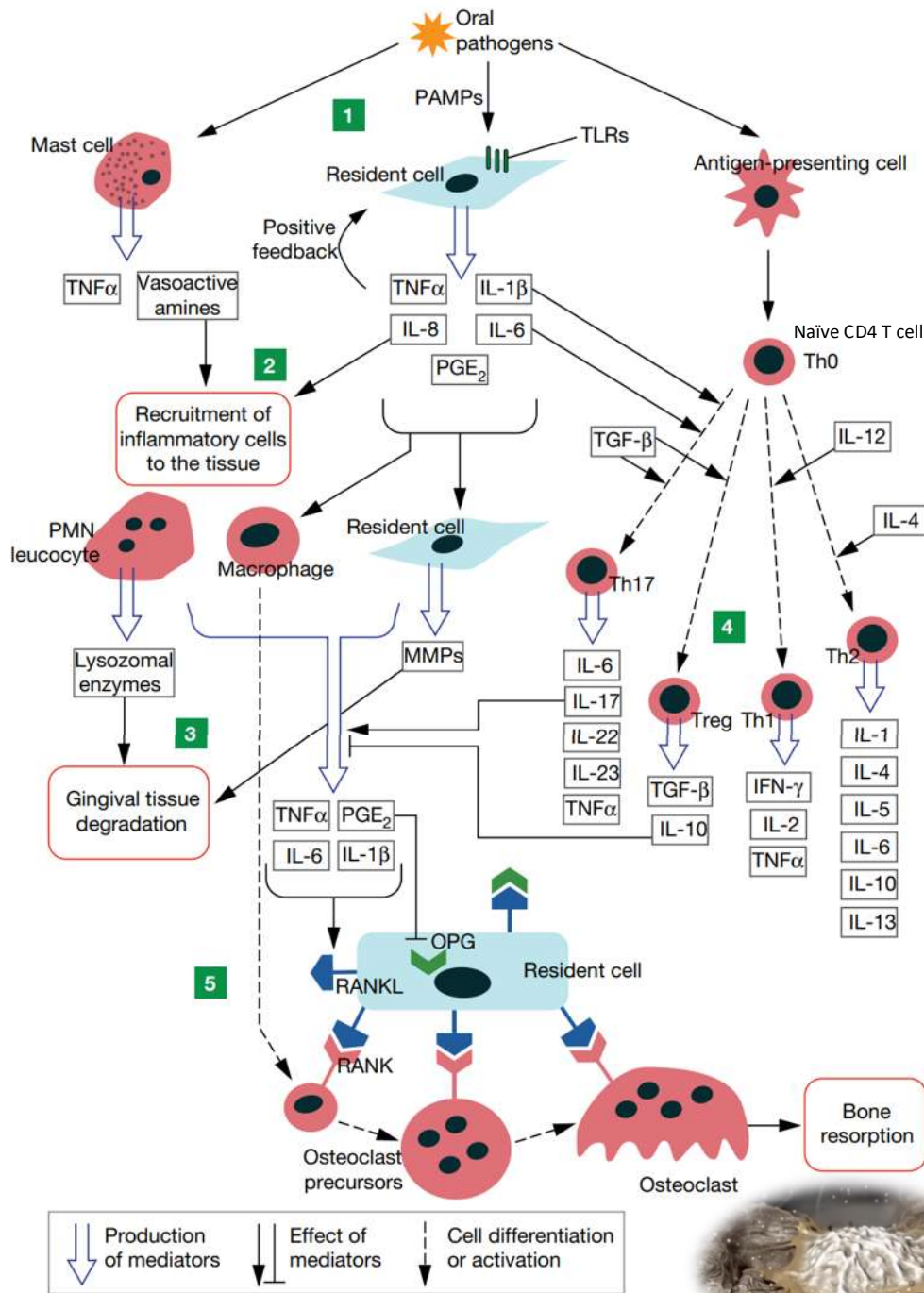
al., 2017; Zhou y Li, 2015; Popova et al., 2013; Darot, 2014). Estas bacterias patógenas producen metabolitos que resultan ser factor importante en la destrucción de los tejidos del periodonto (Al-Hebshi y Skaug, 2006). Tienen capacidad de producir leucotoxinas, endotoxinas (lipopolisacáridos), colagenasas, citotoxinas, epiteliotoxinas, bacteriocinas, proteasas, gingipaínas, fosfolipasas, fosfatasa alcalina, hemolisinas, fimbrias, hemaglutininas, y metaloproteinasas de la matriz extracelular (Ramos et al., 2010; Sriraman et al., 2014; Ramos et al., 2011; Mysak et al., 2014). Como consecuencia se genera un proceso de destrucción celular continuo, afectando cada vez más los tejidos de soporte que rodean al órgano dental hasta llegar a la pérdida dentaria si no es retirada la etiología microbiana.

La periodontitis comienza cuando las bacterias producen factores de virulencia y entran en contacto con las células del epitelio del surco gingival, principalmente las células del epitelio de unión (EU) son las que producen defensinas y citocinas proinflamatorias (Soud et al., 2018; Papapanou et al., 2018; Tonetti et al., 2018). Las defensinas son péptidos antimicrobianos que dañan la superficie de las bacterias, permitiendo su eliminación. Pero son de gran importancia la producción de IL-1 y TNF- $\alpha$ , generando cambios a nivel vascular, incrementan el calibre de los vasos sanguíneos e inducen la expresión de proteínas de adhesión celular. Adicionalmente, producen IL-8, una citocina con actividad quimiotáctica para polimorfonucleares (PMNs). De esta forma, los PMNs son atraídos al sitio donde se acumulan las bacterias, salen de los vasos sanguíneos y se acumulan en el tejido conectivo adyacente al surco causando alteración del tejido. Muchos PMNs se abren paso por los espacios intercelulares del EU y salen al surco donde se degranulan, liberando consigo especies reactivas del oxígeno (ROS) y enzimas como catepsina G, lactoferrina, defensinas, mieloperoxidasa, metaloproteinasas (MMP-8) y serina proteasas (Sriraman et al., 2014; Ramos et al., 2011; Mysak et al., 2014). Si bien todos estos reactivos biológicos son nocivos para las bacterias, también lo pueden ser para los tejidos periodontales y algún daño tisular microscópico puede esperarse. No obstante, el agente infeccioso es controlado en la mayoría de los casos, el estímulo disminuye y se establece un balance de la respuesta inmune. Después de estimulada la respuesta inmune innata, desencadena la respuesta inmune adaptativa y aparecen en el



tejido conectivo linfocitos T CD4 y linfocitos B, ayudando a resolver el proceso inflamatorio. La estimulación de linfocitos toma entre 5 y 7 días en alcanzar su mayor activación. Por lo tanto, una buena respuesta innata es fundamental para mantener la salud periodontal. Los linfocitos T CD4 producen citocinas (IFN, IL-2) que promueven una mejor actividad de macrófagos y co-estimulan a los linfocitos B a producir anticuerpos tipo IgG e IgA neutralizantes (Botero y Bedoya, 2010; Al-Hebshi y Skaug, 2006; Ramos et al., 2010; Sriraman et al., 2014). El resultado es una respuesta inmune que controla los microorganismos que se están acumulando en el surco periodontal, de forma silenciosa y sin expresar signos clínicos inflamatorios evidentes a simple vista. A medida que progresa el proceso inflamatorio éste se vuelve crónico y comienza la degradación de los tejidos de soporte, dando como resultado la formación de la bolsa periodontal, pérdida de inserción clínica y pérdida ósea (Sriraman et al., 2014; Ramos et al., 2011; Mysak et al., 2014).

La respuesta del huésped en la periodontitis es una interacción compleja entre numerosos tipos de células y mediadores inflamatorios, algunos de los cuales se ilustran en la figura 1. (1) En la inmunidad innata, los componentes de los patógenos presentes en el biofilm oral, como el LPS, estimulan a los mastocitos para que liberen aminas vasoactivas y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) preformado y provocan la liberación de mediadores inflamatorios en las células residentes del tejido gingival. (2) Mediante la acción de los mediadores liberados, se reclutan células inflamatorias en el tejido. (3) Los leucocitos PMN liberan enzimas lisosomales y, en respuesta al medio de mediadores inflamatorios, aumentan los niveles de MMP. Las MMP y las enzimas lisosomales contribuyen a la degradación del tejido gingival. (4) Los linfocitos y los macrófagos invaden el tejido. Las células presentadoras de antígeno activan las células Th0. Las citocinas producidas por células T pueden aumentar o inhibir la producción de mediadores inflamatorios. (5) Las citocinas y la prostaglandina E2 (PGE2) afectan la expresión del ligando activador del receptor del factor nuclear- $\kappa$ B (RANKL) y la osteoprotegerina (OPG), lo que resulta en la formación y activación de osteoclastos capaces de degradar el hueso alveolar (Yucel-Lindberg et al., 2013) (Fig. 1).



**Figura 1. Mediadores inflamatorios en la patogénesis de la periodontitis.**

IFN- $\gamma$ , interferón- $\gamma$ ; IL, interleucina; LPS, lipopolisacárido; MMP, metaloproteinasas de la matriz; OPG, osteoprotegerina; PAMPs, patrones moleculares asociados a patógenos; PGE<sub>2</sub>, prostaglandina E<sub>2</sub>; PMN, leucocitos polimorfonucleares; RANK, receptor activador del factor nuclear- $\kappa$ B; RANKL, ligando activador del receptor del factor nuclear- $\kappa$ B; TGF- $\beta$ , factor de crecimiento transformante  $\beta$ ; TLR, receptores tipo toll;  $TNF\alpha$ , factor de necrosis tumoral  $\alpha$ ; Treg, célula T reguladora. Tomada y modificada de Yucel-Lindberg *et al.*, 2013.



### **1.1.2 Clasificación de enfermedades periodontales**

De acuerdo con la nueva clasificación del Taller Mundial 2017 sobre la Clasificación de las Enfermedades y Afecciones Periodontales y Periimplantarias (Tonetti et al., 2018), la periodontitis se clasifica de la siguiente manera:

En el contexto del Taller Mundial 2017 se tomó la decisión de juntar la periodontitis agresiva y crónica en una misma categoría y, al mismo tiempo, caracterizarla con un sistema de calificación por *estadios* y *grados*. Los estadios dependerán de la gravedad de la enfermedad y la complejidad prevista de su tratamiento, y los grados informarán sobre el riesgo de progresión de la enfermedad (Tonetti et al., 2018).

Para la nueva definición, se ha propuesto que, en el contexto de la atención clínica, un paciente se considera un “caso de periodontitis” si presenta:

1. Pérdida de inserción clínica (CAL) interdentaria en dos o más dientes no adyacentes.
2. CAL vestibular  $\geq 3$  mm con bolsas periodontales  $> 3$  mm en dos o más dientes.

Se enumeraron una serie de excepciones, para evitar situaciones en las que la pérdida de inserción no estaba asociada a periodontitis, entre las que se incluyen: recesión gingival por razones traumáticas, caries en la región cervical, CAL en la cara distal de un segundo molar (posiblemente asociada a una malposición o extracción del tercer molar), lesión endodóntica o fractura radicular vertical.

Según la fisiopatología, se han identificado tres formas distintas de periodontitis:

1. Periodontitis necrosante.
2. Periodontitis como manifestación directa de enfermedades sistémicas.
3. Periodontitis.

### **1.1.3 Tratamiento de la periodontitis**

De acuerdo con la Guía de Práctica Clínica (GPC) Nacional sobre el Diagnóstico y Tratamiento de Focos Infecciosos Bacterianos en la Cavity Bucal 2011 (Secretaría de Salud, 2011), menciona que la placa dentobacteriana tiene exopolisacáridos que impiden la acción antimicrobiana de los antibióticos, por lo que se recomienda para la prevención



de la periodontitis crónica el desbridamiento mecánico (cepillado regular, uso de hilo dental y la instrumentación por el odontólogo), ya que son las formas más efectivas de eliminar la placa dentobacteriana. Todas las modalidades del tratamiento para la periodontitis crónica empiezan dando instrucciones de higiene bucal al paciente con el fin de asegurar la eliminación diaria de la placa dentobacteriana, la cual es la principal responsable de la enfermedad. Por otra parte, la Guía de Práctica Clínica (GPC) Nacional sobre el Diagnóstico y Manejo de los Problemas Bucales en el Adulto Mayor 2012 (Instituto Mexicano del Seguro Social, 2012), indican que los objetivos primarios del tratamiento periodontal son reducir y eliminar la inflamación resultante de la periodontitis y detener la progresión de la enfermedad. Para llevarlos a cabo, se requiere de la eliminación e interrupción de la acumulación bacteriana alrededor de la dentición. Esta guía menciona que, dentro de la prevención de la periodontitis crónica, tanto el médico como el odontólogo deben de recomendar a todo adulto mayor, cepillado dental, uso de hilo dental, pulido y profilaxis, y dependiendo del estado de la enfermedad periodontal, enjuagues bucales con clorhexidina 0.12% dos veces al día para pacientes dependientes. Además, la Guía de Práctica Clínica Internacional de la Asociación Dental Americana (ADA) 2015, sobre el Tratamiento no Quirúrgico de la Periodontitis Crónica Mediante Raspado y Alisado Radicular con o sin Adjuntos (Smiley et al., 2015a; Smiley et al., 2015b), menciona que el tratamiento de primera elección para la periodontitis es el raspado y alisado radicular sin la utilización de agentes antimicrobianos. En pacientes con periodontitis moderada y severa se recomienda considerar el uso de doxiciclina por vía sistémica en dosis de 20mg dos veces al día durante 3 a 9 meses (Smiley et al., 2015a; Smiley et al., 2015b).

Revisando y analizando las distintas guías nacionales e internacionales de práctica clínica odontológica, dentro de los planes de tratamiento para las enfermedades periodontales no se encuentran establecidos protocolos estandarizados en donde utilicen principios activos antimicrobianos y biocompatibles para disminuir la activación de osteoclastos y lograr un mejor control de la periodontitis.

La terapia periodontal consiste en retirar mecánicamente los diversos biofilms de placa dental, apoyándose normalmente con una irrigación continua con solución salina al 0.9%.



En la literatura se reporta tradicionalmente el uso de la solución salina como irrigante en los procesos sépticos y quirúrgicos, el cual se ha aplicado por más de 100 años, siendo la solución más utilizada sólo por el hecho de tener un pH en rango de tolerancia y un adecuado arrastre mecánico (Paz et al., 2011). Sin embargo, la solución salina presenta limitaciones importantes en su aplicación como irrigante en la terapia periodontal, debido a que esta enfermedad se caracteriza por la adhesión bacteriana, desarrollo de biofilms, así como la liberación de muchos metabolitos enzimáticos con actividad proteolítica. Como características fisicoquímicas presenta un pH ligeramente ácido de 5.5-6.0, contiene 0.900 g de cloruro de sodio (NaCl), de los cuales comprende de 154 ppm de sodio y 154 ppm de cloro, causando leve irritabilidad tisular como irrigante. Carece de efecto antimicrobiano, analgésico, antiinflamatorio, no propicia la cicatrización y regeneración tisular, y no influye en la inhibición de osteoclastos (Paz et al., 2011).

Convencionalmente, la instrumentación subgingival mecánica, es decir, el raspado y alisado radicular, ha sido la principal modalidad de tratamiento en la periodontitis mediante la cual la mayoría de las condiciones periodontales se pueden manejar de manera efectiva (Annie et al., 2015). Sin embargo, el raspado y alisado radicular tiene sus limitantes debido a las dificultades técnicas de acceso a las bolsas periodontales profundas y variación de estructuras anatómicas de la raíz dental para la instrumentación. Por lo tanto, el uso de métodos mecánicos convencionales sólo causa una disminución temporal de bacterias y endotoxinas en los niveles subgingivales sin detener el proceso patológico, resultando en una posible recolonización de microorganismos patógenos en las áreas tratadas y una continua pérdida ósea por activación acelerada de osteoclastos en el hueso alveolar (Smiley et al., 2015a; Smiley et al., 2015b).

Los estudios realizados en las últimas dos décadas han reportado mejorías en términos de parámetros clínicos y microbiológicos con enfoques quimioterapéuticos para complementar el tratamiento periodontal mediante la aplicación de agentes antisépticos, como el gluconato de clorhexidina en concentraciones desde 0.12 a 0.2% (Giannelli et al., 2008; Stabholz et al., 1998), peróxido de hidrógeno al 3% (Sahebiam et al., 2011), povidona yodada al 10% (Sindhura et al., 2017), clorhidrato de tetraciclina de 10-50



mg/mL (Stabholz et al., 1998), y agua ozonizada (Giannelli et al., 2008). A pesar de que algunos de estos principios activos presentan efecto antimicrobiano frente a ciertas especies bacterianas periodontopatógenas, resultan ser altamente citotóxicos a células de tejidos periodontales, desfavoreciendo la regeneración tisular para una adecuada cicatrización (Liu et al., 2018; Giannelli et al., 2008; Bax et al., 1992). La aplicación de gluconato de clorhexidina (CHX) se considera el tratamiento antiséptico estándar de oro, siendo el principio activo ampliamente más utilizado y probado, especialmente por su alta capacidad bactericida, y su eficacia en el tratamiento de infecciones orales (Giannelli et al., 2008). Sin embargo, existen evidencias que demuestran que este compuesto también puede tener efectos adversos en tejidos y células orales en concentraciones utilizadas clínicamente (Liu et al., 2018). De hecho, varios estudios han informado que la CHX tiene actividad citotóxica en el hueso alveolar cultivado y células epiteliales gingivales, induce una reducción en la proliferación de fibroblastos gingivales humanos y reduce la producción de proteínas de colágeno y no colágeno en ciertas concentraciones. Tiene poco efecto sobre la proliferación celular, evita la unión de fibroblastos a las superficies de las raíces dentales e interfiere con la regeneración periodontal (Liu et al., 2018; Torres et al., 2013; Giannelli et al., 2008; Alley et al., 1991). Debido a estos antecedentes es importante realizar investigaciones clínicas empleando nuevos principios activos con efectos antimicrobianos y biocompatibles, con la finalidad de mejorar la calidad de salud periodontal.

#### **1.1.4 Periodontitis en modelo animal**

Es imprescindible realizar estudios preclínicos para en el futuro poder considerar el uso de nuevos principios activos terapéuticos en el ser humano. Como las interacciones entre varios factores y las respuestas del huésped no se pueden observar en modelos *in vitro*, son necesarios experimentos realizados en modelos animales *in vivo* (Teixeira et al., 2017). Por lo tanto, estos medicamentos se prueban o experimentan en modelos animales antes de usarlos en humanos para determinar su eficacia y seguridad (Banu y Ramamurthy, 2018). Los animales que se utilizan deben producir una similitud con las estructuras anatómicas y fisiológicas humanas. Estas similitudes también ayudarán a predecir la seguridad clara de los medicamentos en humanos (Meyerholz et al., 2020).

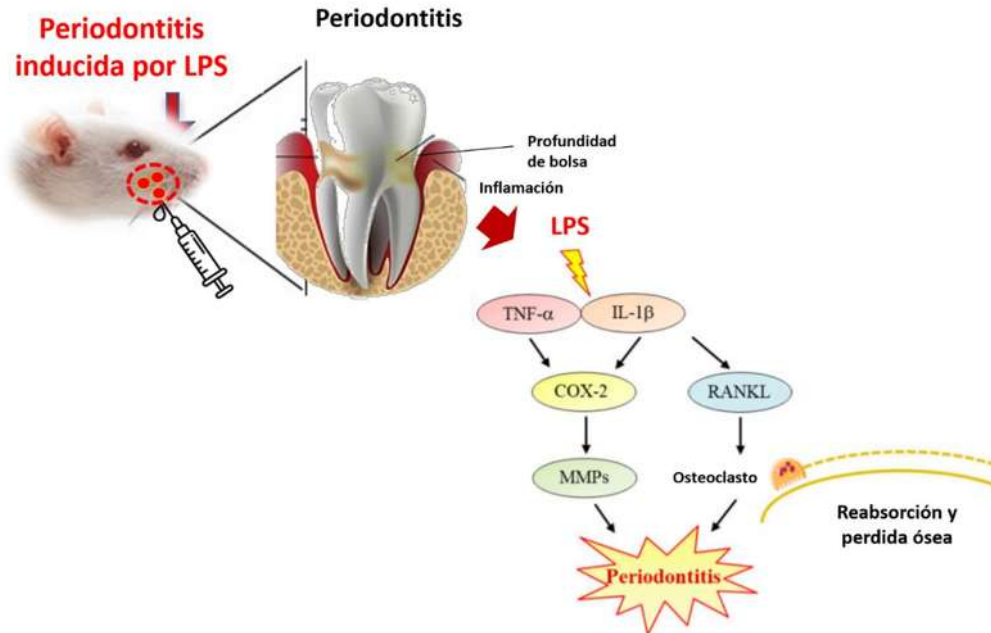


Se comprueba que los animales seleccionados para la investigación periodontal tengan una estrecha relación con la anatomía y fisiología humana. Los animales más utilizados para inducir y tratar la periodontitis con métodos más nuevos son las ratas, debido a que presentan estructuras dentales similares al humano, su pequeño tamaño facilita su manipulación, fácil almacenamiento y no causa destrucción en grande escala (Banu y Ramamurthy, 2018). Estos animales se inducen primero con la enfermedad, y luego se experimentan con los tratamientos más nuevos para analizar su efecto. Las enfermedades periodontales en ratas son menos comparadas a su aparición natural en humanos, por lo que son inducidas por inyección de lipopolisacárido (LPS), inoculación bacteriana o ligadura alrededor de los dientes (Jeong-Hyon et al., 2020; Lee et al., 2019; Banu y Ramamurthy, 2018; Struillou et al., 2010). Con respecto a la raza, las ratas macho Sprague-Dawley son comúnmente más utilizadas. Aunque todavía hay poco consenso sobre qué variedades son las más adecuadas para experimentos con animales, varios estudios han demostrado que las ratas Sprague-Dawley son más sensibles a los cambios en el metabolismo que las ratas Wistar (Garg et al., 2018). En estudios con animales, generalmente se prefieren los animales machos en relación a las hembras debido a las diferencias sexuales en el estado hormonal o la expresión genética. Los efectos de las hormonas femeninas, como el estrógeno, sobre el metabolismo óseo, es una posible consideración en la selección de ratas macho para experimentos de periodontitis (Jeong-Hyon et al., 2020).

### **1.1.5 Periodontitis inducida con LPS en modelo animal de rata**

Se han utilizado varios enfoques para inducir la inflamación periodontal en ratas. Actualmente, se emplea ampliamente la técnica de la administración de lipopolisacárido (LPS) bacteriano de *Escherichia coli* (*E. coli*) en la encía de la rata, creando una patología periodontal aguda y severa (Jeong-Hyon et al., 2020; Kantarci et al., 2015; Zhang et al., 2008). Este modelo tiene las ventajas de generar un rápido proceso de enfermedad y no requiere el crecimiento de bacterias ni un extenso manejo manual de las estructuras dentales. Por lo tanto, se usa especialmente para probar la eficacia de varios principios activos para resolver la inflamación (Oka et al., 2012). Debido a que la patología de la periodontitis es causada principalmente por bacterias gram negativas, la administración

de LPS, un factor de virulencia de prácticamente todos los organismos gram negativos subgingivales, tiene la ventaja de obtener una respuesta inflamatoria relativamente controlada cuando se inyecta en el tejido periodontal en ratas (Jeong-Hyon et al., 2020) (Fig. 2).



**Figura 2. Periodontitis inducida por LPS.**

La periodontitis inducida por la administración de LPS de *Escherichia coli* se desencadena por la vía inflamatoria de las citocinas y destruye el tejido gingival. Las citocinas activan a los osteoclastos para promover la reabsorción del hueso alveolar, y la destrucción del hueso alveolar provoca la pérdida de órganos dentales.

Tomada y modificada de Gugliandolo et al., 2018; Lee et al., 2019.

Los LPS son los principales componentes lipídicos de la membrana externa de la mayoría de las bacterias gram negativas. Forman una barrera de permeabilidad que protege a estas bacterias de compuestos nocivos en el medio ambiente (Putker et al., 2015). Además, son moléculas de señalización importantes para el sistema inmunológico innato (Ambili et al., 2017; Ribeiro-Santos et al., 2019). El LPS, frecuentemente referido como endotoxina, induce infiltración de leucocitos polimorfonucleares, edema y dilatación vascular en tejidos periodontales inflamados (Liljestrand et al., 2017). El tejido duro puede verse afectado por LPS a través de la producción de mediadores inflamatorios como interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), factor



de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) o prostaglandinas, estimulando osteoblastos y subsecuentemente ocasionando la activación de los osteoclastos (Dumitrescu et al., 2004; Albiero et al., 2015).

También se ha postulado que el LPS puede activar los osteoclastos a través de un efecto directo del LPS sobre los leucocitos circulantes, sin la participación de los osteoblastos (Dumitrescu et al., 2004). Las bacterias o sus productos, como el LPS, se unen a los receptores de los monocitos o linfocitos B y estimulan una serie de mediadores inflamatorios. La producción de estos factores puede mejorar la capacidad del ligando de osteoprotegerina (OPGL) producido por leucocitos para inducir osteólisis. Por el contrario, las hormonas calciotrópicas estimulan la osteólisis al unirse a receptores afines en los osteoblastos en lugar de a las células mononucleares. Aunque ambos procesos parecen estimular en última instancia la formación de células similares a los osteoclastos a través de la producción de OPGL, la cascada de mediadores, así como los tipos de células que participan, pueden ser diferentes. Por tanto, bajo estimulación bacteriana pueden inducirse simultáneamente vías dependientes e independientes de osteoblastos, mientras que con hormonas osteotróficas sólo pueden ser operativas las vías dependientes de osteoblastos (Jiang et al., 2002).

Aunque *E. coli* no es un microorganismo oral habitual, existe evidencia de que el LPS derivado de esta bacteria tiene mayor potencia para estimular la liberación de mediadores inflamatorios en poco tiempo, en relación con bacterias periodontopatógenas como *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) (Zhang et al., 2008), donde es más tardado para generar la enfermedad periodontal. El LPS de *E. coli* estimula la producción de IL-6 varias veces en células de ligamento periodontal humanas. Por otro lado, el LPS de *P. gingivalis* no tiene ningún efecto sobre la producción de IL-6 de células de ligamento periodontal, lo que sugiere que el LPS derivado de *E. coli* es un estimulador más potente de la producción de IL-6 de células en tejido periodontal que el LPS de *P. gingivalis* (Nebel et al., 2013). Esto demuestra que LPS de *E. coli* causa una estimulación mucho más activa para generar la enfermedad periodontal (Keong et al., 2020).



### **1.1.6 Plantas medicinales en el tratamiento de la periodontitis**

Los productos a base de plantas medicinales también se han utilizado durante cientos de años para mantenimiento de la higiene bucal y control de enfermedades periodontales asociadas a placa dentobacteriana. La cúrcuma, el neem, el aloe vera, el clavo, la canela, entre otros, se encuentran entre los productos herbales comunes que se usan para este propósito. Entre estos, la cúrcuma se ha utilizado tradicionalmente como remedio para enfermedades de la piel, el estómago y el hígado. Dado que la cúrcuma tiene propiedades antimicrobianas, antioxidantes, astringentes y otras propiedades útiles, también puede ser útil en odontología (Cikrikci et al., 2008).

#### **1.1.6.1 Curcuma longa**

En un estudio clínico realizado por Sharma & Kalsi 2016, atendieron a 20 personas que presentaban características clínicas de gingivitis inducida por placa y periodontitis leve. Se realizaron tres grupos aleatoriamente en boca de cada paciente seleccionado para el estudio. El grupo 1 fue tratado únicamente con raspado y alisado radicular (RAR). El grupo 2 se trató con RAR más una aplicación tópica de formulación oral de *Curcuma longa* durante 2 semanas. El grupo 3 se trató solo con la aplicación tópica de la formulación oral de extracto de *Curcuma longa* durante 2 semanas. Se evaluó en cada grupo el índice gingival, el índice de sangrado del surco y el índice de placa antes y después del tratamiento. Sus resultados mostraron una mejora estadísticamente significativa con respecto a todos los parámetros clínicos en los tres grupos. Sin embargo, el grupo 2 mostró la mejoría máxima ( $P < 0.001$ ), seguido del grupo 2 ( $P < 0.001$ ) y el grupo 3 ( $P < 0.05$ ). Por lo tanto, concluyeron que, la formulación oral que contiene extracto de *Curcuma longa* es eficaz en el tratamiento de enfermedades periodontales infecciosas e inflamatorias tempranas no solo cuando se usa como complemento de RAR sino también cuando se usa sola (Sharma & Kalsi 2016).

#### **1.1.6.2 Aloe vera**

Por otro lado, también se ha utilizado el aloe vera para tratar enfermedades periodontales asociadas a placa. El aloe vera es una planta que pertenece a la familia Aloeaceae



(subfamilia de las *Asphodelaceae*) (Moghaddam et al., 2017). Entre más de 400 especies de aloe, el aloe vera es la especie más aceptada para diversos fines médicos, cosméticos y nutracéuticos. La composición del Aloe vera es compleja, ya que consta de 75 ingredientes diferentes que incluyen vitaminas, minerales, enzimas, azúcares, antraquinonas o compuestos fenólicos, lignina, saponinas, esteroides, aminoácidos y ácido salicílico (Sampath Kumar et al., 2010). Las antraquinonas son los compuestos fenólicos que se encuentran en el Aloe vera, y los Aloes consisten en antraquinonas libres y sus derivados: barbaloina, isobarbaloina, antrona-c-glucósidos y cromonas (Reynolds & Dweck 1999).

En un estudio llevado a cabo por Abdelmonem et al., 2014, evaluaron los efectos clínicos y microbiológicos del gel disponible comercialmente que contiene Aloe vera como terapia adyuvante al raspado y alisado radicular (RAR) en el tratamiento de la periodontitis crónica. Los investigadores seleccionaron un total de 40 pacientes con periodontitis crónica leve y moderada para contribuir en el estudio. El tratam se realizó con un diseño de boca dividida en el que el paciente recibió un RAR completo además de la aplicación de gel de aloe vera en el lado derecho o izquierdo de la dentición y se realizó un RAR completo sólo en el lado contralateral de la misma dentición. Los resultados que obtuvieron, mostraron que los sitios tratados con RAR+Gel de aloe vera 100% concentrado presentaron mayores reducciones en el recuento de *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia* que los sitios tratados solo con RAR. Asimismo, la diferencia entre el control y el lado de prueba fue estadísticamente significativa en los parámetros clínicos. Por lo tanto, concluyeron los investigadores que el RAR fue eficaz para mejorar los parámetros clínicos y microbiológicos en pacientes con periodontitis crónica. El RAR más la aplicación del gel de Aloe vera (100% concentrado) presentó efecto bactericida en la bolsa periodontal de pacientes con periodontitis crónica, por lo que el gel de aloe vera fue eficaz para el tratamiento de la periodontitis como una terapia complementaria pero que no reemplaza la intervención mecánica (RAR) (Abdelmonem et al., 2014).



### **1.1.7 Planta Galeana (*Spathodea campanulata*)**

Las plantas se han utilizado como una de las fuentes importantes para el tratamiento de diversas enfermedades de los seres humanos desde la antigüedad. Numerosas plantas se mencionan en diferentes sistemas tradicionales de medicina, entre ellas *Spathodea campanulata* es una de las plantas medicinales importantes. Se ha informado que *Spathodea campanulata* posee actividad antiinflamatoria, antimicrobiana, analgésica, antidiabética, anticonvulsiva, antimalaria y anti-VIH (Wagh y Buttle, 2018; Boniface, 2017; Vijayasanthi et al., 2015; Niyonzima et al., 1999; Makinde et al., 1988). El cribado fitoquímico muestra la presencia de varios metabolitos secundarios como alcaloides, taninos, flavonoides, glucósidos y esteroides (Zaheer et al., 2011; Wagh y Buttle, 2018). La especie *Spathodea campanulata* pertenece a la familia Bignoniaceae y es originaria de África. A menudo se usa en jardinería en áreas tropicales y subtropicales, incluida Sudamérica y México (Brindah et al., 2012; Torres-Estrada et al., 2010). Esta planta también se llama árbol de tulipán africano o árbol de llama, *Spathodea campanulata* P. beauv es su nombre científico (Martin et al., 2019). Es una sola especie del género monotípico *Spathodea* en la familia de plantas con flores Bignoniaceae que se compone de alrededor de 800 especies distribuidas en 112 géneros (Wagh y Buttle, 2018). La planta *Spathodea campanulata* tiene efecto antimicrobiano frente a cepas bacterianas gram negativas y gram positivas como *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas sps*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis*, *Vibrio colera*, y actividad antifúngica contra *Candida albicans* (Rajesh et al., 2010; Teinkela et al., 2016). Los modelos experimentales antimicrobianos realizados fueron en microorganismos aislados de ambiente clínico procedentes de orina, pus y heces fecales de pacientes hospitalizados. Los ensayos antimicrobianos fueron realizados mediante análisis de dilución en microcaldo y mediante el método de difusión en disco de Kirby-Bauer. Estos estudios no reportan ni evalúan el mecanismo de acción antimicrobiano específico de los extractos utilizados de *Spathodea campanulata* (Rajesh et al., 2010; Teinkela et al., 2016).



Sin embargo, aunque estas bacterias antes mencionadas no están implicadas en causar la periodontitis, al tener la *Spathodea campanulata* actividad contra gram positivas y gram negativas podría presentar efecto antibacteriano contra bacterias periodontopatógenas, lo cual tendrá que ser estudiado a futuro para corroborarlo.

Asimismo, *Spathodea campanulata* presenta propiedades antiinflamatorias que son dosis dependiente (Ilodigwe y Akah, 2009). Se han realizado diversos estudios en modelo animal en ratas y ratón para valorar el efecto antiinflamatorio (sin reportar el mecanismo de acción) utilizando extracto de metanol y extracto acuoso de *Spathodea campanulata* (250, 500, 750 and 1000 mg/kg) por vía oral. Los extractos demostraron una actividad antiinflamatoria significativa contra la inflamación aguda en la pata del roedor, inducida por carragenina (Ilodigwe y Akah, 2009; Vijayasanthi et al., 2015).

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De acuerdo con las Guías de Práctica Clínica Nacionales (Secretaría de Salud México, 2011; Instituto Mexicano del Seguro Social, 2012) e Internacionales de la Asociación Dental Americana (ADA) 2015 (Smiley et al., 2015a), recomiendan que el tratamiento de primera elección para la periodontitis crónica es el raspado y alisado radicular sin la aplicación de agentes antimicrobianos y antiinflamatorios y, en ocasiones específicas se recomienda considerar el uso de doxiciclina por vía sistémica (Smiley et al., 2015b). Debido al poco avance en el tratamiento de la periodontitis durante varias décadas, muchos estudios han intentado identificar nuevas terapias complementarias. Actualmente, los productos naturales han sido de interés, ya que se ha identificado que son eficaces contra muchas enfermedades y producen menos efectos secundarios (Ara et al., 2018). Para evaluar la posibilidad del uso de extractos naturales como tratamiento para la periodontitis, se necesitan estudios bien diseñados. La aplicación del extracto de *Spathodea campanulata* en modelo animal ha sido valorado ampliamente para evaluar su efecto antimicrobiano (Teinkela et al., 2016), antiinflamatorio (Vijayasanthi et al., 2015) y biocompatible a concentraciones bajas (Banu y Ramamurthy, 2018). Sin embargo, no hay antecedentes reportados sobre la aplicación del extracto acuoso de la planta *Spathodea campanulata* en ningún modelo animal donde se valore el efecto sobre la



diferenciación de osteoclastos en los alveolos dentales en ratas con periodontitis, inducida con LPS. Se sabe que la planta Galeana (*Spathodea campanulata*) es antimicrobiana frente a bacterias gram negativas como gram positivas (Teinkela et al., 2016; Rajesh et al., 2010), por lo tanto, es conveniente valorar su efecto en la periodontitis debido a que es causada principalmente por bacterias gram negativas y en menor cantidad por gram positivas. La Galeana posee altas concentraciones de metabolitos secundarios: polifenoles ( $24.65 \pm 11.05$  EF/g EF: Equivalentes de floroglucinol), fenoles:  $1373.23 \pm 52.91$  mg GAE/g GAE: Equivalentes de ácido gálico, flavonoides:  $190.41 \pm 0.39$  QRE/g QRE: Equivalentes de quercertina (Escamilla-Barrera, 2019).

Los polifenoles son fitoquímicos que se encuentran comúnmente en el reino vegetal, cuyos múltiples efectos biológicos han sido reportados como protectores contra enfermedades crónicas, incluyendo enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares, cáncer y osteoporosis (Rasouli et al., 2017). Los efectos benéficos de los compuestos fenólicos se deben principalmente a sus propiedades antioxidantes, ya que pueden actuar como captadores de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Orozco-Montes et al., 2019), pero también a su interacción con cascadas de señalización intracelular como el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinasa (PI3K), proteína quinasa B (PKB)/Akt, tirosina quinasas, proteína quinasa C (PKC) y proteína quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Larsen et al., 2010), que conducen a actividades antiinflamatorias, quimiopreventivas y quimioterapéuticas.

Dependiendo del número de anillos de fenol que contengan y de los radicales unidos a ellos, los polifenoles se pueden dividir en diferentes grupos: ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, taninos, cumarinas y lignanos (Rasouli et al., 2017). Dado que la estructura química de un compuesto está relacionada con su actividad biológica/toxicológica, el modo de acción de los polifenoles puede ser diferente, dependiendo también de la concentración y del sistema biológico que se utilice (Khlebnikov et al., 2007).

Sin embargo, es bastante difícil establecer cuantitativamente los beneficios que brindan los polifenoles, debido al conocimiento limitado de su biodisponibilidad. En general, el

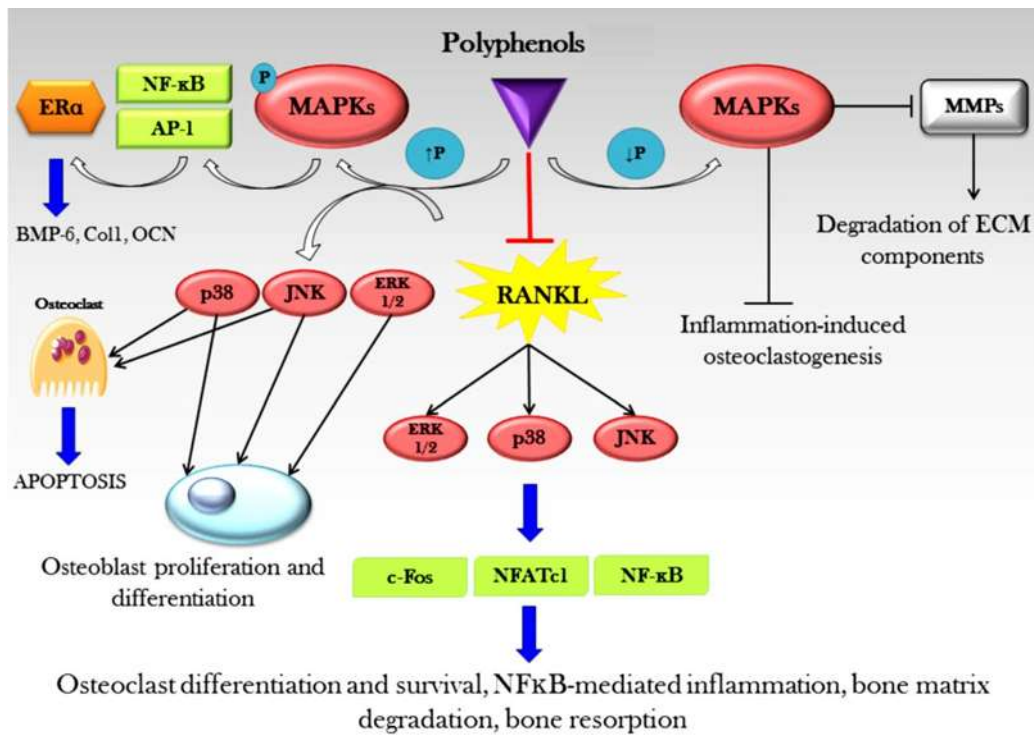


intestino delgado puede absorber polifenoles en forma de agliconas, pero muchos de ellos en su forma nativa son ésteres, glucósidos o polímeros que no pueden ser absorbidos por la barrera intestinal (Crozier et al., 2009; Marín et al., 2015). Por lo tanto, estos compuestos deben ser metabolizados por enzimas intestinales o la microflora intestinal (D'Archivio et al., 2007). Muchos estudios han encontrado correlaciones entre la ingesta de polifenoles y la salud ósea, principalmente debido a sus propiedades antioxidantes, porque el estrés oxidativo juega un papel importante en la patogénesis de la periodontitis con su promoción de un aumento de la resorción ósea vinculada a acciones directas/indirectas sobre la diferenciación y actividad de los osteoclastos (Welch y Hardcastle 2014; Callaway y Jiang 2015; Torre 2017). Por ejemplo, se ha demostrado que los flavonoides ejercen efectos antioxidantes mediante la eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS), evitando la formación de ROS y aumentando la producción de enzimas antioxidantes (Khan et al., 2020; Orozco-Montes et al., 2019).

Además de sus propiedades depuradoras, los polifenoles pueden influir en el metabolismo óseo a través de la regulación de mediadores inflamatorios como las citocinas, principalmente implicadas en el mantenimiento de la diferenciación y actividad de los osteoclastos, contribuyendo así a una reducción de la resorción ósea (Torre 2017; Al Mamun et al., 2020). Otro aspecto importante a tener en cuenta es el efecto anabólico óseo que ejercen los polifenoles, demostrado por numerosas investigaciones experimentales que destacan cómo es promovido por efectos sobre los osteoblastos que involucran diferentes vías de señalización como Wnt/ $\beta$ -catenina (Chen et al., 2010), proteínas morfogenéticas óseas (BMP) (Trzeciakiewicz et al., 2010a; 2010b), factor de transcripción 2 relacionado con Runt (Runx2) y Osterix (Osx) (Byun et al., 2014; Torre 2017).

Se sabe que los metabolitos secundarios de las plantas como polifenoles y flavonoides reducen la diferenciación de los osteoclastos al inhibir el ligando de receptor activador para el factor nuclear  $\kappa$ B (RANKL) y el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), por lo tanto, regula la producción de osteoprotegerina (OPG) y del RANKL, disminuyendo de esta forma la maduración acelerada de osteoclastos y la reabsorción ósea (Al Mamun et al.,

2020; Nicolin et al., 2019; Graef et al., 2017). Se ha demostrado que el mecanismo molecular de distintos flavonoides sobre la osteoclastogénesis regula significativamente la disminución de expresiones de TNF- $\alpha$  y RANKL, y regula positivamente la expresión de OPG tanto a nivel de proteínas como de genes (Al Mamun et al., 2020) (Fig. 3).



**Figura 3. Efectos benéficos de los polifenoles sobre las enfermedades óseas.** Los efectos benéficos de los polifenoles sobre las enfermedades óseas están mediados por acciones en la cascada de proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPKs). Se obtienen diferentes efectos en función del estado de fosforilación de las MAPKs, de hecho, los polifenoles pueden aumentar o disminuir la fosforilación, determinando así la proliferación y diferenciación de osteoblastos y la inhibición de la osteoclastogénesis inducida por inflamación, respectivamente. Tomada de: Torre E., 2017.

**MAPK:** Proteína quinasa activada por mitógeno; **AP-1:** Proteína activadora; **ER $\alpha$ :** Receptor de estrógeno  $\alpha$ ; **BMP-6:** Proteína morfogénica de hueso 6; **Col1:** Colágeno tipo 1; **OCN:** Proteína no colágena más importante de la matriz ósea, función es fijación del calcio; **p38:** Proteína quinasa (regula síntesis de citocinas proinflamatorias); **JNK:** Quinasas c-Jun N-terminal; **ERK:** Quinasa regulada por señales extracelulares; **c-Fos:** Protooncogén; **NFATc1:** Factor nuclear de células T activadas.



Por lo tanto, la planta Galeana (*Spathodea campanulata*) potencialmente va a ser antimicrobiana, antiinflamatoria y capaz de disminuir la diferenciación de osteoclastos. De estos tres efectos anteriores, ya se han demostrado el efecto antimicrobiano y antiinflamatorio, por lo que se optó por valorar la diferenciación de osteoclastos en ratas con periodontitis inducida por LPS.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La periodontitis es un problema de salud pública de alta prevalencia en México (Rojo et al., 2011; Plaza y Soto, 2014). Se ha sugerido que las condiciones sociales (nivel de educación, ingreso económico, condiciones de vida, estilos de vida y ambiente de trabajo) son, en gran parte, responsables de la inequidad en salud periodontal. Diferentes estudios epidemiológicos han establecido que existe una asociación entre un bajo nivel socioeconómico y un nivel de educación inferior con la presencia de periodontitis (Eke et al., 2012; Eke et al., 2015). Debido a que la mayoría de los pacientes con diagnóstico de periodontitis no tienen el hábito de higiene bucodental y que el odontólogo normalmente no emplea soluciones antimicrobianas, la periodontitis ocasionalmente no es controlada por completo y suelen recaer en la enfermedad (Papapanou et al., 2018; Rojo et al., 2011). Esto implica que muchos de los pacientes entran en un círculo vicioso de la enfermedad, requiriendo atención continua. Al no ser controlada efectivamente la periodontitis, continúa afectando la salud bucal y por lo tanto la salud sistémica (Plaza y Soto, 2014). Dentro de las principales afecciones bucales están: sangrado de encías, halitosis, movilidad dentaria, hasta llegar a la pérdida de múltiples órganos dentarios y en ocasiones edentulismo (estado de la salud bucal que corresponde a la pérdida y ausencia de dientes habiendo edentulismo parcial y edentulismo total). Las causas que lo producen son diversas, siendo las principales la caries dental y la enfermedad periodontal como la periodontitis (Vaishnavi Rajaraman et al, 2018; Emami et al, 2013). La detección temprana de la enfermedad ayuda a tratarla y a disminuir la gravedad de la misma (Botero y Bedoya, 2010). Por lo tanto, la planificación de medicamentos más nuevos y seguros para el tratamiento de las enfermedades periodontales proporcionará un mejor pronóstico, así como el diseño de medicamentos para las etapas posteriores



podrían ser útiles para tratar la periodontitis. Dentro de los principales beneficios posibles que se podrán obtener del modelo animal con periodontitis será, una posible disminución en el proceso inflamatorio y de la cantidad de osteoclastos en el grupo al cual se le aplique el LPS y el extracto acuoso de *Spathodea campanulata* en relación al grupo control positivo con periodontitis inducida por LPS. En cuanto a los aspectos éticos, este estudio se realizará siguiendo lo estipulado en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

#### **4. HIPÓTESIS**

La administración de LPS y extracto acuoso de *Spathodea campanulata* provoca una reducción en la cantidad de osteoclastos en relación con el grupo con periodontitis inducida por LPS.

#### **5. OBJETIVOS**

##### **5.1 Objetivo general:**

Evaluar el efecto de la administración oral del extracto acuoso de la planta *Spathodea campanulata* sobre el número de osteoclastos inducidos por la administración de LPS.

##### **5.2 Objetivos particulares:**

1. Corroborar el daño de la periodontitis inducida por LPS.
2. Evaluar el efecto protector de la coadministración del extracto acuoso de *Spathodea campanulata* con LPS.
3. Evaluar el efecto terapéutico de la administración oral del extracto acuoso de *Spathodea campanulata* en la periodontitis inducida por LPS.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Universo de estudio

El tamaño poblacional de muestras que se analizaron en el estudio fue de  $n=30$  ratas macho Sprague-Dawley a partir de 200 g. De las cuales,  $n=6$  ratas conformaron el grupo 1 (control negativo I) con ratas sanas con administración de solución salina (SS); grupo 2 (control negativo II) ( $n=6$ ) de ratas sanas con administración de EASC vía oral, para descartar que pueda tener efectos secundarios dañinos sobre la encía y hueso alveolar; grupo 3 ( $n=6$ ) (control positivo) tratado con LPS para corroborar la inducción de la periodontitis y la formación de osteoclastos en los alvéolos dentales. Finalmente, para evaluar el efecto del extracto acuoso de *Spathodea campanulata* (EASC) sobre la formación de osteoclastos inducida por LPS, en un grupo 4 ( $n=6$ ) se coadministró el LPS y el EASC durante tres días consecutivos y, en un grupo 5 ( $n=6$ ) se aplicó LPS por 3 días consecutivos y posteriormente el EASC en los siguientes 5 días del estudio, para evaluar el efecto terapéutico del EASC en la enfermedad periodontal.

### 6.2 Obtención del extracto acuoso de *Spathodea campanulata* (EASC)

Las hojas fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio 1% (NaOCl), se pesaron para obtener una concentración de 1mg/ml, se homogenizaron en agua destilada. Posteriormente, se filtraron y centrifugaron a 3500 rpm durante 30 min, recuperando el sobrenadante, al que se le denominó extracto acuoso de *Spathodea campanulata* (EASC) (Fenton NB, 2017) (Fig 4).



Figura 4. Obtención del extracto acuoso de *Spathodea campanulata* (EASC).



### 6.3 Estandarización de la descalcificación de las muestras

Para estandarizar la descalcificación de los dientes y hueso de mandíbula, se usaron 2 ratas. Se utilizaron dos métodos de descalcificación: uno con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 10% pH 7, y otro con ácido nítrico al 5%. Posteriormente, se realizó un análisis histológico, para el cual se obtuvieron ambos maxilares de las 2 ratas y quedaron inmersos en formalina al 10% durante 48h. Los maxilares de una rata se descalcificaron con EDTA 10% (pH 7) durante 8 semanas, realizando recambios de solución cada 10 días. Por otro lado, en la otra rata se descalcificaron los maxilares con ácido nítrico 5% durante 48h, con recambio de solución a las 24 horas. Se corroboró que las muestras habían terminado la descalcificación se obtuvieron radiografías en ambas muestras utilizando un aparato de rayos-x dental (Corix® 70 Plus-USV). Finalmente se realizó un análisis histológico con tinción de hematoxilina y eosina (H&E) en las muestras descalcificadas con ácido nítrico 5% y EDTA 10%. Al observar que el método de descalcificación más apropiado fue con EDTA 10%, los maxilares de todos los grupos fueron descalcificados en EDTA 10% durante 8 semanas.

## 6.4 Animales y diseño experimental

Las ratas se dividieron aleatoriamente en los siguientes grupos (n=6 para cada uno):

### - Grupo 1 solución salina (SS): Control negativo I

Se formó un *grupo 1* con ratas sanas, administrando solución salina (NaCl 0.9%) con jeringa para insulina (0.5ml) con aguja de 31Gx8mm en la papila interdental de la encía (zona vestibular), entre el primer y segundo molar del maxilar y de la mandíbula (bilateralmente) los días 1 al 3 del experimento (Fig.5).

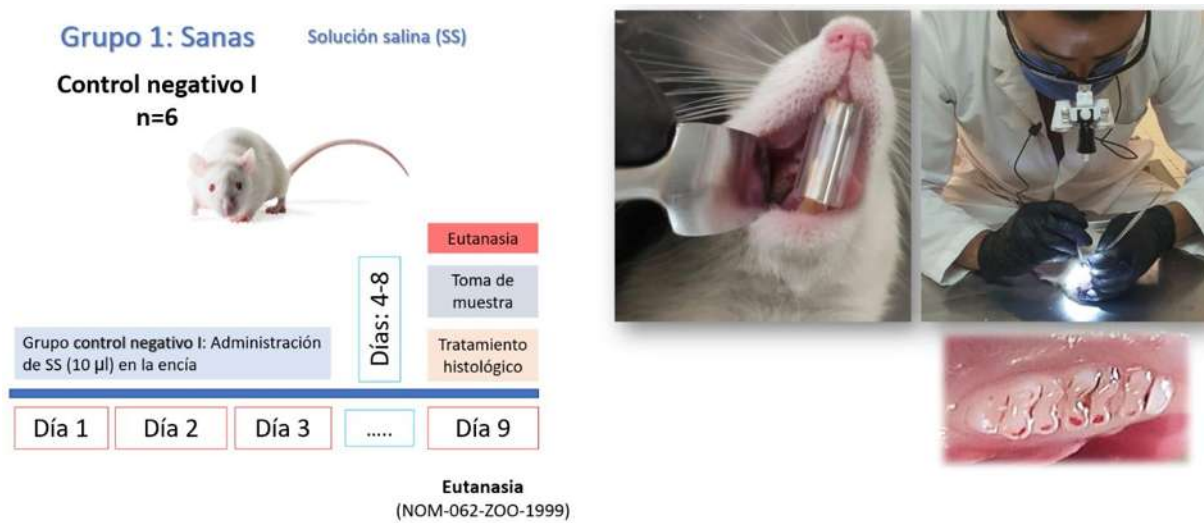


Figura 5. Grupo 1 solución salina (días: 1-3 del experimento)

### - Grupo 2 EASC: Control negativo II

En un *grupo 2* de ratas sanas se les aplicó una administración del EASC (300 mg/kg) vía oral con sonda oral metálica los días 1 al 3 del experimento, para descartar que el extracto generara por sí solo efectos secundarios dañinos sobre la encía y hueso alveolar (Fig. 6).

## Grupo 2: Sanas con EASC

### Control negativo II

n=6

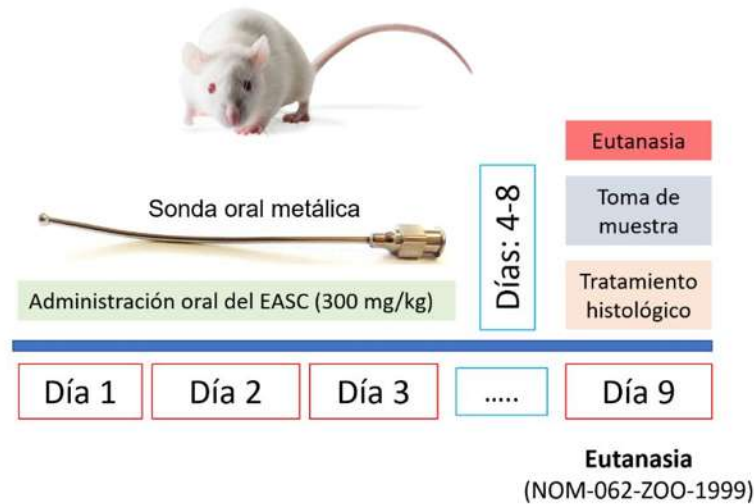


Figura 6. Grupo 2 EASC (días: 1-3 del experimento)

### - Grupo 3 LPS: Control positivo

Para corroborar la periodontitis inducida por LPS, en un *grupo 3* se administraron diariamente 10µl de 5 mg/mL de LPS (*Escherichia coli* serotipo O111:B4; Sigma Co., St Louis, MO, USA) disuelto en solución salina con jeringa para insulina (0.5ml) con aguja de 31Gx8mm en la papila interdental de la encía (zona vestibular), entre el primer y segundo molar del maxilar y de la mandíbula (bilateralmente) los días 1 al 3 del experimento para inducir la enfermedad periodontal (Fig. 7).



Figura 7. Grupo 3 LPS (días: 1-3 del experimento)

#### - Grupo 4 LPS+EASC (días: 1-3)

Para evaluar el efecto del extracto de *Spathodea campanulata* sobre la cantidad de osteoclastos inducida por LPS, se formó un grupo 4 en donde se empleó una coadministración de LPS y EASC. Se administraron 10µl de 5 mg/mL de LPS (*Escherichia coli* serotipo O111:B4; Sigma Co., St Louis, MO, USA) disuelto en solución salina con jeringa para insulina en la papila interdental de la encía (zona vestibular), entre el primer y segundo molar del maxilar y de la mandíbula (bilateralmente) los días 1 al 3 del experimento. Al mismo tiempo, se les administró el EASC (300 mg/kg pc) vía oral con sonda oral metálica disuelto en solución salina durante los mismos 3 días de la aplicación de LPS (Fig. 8).

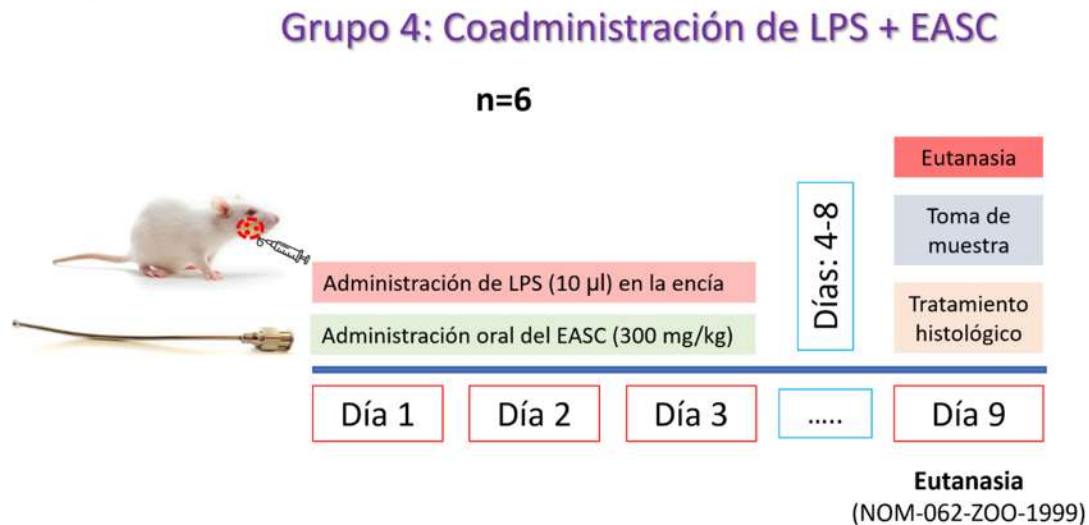


Figura 8. Grupo 4 coadministración de LPS+EASC (días: 1-3 del experimento)

#### - Grupo 5 LPS (días: 1-3) -- EASC (días: 4-8)

Finalmente, se formó un grupo 5 en donde se aplicó LPS los días 1 al 3 del experimento como se mencionó anteriormente, sin embargo, en este grupo la administración del EASC (300mg/kg pc) se empleó los días 4 al 8 (5 días consecutivos) del experimento (Fig. 9).

En el día 9 del experimento, se sacrificaron a todos los animales siguiendo lo estipulado en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. En cuanto los animales cumplieron el tiempo de experimentación según su grupo, se les administró una sobredosis de

pentobarbital sódico (120 mg/kg, I.P.) para proceder a la disección de ambos maxilares una vez verificada la pérdida total de signos vitales (Fig. 10).

En los animales de los grupos 1, 3, 4 y 5 se trabajó bajo anestesia general, administrando una combinación de anestésicos de ketamina (50 mg/kg, I.P.) y xilacina (20 mg/kg, I.P.).

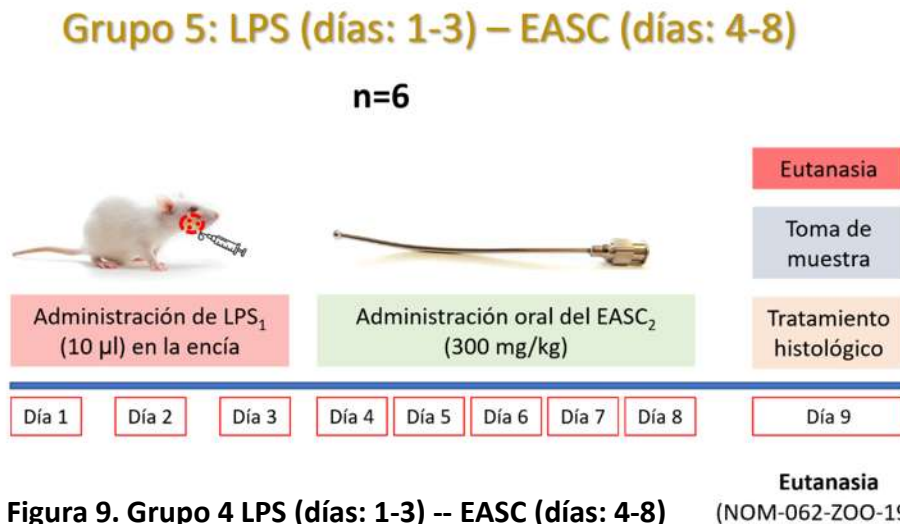


Figura 9. Grupo 4 LPS (días: 1-3) -- EASC (días: 4-8)

## 6.5 Temperatura y peso corporal

Se obtuvo la temperatura y peso corporal de todas las ratas del estudio, comenzando desde el día 1 del experimento y posteriormente cada día antes de ser manipuladas se midió la temperatura y se pesaron hasta el día 9 de la eutanasia en los 5 grupos.

## 6.6 Inflamación gingival clínica

Se valoraron aspectos clínicos en la zona donde se administró el LPS en el tejido gingival. Se evaluó el grado de inflamación gingival utilizando el índice de Løe (1967) en las ratas del grupo 1, 3, 4 y 5, y se calcularon las medias y desviaciones estándar en cada grupo. No se realizó la valoración en los animales del grupo 2 (EASC), debido a que estos no fueron anestesiados, y solo se administró el extracto de forma oral con una sonda oral, por lo cual, no fue posible revisar el tejido gingival (encía). Mediante este índice se valoró

la condición de la encía, el cual se basa en las características clínicas de los distintos grados de inflamación gingival. El índice gingival no considera profundidades de bolsa periodontal, grados de pérdida ósea o cualquier otro cambio cuantitativo del periodonto. Los criterios del índice de inflamación gingival son totalmente referentes a cambios cualitativos en el tejido blando gingival. Califica los tejidos marginal e interproximal sobre la escala de 0 a 3: Grado 0) ausencia de inflamación clínica; Grado 1) inflamación leve; Grado 2) inflamación moderada y Grado 3) inflamación severa.

### 6.7 Evaluación histopatológica

Posteriormente a la eutanasia, se realizó un análisis histológico, para el cual se obtuvieron ambos maxilares de las ratas, se lavaron en agua destilada, fueron inmersos en formalina al 10% durante 48h y se llevó a cabo la descalcificación con EDTA 10% durante 8 semanas, para iniciar con la técnica de inclusión en parafina (Fig. 10).

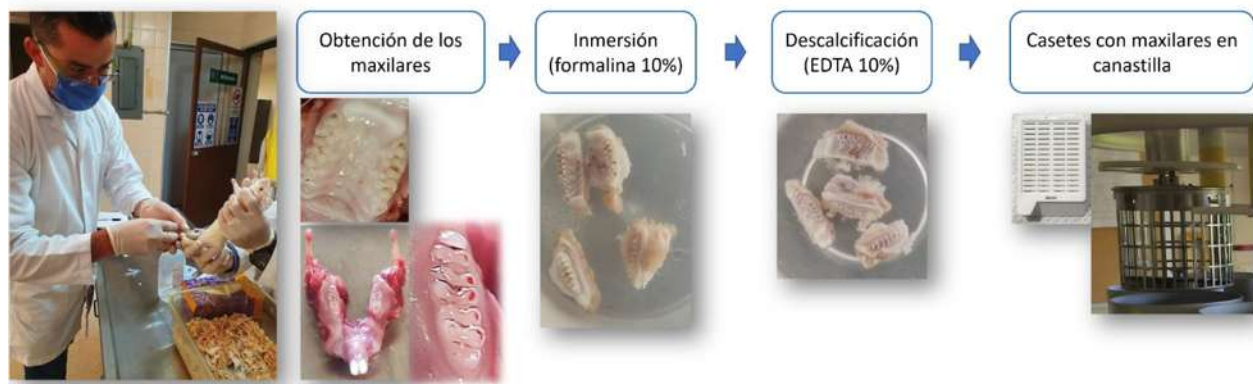


Figura 10. Secuencia del tratamiento de las muestras biológicas.

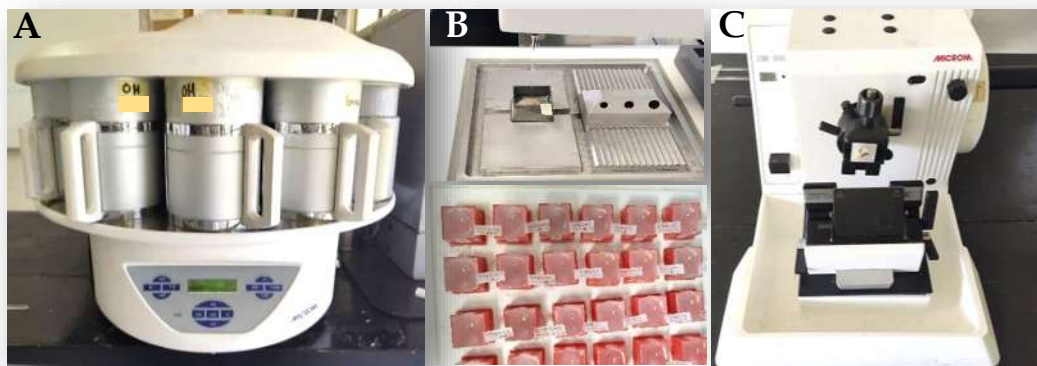
Se utilizó un procesador de tejidos o Histokinete (Microm STP120-1) automatizado para emplear la técnica de inclusión en parafina, en el cual se procesaron los tejidos por fijación (formalina 10%), deshidratación (etanol), aclaración (xilol) y la inclusión (parafina) (Fig. 11). Se obtuvieron bloques de parafina para realizar cortes de 7 $\mu$ m de espesor por cada hemimandíbula con un microtomo de rotación (Fig. 12). De cada hemimandíbula

en parafina se desecharon aproximadamente los primeros 70 cortes hasta localizar el tejido óseo de interés y se obtuvieron 3 laminillas de muestra por cada hemimandíbula.

**PROGRAMA DEL PROCESADOR DE TEJIDOS / HISTOKINETE**

|                | ESTACIÓN | REACTIVO     | TIEMPO | AGITACIÓN |
|----------------|----------|--------------|--------|-----------|
| FIJACIÓN       | 1        | FORMOL 10%   | 1 HORA | X         |
|                | 2        | ALCOHOL 80%  | 1 HORA | ✓         |
|                | 3        | ALCOHOL 80%  | 1 HORA | ✓         |
| DESHIDRATACIÓN | 4        | ALCOHOL 96%  | 1 HORA | ✓         |
|                | 5        | ALCOHOL 96%  | 1 HORA | ✓         |
|                | 6        | ALCOHOL ABS. | 1 HORA | ✓         |
|                | 7        | ALCOHOL ABS. | 1 HORA | ✓         |
| ACLARACIÓN     | 8        | XILENO       | 1 HORA | ✓         |
|                | 9        | XILENO       | 1 HORA | ✓         |
| INCLUSIÓN      | 10       | PARAFINA     | 1 HORA | ✓         |
|                | 11       | PARAFINA     | 1 HORA | ✓         |
|                | 12       | PARAFINA     | 1 HORA | ✓         |

**Figura 11.** Programa automatizado de procesador de tejidos / Histokinete para llevar a cabo la inclusión en parafina de las muestras.



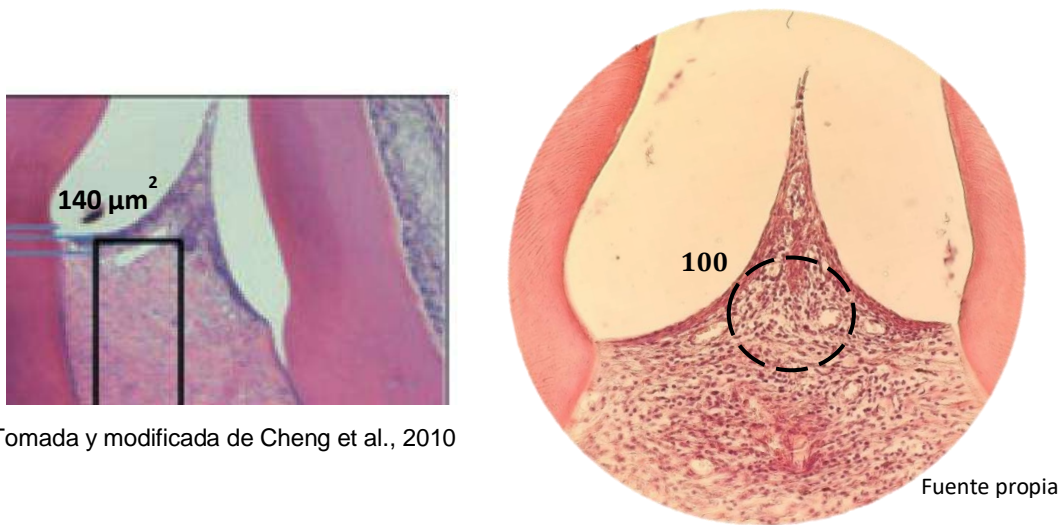
**Figura 12. Procedimiento histológico.** A) Procesador de tejidos (Histokinete); B) Muestras en bloques de parafina; C) Cortes de bloques de parafina con microtomo (7µm de espesor).

### 6.7.1 Análisis histológico y cuantitativo del infiltrado inflamatorio (H&E)

Las muestras de tejido en laminillas se tiñeron con método de hematoxilina y eosina (H&E) y se fijaron con resina (Entellan®) para su posterior análisis microscópico (Fig. 13). Mediante esta técnica se analizó el infiltrado inflamatorio, en donde se contabilizó el número de neutrófilos en un área de  $100\mu\text{m}^2$  en la base de la cresta ósea alveolar de acuerdo a Cheng et al. (2010) (Fig. 14).



**Figura 13.** Tinción de Hematoxilina & Eosina y análisis microscópico de las laminillas de las muestras.



Tomada y modificada de Cheng et al., 2010

Fuente propia

**Figura 14.** Ilustración esquemática de las regiones donde se realizó el conteo del infiltrado inflamatorio en la base de la cresta alveolar en un área de  $100\mu\text{m}^2$  en los 5 grupos de estudio.



### 6.7.2 Análisis histológico y cuantitativo del número de osteoclastos (TRAP)

Para identificar los osteoclastos, se realizó la tinción histoquímica fosfatasa ácida tartrato-resistente (TRAP), de acuerdo a Erlebacher & Derynck (1996). La técnica TRAP se describe a continuación:

#### Procedimiento:

1. Se precalentaron frascos Coplin para el medio de incubación en baño de agua a 37°C.
2. Se desparafinaron cortes histológicos, colocando las laminillas en plancha/placa de calor para desparafinar muestras, y se realizaron 3 pases en xilol de 5 minutos cada uno.

3. Se rehidrataron las muestras en:

- Alcohol absoluto durante 6 minutos
- Alcohol 95° durante 3 minutos
- Alcohol 70° durante 3 minutos
- Alcohol 50° durante 3 minutos
- Agua destilada durante 6 minutos.

4. Se pre-incubaron 9 laminillas durante 20 minutos a temperatura ambiente en frasco Coplin con 50ml de *medio de pre-incubación* (buffer de acetato 0.2M ajustado el pH a 5.0 con HCl).

\*El buffer de acetato 0.2M se obtuvo mezclando acetato de sodio 0.2M con tartrato de sodio dibásico dihidratado 50mM en agua destilada).

Verter *medio de incubación* (50ml) a frascos Coplin precalentados.

5. Se transfirieron las laminillas (drenar brevemente) del *medio de pre-incubación* al *medio de incubación* preparado previamente (buffer de acetato 0.2M + Naphtol phosphate AS-MX 0.5mg/ml (Sigma-Aldrich®) + Fast Red TR Salt (1.1mg/ml) 1,5-



naphthalenedisulfonate salt (Sigma-Aldrich®), y se incubaron durante 2 horas a 37°C (una hora parece suficiente).

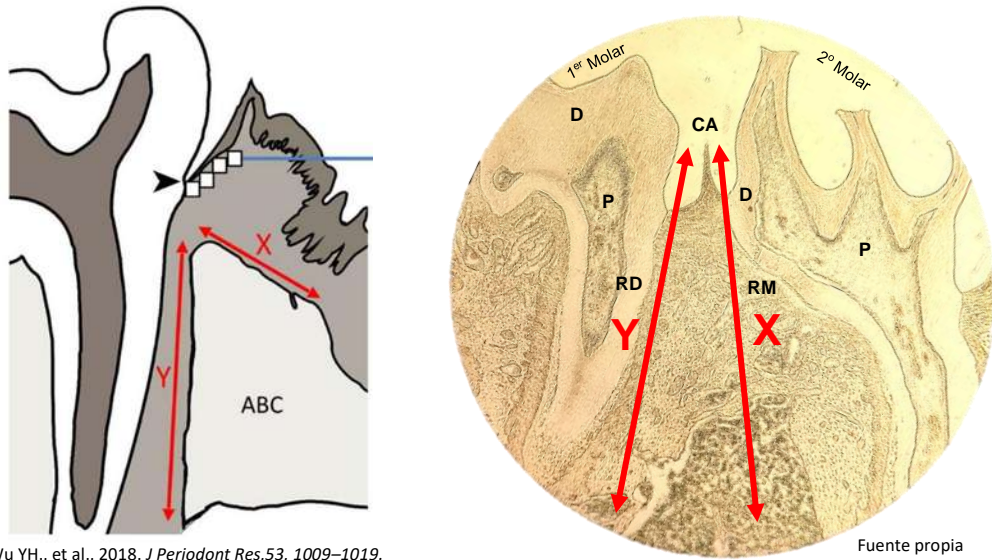
6. Se desechó el medio de incubación y se cubrieron las laminillas con agua destilada durante 5 minutos a temperatura ambiente.

7. Se contrastó la tinción TRAP con hematoxilina. Para esto, I) se colocaron las laminillas en hematoxilina filtrada durante 1 minuto; II) se cubrieron con agua destilada y se agitaron 10 veces; III) se cubrieron con solución de Scott ( $\text{NaHCO}_3 + \text{MgSO}_4 + \text{dH}_2\text{O}$ ) durante 1 minuto y, IV) se enjuagaron en agua destilada durante 5 minutos.

8. Las laminillas fueron cubiertas con un medio de montaje para microscopia a base de resina (Entellan® Merck) y se dejaron secar durante 24 horas.

### **Análisis del número de osteoclastos**

El análisis del número de osteoclastos se realizó según el método de Wu et al., (2018). El criterio para la determinación de osteoclastos fueron las células multinucleadas TRAP-positivas. Se contó el número de células multinucleadas positivas para TRAP en la superficie lineal del hueso alveolar. Las regiones de medición se realizaron según la ubicación, como se muestra en la Figura 15, el segmento que va desde la parte superior de la cresta ósea alveolar (CA) hasta la zona apical siguiendo el tejido óseo a lo largo del ligamento periodontal se designó como raíz distal (Línea Y), y desde la parte superior de la cresta ósea alveolar (CA) hasta la zona apical siguiendo el tejido óseo a lo largo del ligamento periodontal se designó como raíz mesial (Línea X). Se midieron dos secciones (línea y, línea x) de tejido por muestra de rata ( $n = 6$  por grupo) y se promediaron los resultados contados para cada sección.



Wu YH., et al., 2018. *J Periodont Res*,53, 1009–1019.

Fuente propia

**Figura 15.** Ilustración esquemática de las regiones donde se realizó el conteo de células osteoclasticas multinucleadas y TRAP-positivas en tejido periodontal de ratas en los 5 grupos.

Las células multinucleadas positivas para TRAP se calcularon en la superficie lineal del hueso alveolar. El segmento que va desde la parte superior de la cresta ósea alveolar (CA) hasta la zona apical siguiendo el tejido óseo a lo largo del ligamento periodontal se designó como raíz distal (**Línea Y**), y desde la parte superior de la cresta ósea alveolar (CA) hasta la zona apical siguiendo el tejido óseo a lo largo del ligamento periodontal se designó como raíz mesial (**Línea X**).

CA: cresta alveolar, D: dentina dental, P: pulpa dental, Y: raíz distal, X: raíz mesial, HT: hueso trabecular  
Tomada y modificada de: Wu YH et al., 2018.



## 6.8 Análisis bioestadístico

Para la captación y procesamiento de los datos se utilizó el programa estadístico GraphPad PRISM Versión 9. Se determinaron medidas de tendencia central como la media aritmética, medidas de dispersión como la desviación estándar y error estándar para concentrar los datos provenientes de las variables evaluadas. Los resultados en las gráficas se muestran con media y error estándar. Asimismo, se llevó a cabo el análisis de varianza (ANOVA) de una y dos vías, y pruebas de comparaciones múltiples post hoc de Tukey para identificar entre qué grupos se presentaron diferencias estadísticamente significativas. Un símbolo (\*)= $P < 0.05$ , dos símbolos (\*\*)= $P < 0.01$ , tres símbolos (\*\*\*)= $P < 0.001$ , cuatro símbolos (\*\*\*\*)= $P < 0.0001$ .

## 6.9 Aspectos éticos

La presente investigación se realizó tomando en cuenta lo estipulado en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Las ratas se mantuvieron bajo condiciones de luz-oscuridad (12h/12h), temperatura ambiente (20-25°C) y suministro de agua potable y alimento *ad libitum*. Se utilizaron anestésicos en combinación de ketamina (50mg/kg, I.P.) y xilacina (20mg/kg, I.P.) durante los primeros 3 días del experimento en los grupos 1,3,4 y 5.

El protocolo del presente trabajo de investigación fue evaluado y aprobado por la Coordinación de Investigación Científica de la UMSNH.



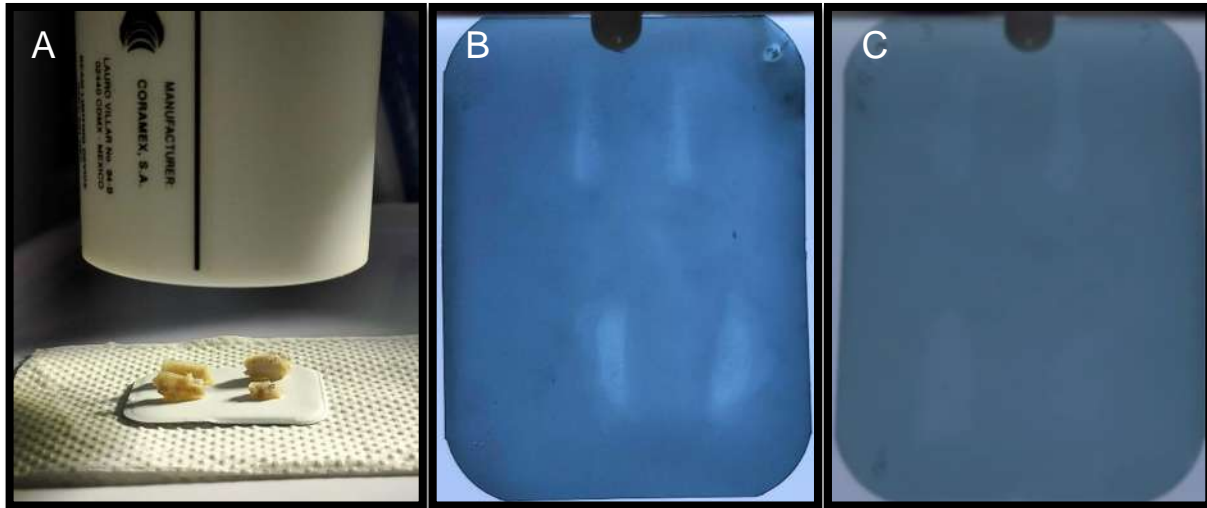
## 7. RESULTADOS

### 7.1 Estandarización de la descalcificación de muestras

El método más utilizado en la bibliografía para descalcificar diente y hueso es mediante la utilización de EDTA 10%. Sin embargo, debido al tiempo prolongado que se lleva para completar la descalcificación de dientes y hueso con este método, se decidió probar un método de descalcificación con ácido nítrico 5% en menor tiempo como lo han reportado otros autores (Liu et al., 2017; Savi et al., 2017). Nuestros resultados del método de descalcificación ideal para realizar el análisis histológico fueron con EDTA 10% (Fig. 16 y 17), lo que concuerda con previa experimentación realizada por el grupo de trabajo, así como por literatura científica publicada (Domínguez-Pérez et al., 2016; Savi et al., 2017). Sin embargo, hubo diferencia en el tiempo en el cual se obtuvo la completa descalcificación. El tiempo necesario para obtener la muestra con una descalcificación idónea para su procesamiento histológico fue de 8 semanas.

#### 7.1.1 Radiografías (rayos-X)

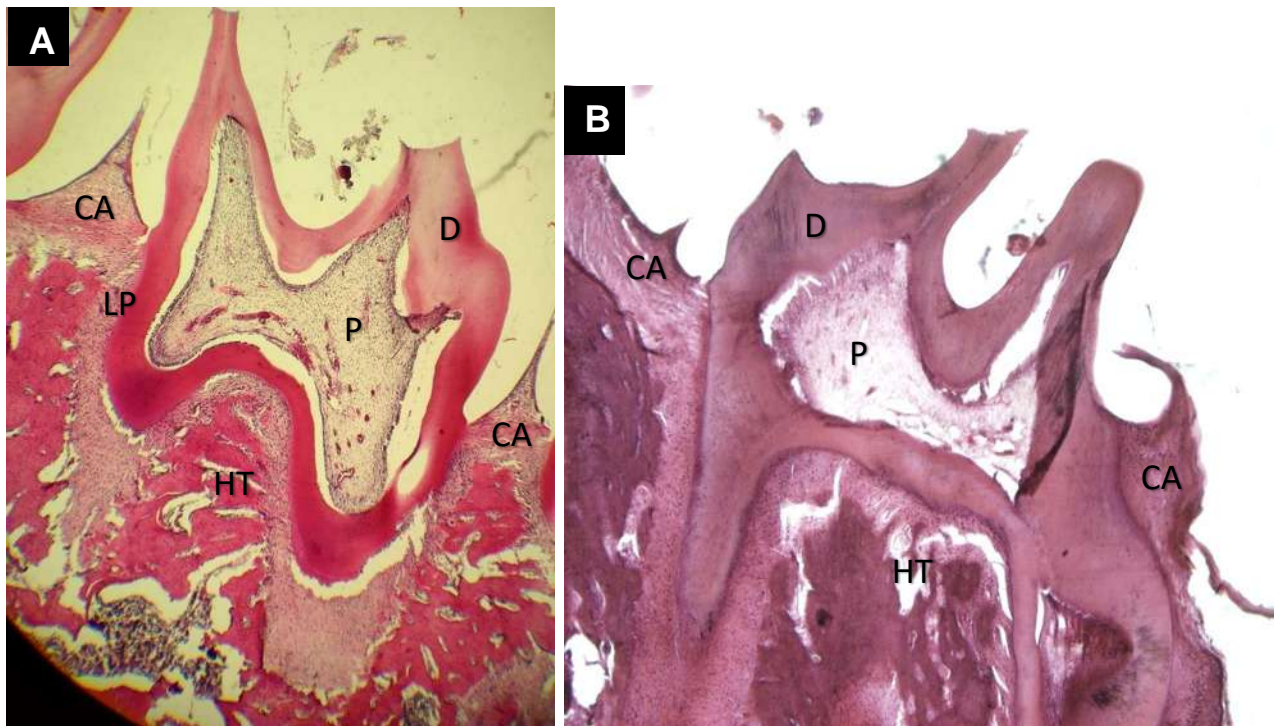
Para corroborar que las muestras habían cumplido su tiempo de descalcificación se realizaron radiografías, debido a que el método de rayos-X no daña la muestra (Fig. 16).



**Figura 16. Radiografías (rayos-X).** A) Obtención de radiografías con aparato de rayos-X de uso odontológico; B) radiografía con muestras de dientes y hueso no descalcificado; C) radiografía con muestras de dientes y hueso descalcificado y apto para ser procesado para

### 7.1.2 Análisis histológico

Se realizó un análisis histológico con tinción de hematoxilina-eosina (H&E) en las muestras descalcificadas con ácido nítrico 5% y EDTA 10%. En las microfotografías (Fig. 17), se logró observar que al utilizar el ácido nítrico 5% se obtiene una descalcificación rápida en 48 horas, a diferencia del EDTA al 10% que se obtuvo en 8 semanas. Sin embargo, en los dientes y mandíbulas descalcificadas con EDTA 10%, se observó histológicamente una excelente conservación de la morfología del tejido. Por otro lado, el tejido descalcificado con ácido nítrico 5% presentó un daño notorio en todos los tejidos circundantes de dientes y hueso mandibular en el análisis microscópico, lo que impide ver a detalle las zonas periodontales de interés. Por lo tanto, el método de descalcificación con EDTA 10%, permitió ver a detalle la morfología y estructuras de interés, con una conservación óptima del tejido permitiendo un mejor análisis histopatológico.



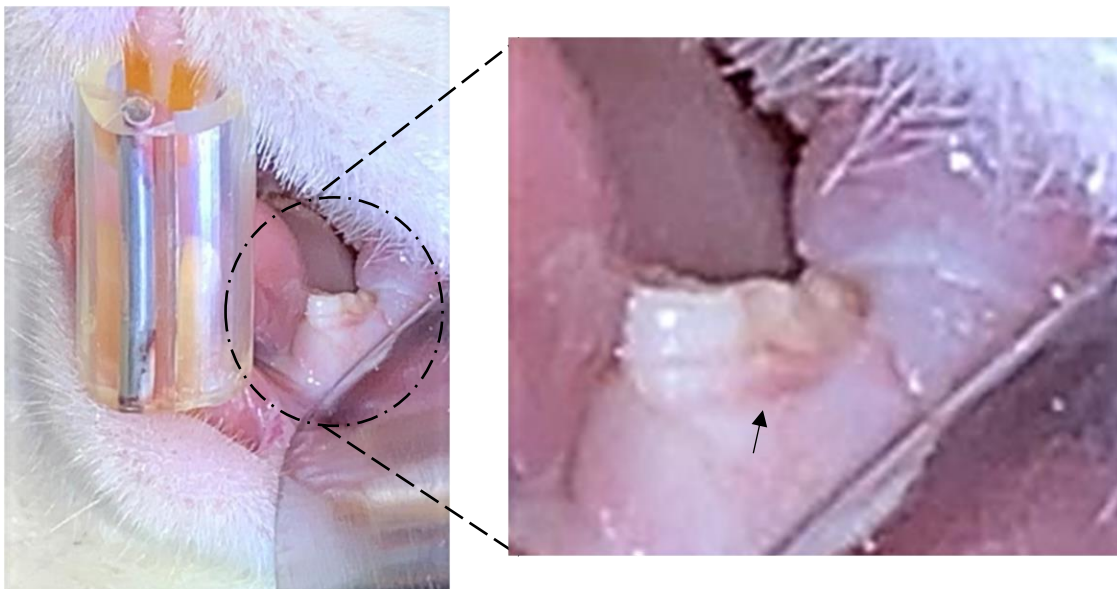
**Figura 17. Estandarización de la descalcificación de muestras.** Microfotografías de cortes histológicos con tinción Hematoxilina-Eosina. A) Se muestran estructuras anatómicas de molar y hueso de rata descalcificados en EDTA 10%, donde se observa una conservación de todos los tejidos anatómicos de interés. B) Molar y hueso de rata descalcificado en ácido nítrico 5%, observándose daño notorio tanto en molar como en hueso, especialmente en la cresta alveolar (CA). CA: cresta alveolar, D: dentina, P: pulpa dental, HT: hueso trabecular, LP: ligamento periodontal. Magnitud: 400x

## 7.2 Estandarización de la administración de LPS

Se estandarizó el sitio de inyección de LPS en la papila interdental, entre el primer y segundo molar de los maxilares (bilateralmente). Para ello, en el grupo 1 (control negativo) se administró solución salina en la encía a ratas sanas y en el grupo 3 (control positivo) se les administró con LPS.

En los resultados histológicos del grupo 1 se pudo ver a detalle la morfología y estructuras fisiológicas de interés, todos los tejidos permanecieron sanos en todos los maxilares.

En el grupo 3 (control positivo), donde se les administró el LPS en la papila interdental durante 3 días consecutivos para inducir la enfermedad periodontal, se logró observar en el tercer día post-LPS una inflamación gingival clínicamente notoria en la zona de la administración (Fig. 18).



**Figura 18. Inflamación gingival clínica.** Inflamación tres días posteriores a la administración de LPS de *E. coli* serotipo O111:B4 (10 $\mu$ l de 5mg/mL) con jeringa para insulina en la papila interdental de la encía (zona vestibular), entre el primer y segundo molar mandibular (bilateralmente). La flecha negra señala la inflamación gingival macroscópica.

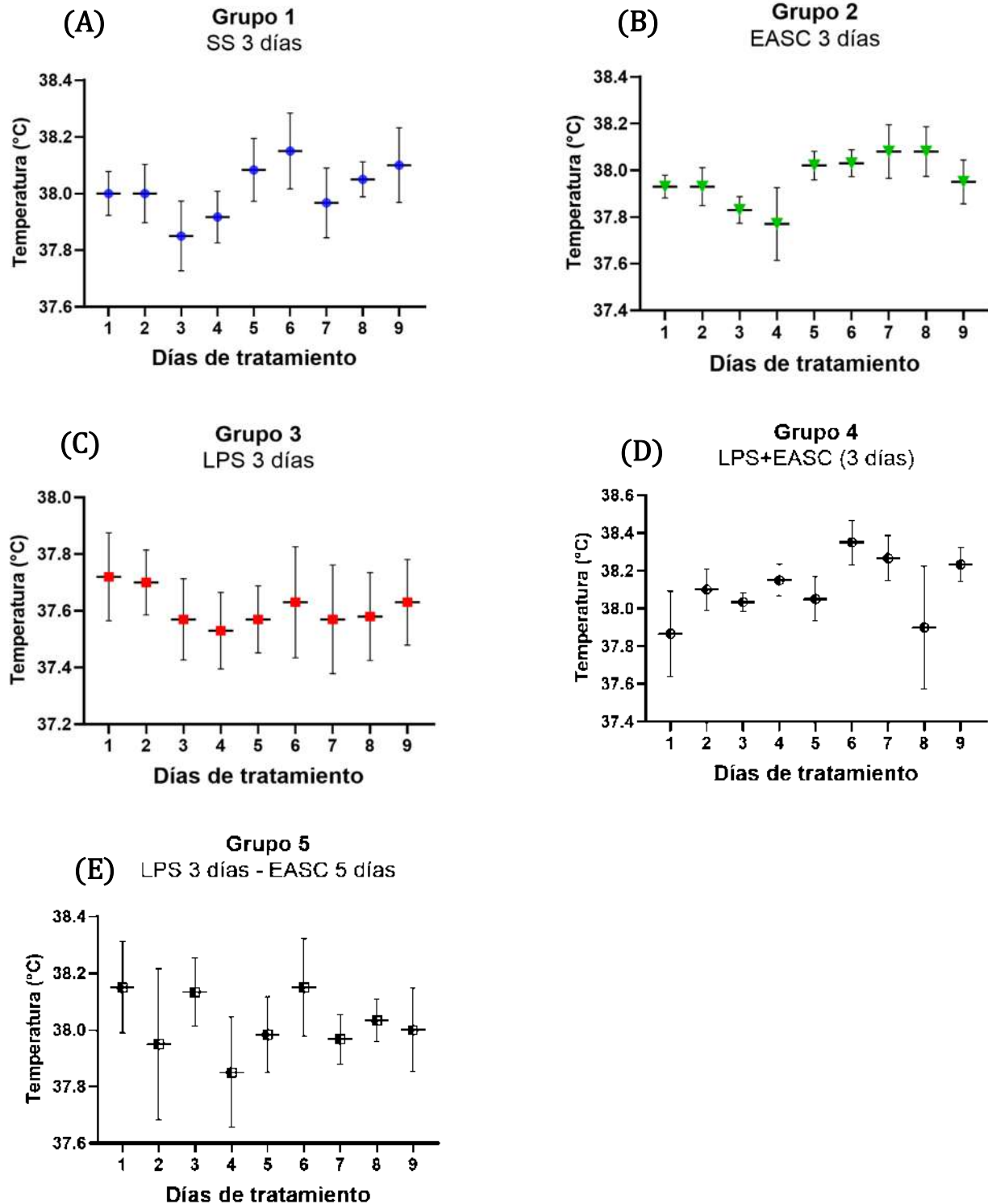


### **7.3 Temperatura corporal**

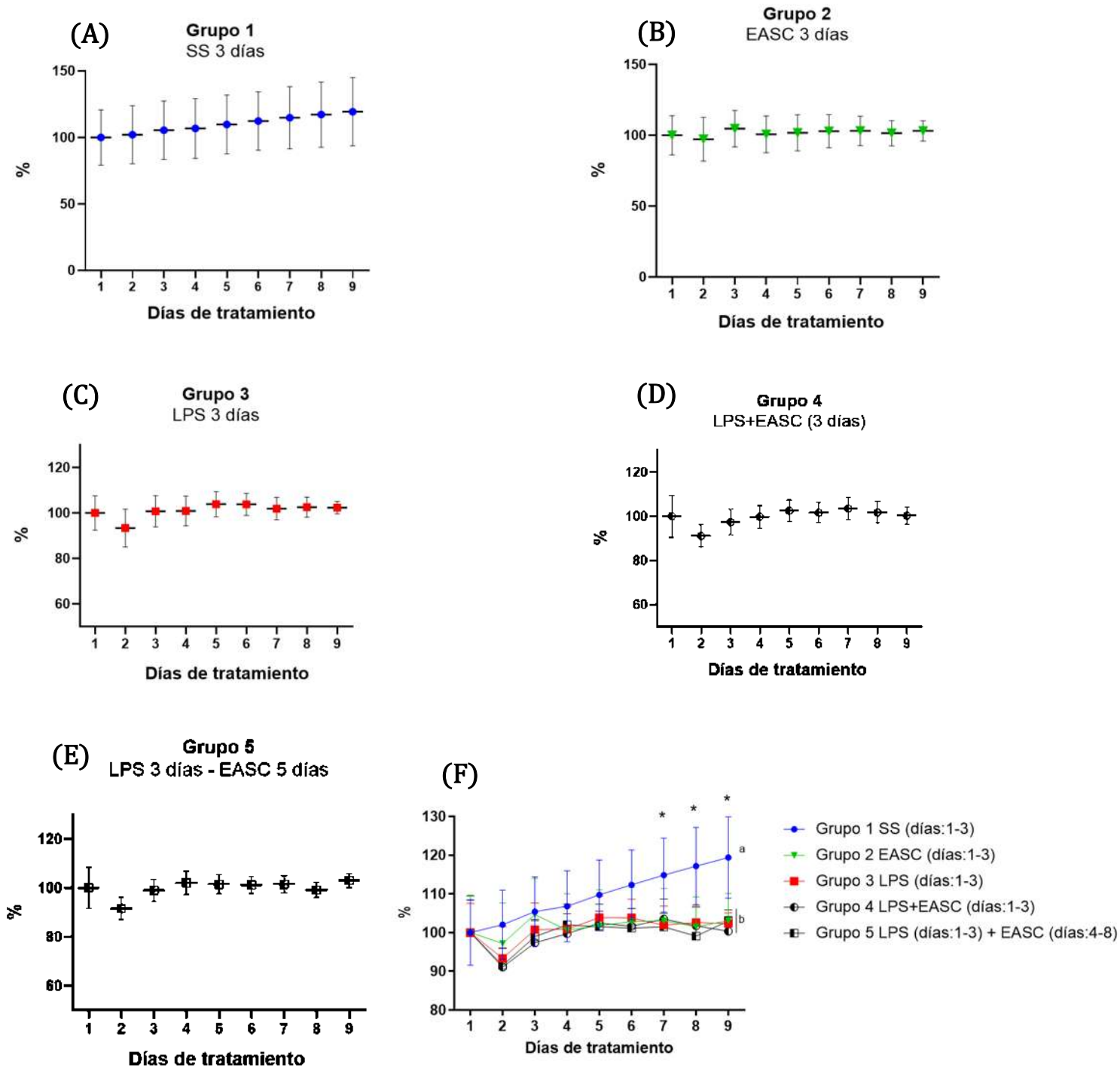
Se midió la temperatura rectal (°C) en las ratas de los 5 grupos del estudio durante los 9 días del experimento, en donde se observó que las temperaturas se mantuvieron en un rango de 37.4°C a 38.4°C (Fig. 19). No hubo diferencias estadísticamente significativas en ningún grupo en la variación de la temperatura rectal a lo largo de los 9 días del estudio.

### **7.4 Peso corporal**

Se obtuvo el peso corporal (g) de todas las ratas del estudio durante los 9 días de experimentación, y se calcularon las medias y errores estándar en cada grupo (Fig. 20). El grupo 1 (SS) presentó diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.0001$ ) con todos los demás grupos en el día 9 del estudio (Fig. 20 F). El grupo 2 (EASC) tuvo en promedio el menor peso en relación a los demás grupos (Fig. 20 B). En el grupo 3, 4 y 5 hubo una disminución en la ingesta de alimento posterior a la administración de LPS, probablemente por la inflamación local del tejido gingival, causando molestias en las ratas en el proceso de masticación, y como consecuencia un menor peso corporal.



**Figura 19. Temperatura corporal de las ratas.** Medias y errores estándar de las temperaturas rectales (°C) obtenidas en las ratas durante los 9 días del estudio en los 5 grupos (A-E) con ANOVA de una vía.



**Figura 20. Normalización de pesos ( $\bar{x} \pm EE$ ).** Grupo 1: Solución salina (días 1-3), Grupo 2: EASC (días 1-3), Grupo 3: LPS días (1-3), Grupo 4: LPS+EASC(días:1-3), Grupo 5: LPS (días 1-3) + EASC (días 4-8). Existen diferencias significativas entre los grupos considerando el comportamiento de todos los días: a,b,c,d,e,f: ( $P \leq 0.0001$ ). En cada grupo se encontraron diferencias significativas en el grupo 1 (SS) de los días 7 al 9 en comparación con el día 1 \* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \*\*\* $P \leq 0.001$ ). En el resto de los grupos no se encontraron diferencias significativas en los pesos del día 1 al día 9.



## 7.5 Inflamación gingival clínica

Se valoraron aspectos clínicos en la zona donde se administró el LPS en el tejido gingival. Se evaluó el grado de inflamación gingival utilizando el índice de Löe (1967) en las ratas del grupo 1, 3, 4 y 5, y se calcularon las medias y desviaciones estándar en cada grupo (tabla 1). No se realizó la valoración en los animales del grupo 2 (EASC), debido a que estos no fueron anestesiados, ya que solo se administró el extracto de forma oral con una sonda oral y, por lo tanto, no fue posible revisar el tejido gingival (encía). Los criterios del índice de inflamación gingival son totalmente referentes a cambios cualitativos en el tejido blando gingival. Califica los tejidos marginal e interproximal sobre la escala de 0 a 3: Grado 0) ausencia de inflamación clínica; Grado 1) inflamación leve; Grado 2) inflamación moderada y Grado 3) inflamación severa.

**Tabla 1. Grado de inflamación gingival de Löe (1967) en los grupos 1, 3, 4 y 5.**

Media y desviación estándar,  $\bar{X} \pm DE$

| GRUPOS   | Día 1 | Día 2       | Día 3       | Día 9<br>(eutanasia) |
|--|-------|-------------|-------------|----------------------|
| Grupo 1 SS                                     | 0 ± 0 | 0.33 ± 0.51 | 0.5 ± 0.54  | 0 ± 0                |
| Grupo 3 LPS                                    | 0 ± 0 | 2.33 ± 0.81 | 2.66 ± 0.51 | 0 ± 0                |
| Grupo 4<br>LPS+EASC                            | 0 ± 0 | 1.83 ± 0.75 | 0.83 ± 0.40 | 0 ± 0                |
| Grupo 5<br>LPS <sub>1</sub> -EASC <sub>2</sub> | 0 ± 0 | 2.5 ± 0.54  | 2.66 ± 0.51 | 0 ± 0                |



## **7.6 Análisis histológico y cuantitativo del infiltrado inflamatorio (H&E)**

Se muestran a continuación los resultados de la evaluación histológica del infiltrado inflamatorio mediante la tinción de hematoxilina y eosina (H&E) en los 5 grupos (N=30), en donde se contabilizó el número de neutrófilos a 1000X en un área de 100  $\mu\text{m}^2$  en la base de la cresta alveolar tomando los parámetros de Cheng et al., (2010), como se mencionó anteriormente (Fig. 14) en la página 34.

### **Grupo 1 SS (días: 1-3)**

Se obtuvo la media y error estándar del infiltrado inflamatorio siendo de  $13.5 \pm 0.55$  (Fig. 21). Las estructuras anatómicas periodontales de interés permanecieron sin alteración en todas las muestras, la cresta alveolar se observa normal en el análisis histológico (Fig.22 A, D, G).

### **Grupo 2 EASC (días: 1-3)**

Se contabilizó un infiltrado inflamatorio de  $11.16 \pm 1.33$  (Fig. 21). No se observó alteración en la morfología ni en estructuras anatómicas de interés, la cresta alveolar permaneció normal (Fig. 22 B, E, H).

### **Grupo 3 LPS (días: 1-3)**

Se contabilizó un infiltrado inflamatorio de  $35.83 \pm 5.97$ , habiendo diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.0001$ ) con todos los demás grupos de estudio (Fig. 21). Se observó alteración en la cresta alveolar, mostrando una pérdida ósea en la altura de la misma (Fig. 22 C, F, I), y en el centro de la cresta se observan espacios de resorción ósea (Fig. 22 I).

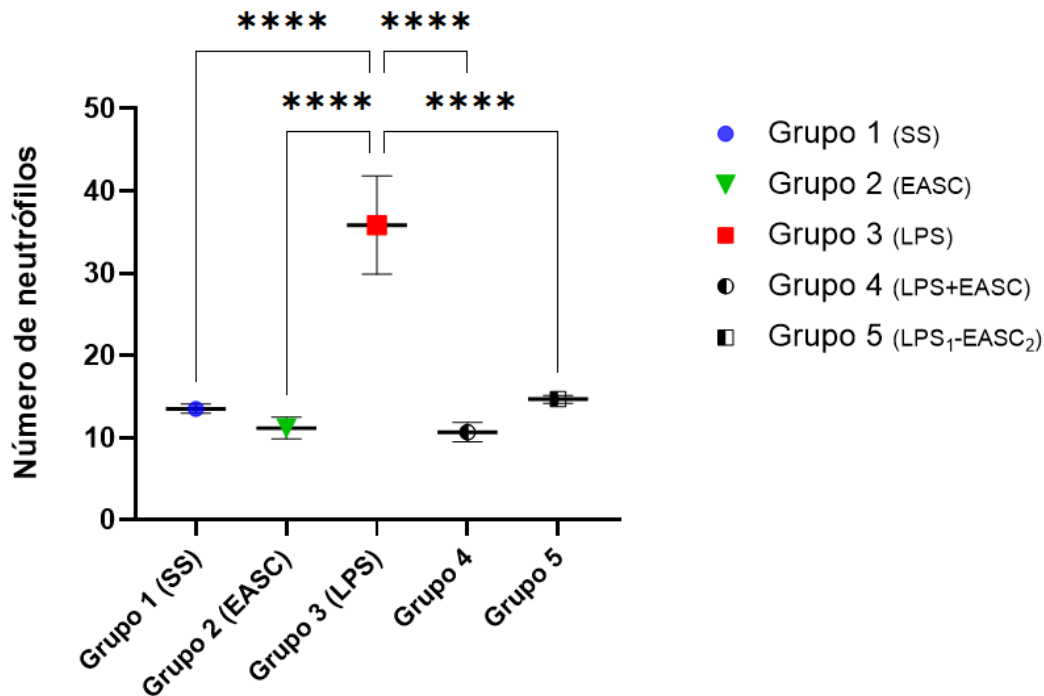
### **Grupo 4 LPS+EASC (días: 1-3)**

Se obtuvo una media y error estándar del infiltrado inflamatorio de  $10.66 \pm 1.17$ , y no hubo diferencia estadísticamente significativa con el grupo 1 SS ( $P = 0.42$ ), pero sí hubo diferencia significativa con el grupo 3 LPS ( $P < 0.0001$ ) (Fig. 21). No se observó una alteración notoria en la cresta ósea alveolar, ni en estructuras anatómicas de interés (Fig.23 J, L, N). Sin embargo, en algunos cortes histológicos la CA se observa

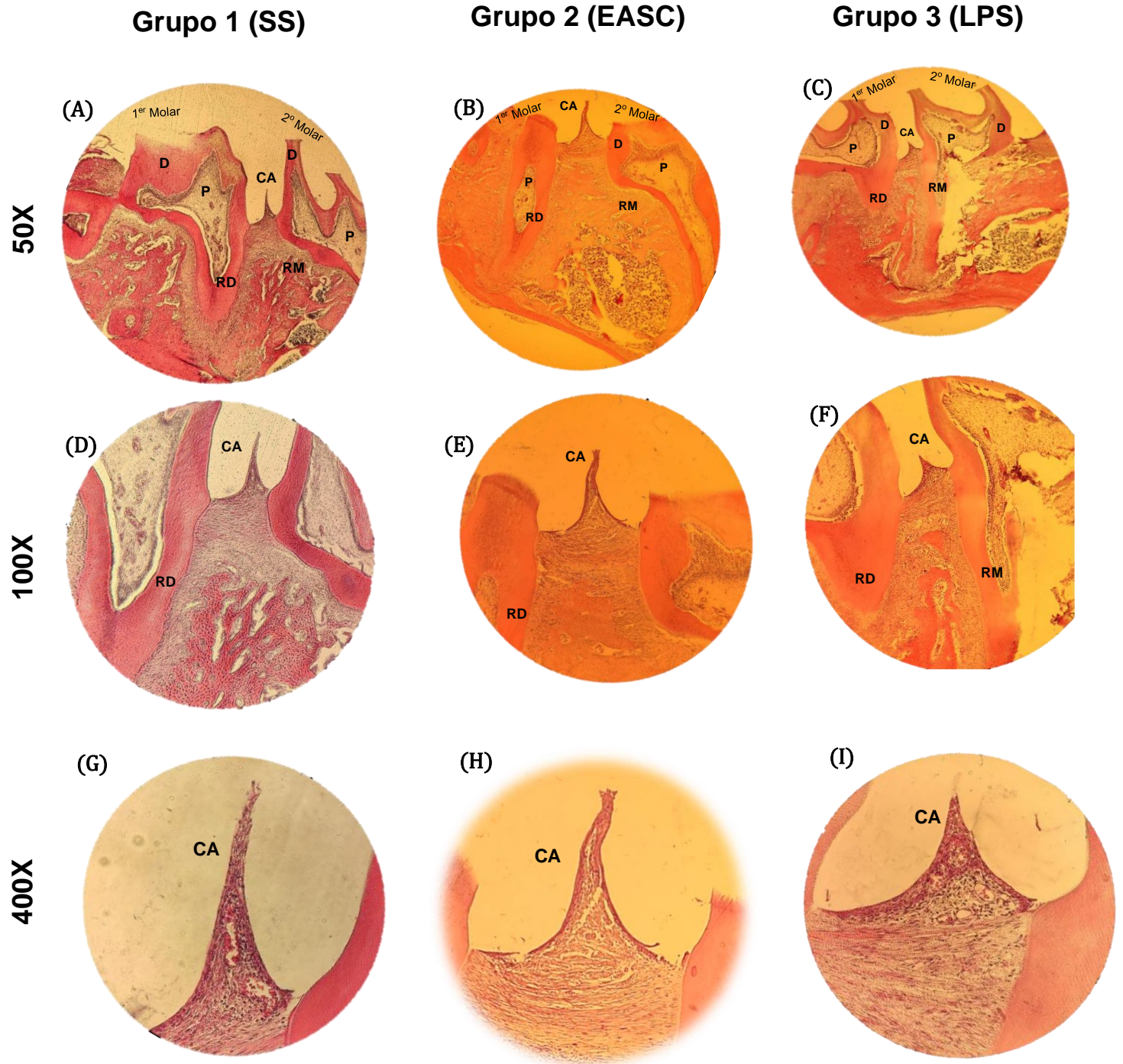
ligeramente más angosta en comparación al grupo 1, aunque se mantuvo la altura de la cresta en todos los análisis histológicos.

### **Grupo 5 LPS (días: 1-3) – EASC (días: 4-8)**

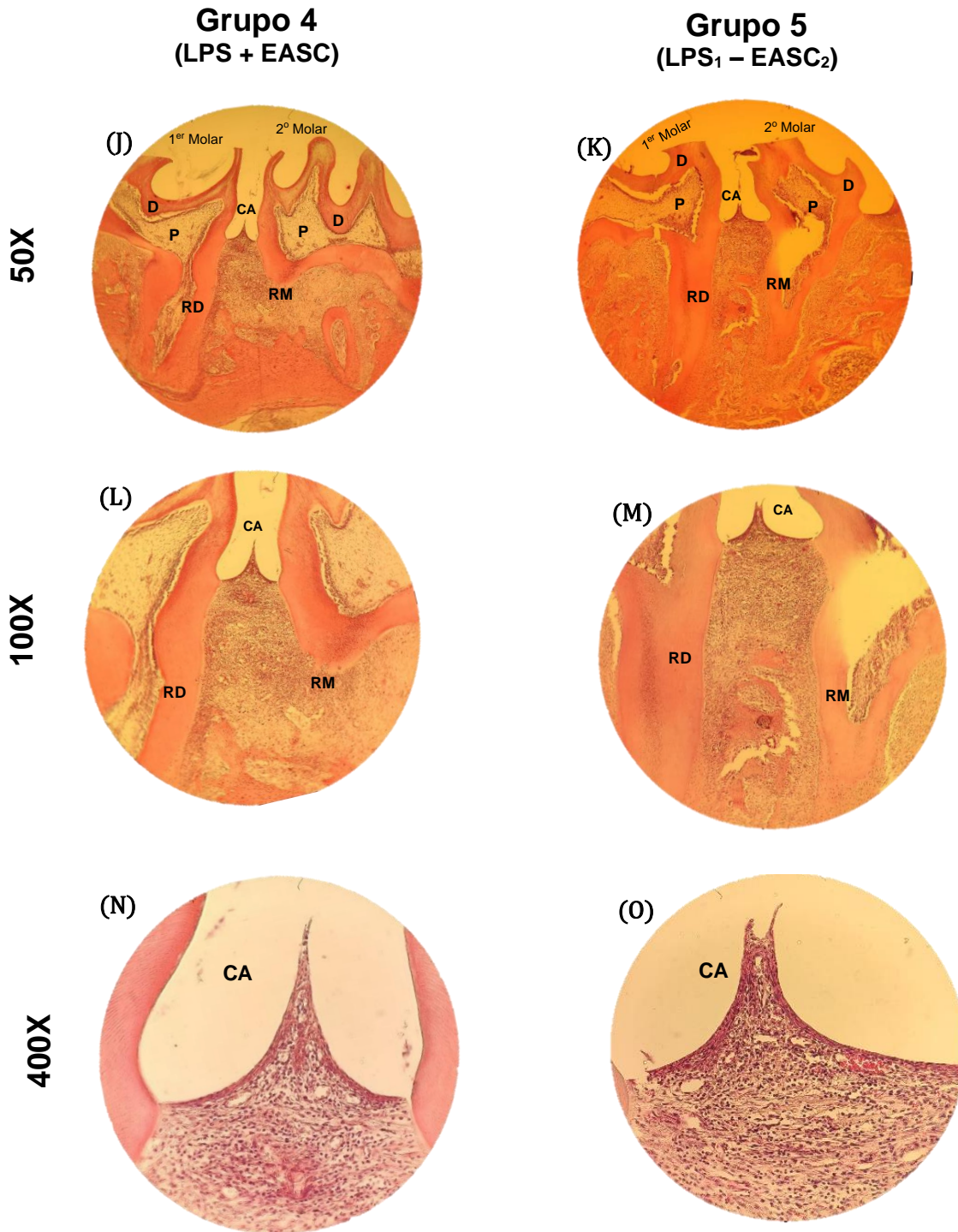
Se obtuvo una media y error estándar del infiltrado inflamatorio de  $14.66 \pm 2.94$  (Fig. 21). Sin embargo, no hubo diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo 1 SS ( $P=0.95$ ). En comparación con el grupo 3 LPS, si presentó diferencia significativa ( $P<0.0001$ ). En el análisis histológico se observó una alteración en la parte más alta de la cresta alveolar, mostrando una pérdida ósea notoria (Fig. 23 K, M, O). Asimismo, en la punta de la CA se formó una concavidad, resultado de la pérdida ósea causada por el LPS (Fig. 23 O).



**Figura 21. Infiltrado inflamatorio.** Medias y errores estándar del número de neutrófilos encontrados en la cresta ósea alveolar en los cinco grupos del estudio. \*\*\*\*( $P<0.0001$ ).



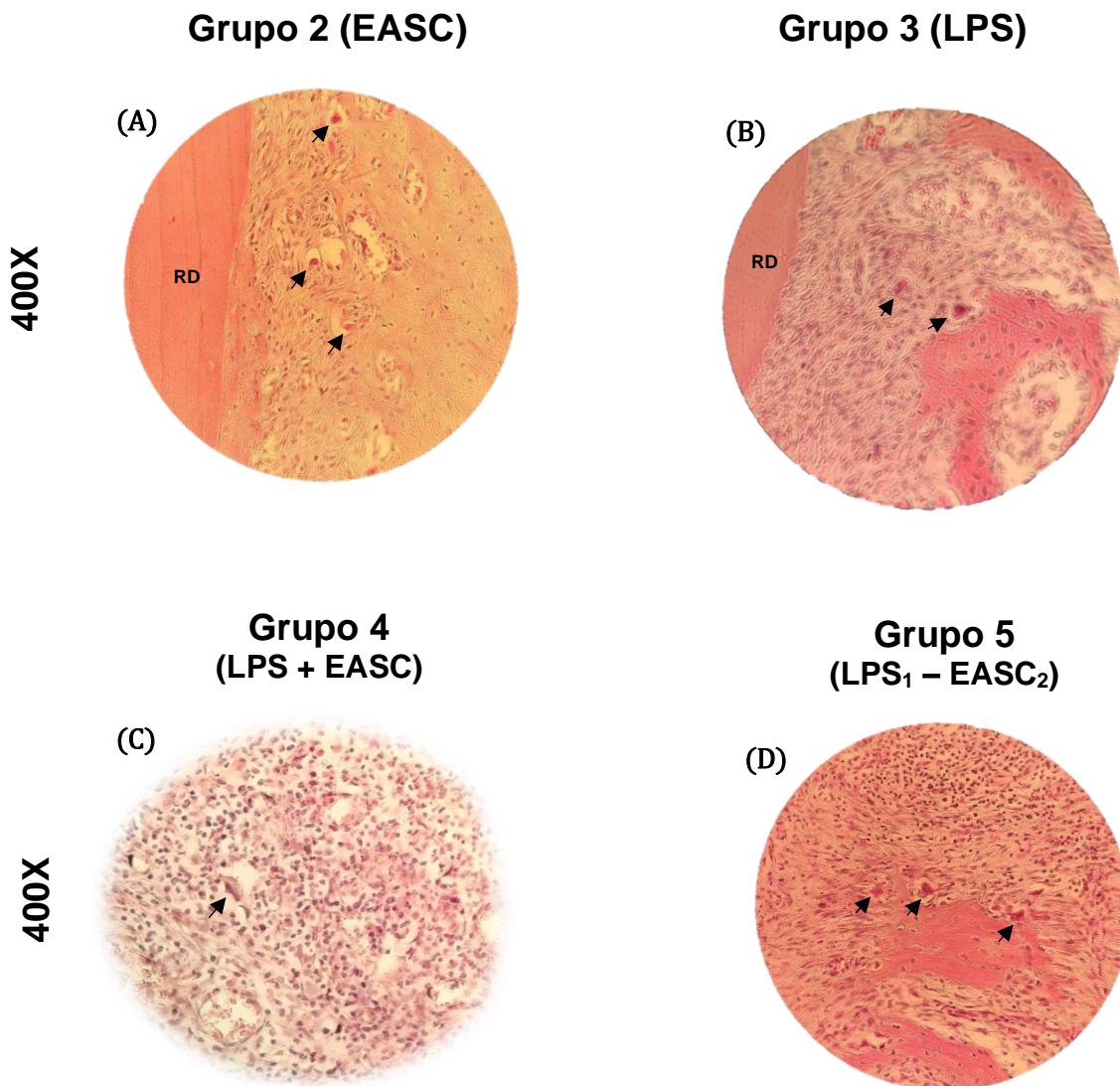
**Figura 22.** Microfotografías de cortes histológicos con tinción Hematoxilina y Eosina (H&E) de **grupos 1, 2 y 3** a 50X, 100X y 400X. Se observan las características morfológicas de la zona interdental (cresta ósea alveolar) entre el primer y segundo molar mandibular. La columna izquierda representa el análisis del grupo 1, la columna de en medio representa el grupo 2 y la columna derecha el grupo 3. CA: cresta alveolar, RD: raíz distal, RM: raíz mesial, D: dentina, P: pulpa dental.



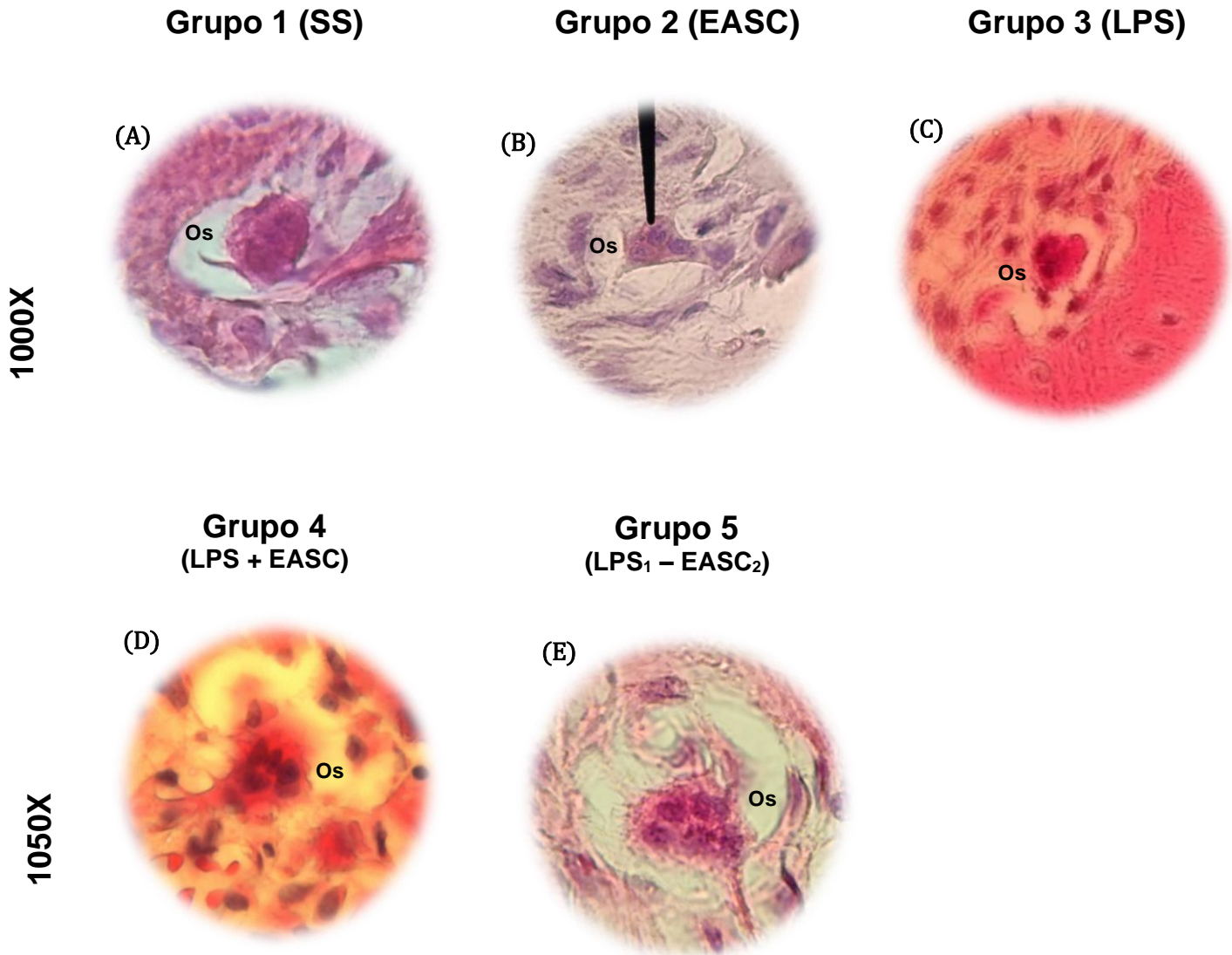
**Figura 23.** Microfotografías de cortes histológicos con tinción Hematoxilina y Eosina (H&E) de **grupos 4** y **5** a 50X, 100X y 400X. Se observan las características morfológicas de la zona interdental (cresta ósea alveolar) entre el primer y segundo molar mandibular. La columna izquierda representa el análisis del grupo 4 y la columna derecha del grupo 5. CA: cresta alveolar, RD: raíz distal, RM: raíz mesial, D: dentina, P: pulpa dental.

### Hallazgos en tinción de H&E

Mediante esta tinción de H&E se lograron observar algunos osteoclastos a lo largo de las raíces radiculares en la mayoría de los grupos (Fig. 24 y 25). La presencia de osteoclastos se logró observar en las mismas zonas en donde fueron detectados mediante la tinción histoquímica TRAP a lo largo de la raíz dental distal del primer molar y raíz mesial del segundo molar.



**Figura 24.** Microfotografías de osteoclastos teñidos mediante Hematoxilina y Eosina (H&E). Se logran observar osteoclastos (señalados con flechas negras) en el grupo 2 (A); grupo 3 (B); grupo 4 (C) y grupo 5 (D). RD: raíz distal, RM: raíz mesial



**Figura 25.** Microfotografías de cortes histológicos teñidos mediante Hematoxilina y Eosina (H&E). Se muestra el análisis de osteoclastos en los 5 grupos del estudio. Se observa un osteoclasto por campo a una magnificación de 1000X (**A-C**) y a una magnificación de 1050X (**D y E**). (**A**) grupo 1; (**B**) grupo 2; (**C**) grupo 3; (**D**) grupo 4; (**E**) grupo 5. Os: osteoclasto



## 7.7 Análisis histológico y cuantitativo del número de osteoclastos (TRAP)

Los resultados obtenidos de la evaluación histológica mediante la tinción histoquímica TRAP de los 5 grupos (n=6 por grupo) se muestran a continuación.

El conteo de osteoclastos se realizó desde la parte más alta de la cresta ósea alveolar siguiendo el tejido óseo a lo largo de la raíz distal del primer molar inferior (Y) en sentido apical (de acuerdo a Wu et al., 2018). Del mismo modo se realizó un conteo en la zona X que corresponde al tejido óseo adyacente a la raíz mesial del segundo molar inferior como se explicó anteriormente (Fig. 15).

### **Grupo 1 (SS 3 días)**

Se obtuvo la media y error estándar de los osteoclastos detectados siendo de  $0.66 \pm 0.13$  células osteoclásticas (Fig. 26). En el análisis histológico las estructuras anatómicas permanecieron sanas en todas las muestras, no se observó alteración de la cresta alveolar y la morfología de la zona se muestra en condiciones fisiológicas (Fig. 27 A, D, G; Fig. 29 A).

### **Grupo 2 (EASC 3 días)**

Se contabilizó un promedio de  $4.66 \pm 0.34$  osteoclastos (Fig. 26). No se observó alteración en la morfología y estructuras anatómicas de interés, todos los tejidos permanecieron sanos en todas las mandíbulas (Fig. 27 B, E, H; Fig. 28 B).

### **Grupo 3 (LPS 3 días)**

Se contabilizó un promedio de osteoclastos de  $8 \pm 0.54$ , habiendo diferencias estadísticamente significativas con el grupo 1 SS ( $P < 0.0001$ ), con el grupo 2 EASC ( $P < 0.001$ ), con el grupo 4 ( $P < 0.0001$ ), y con el grupo 5 ( $P < 0.01$ ) (Fig. 26). Al realizar la evaluación histológica se observó alteración en la cresta alveolar (CA), observándose una pérdida notoria en la estructura ósea de la CA (Fig. 27 C, F, I), y en el centro de la cresta se observan espacios de resorción ósea (Fig. 29 C).

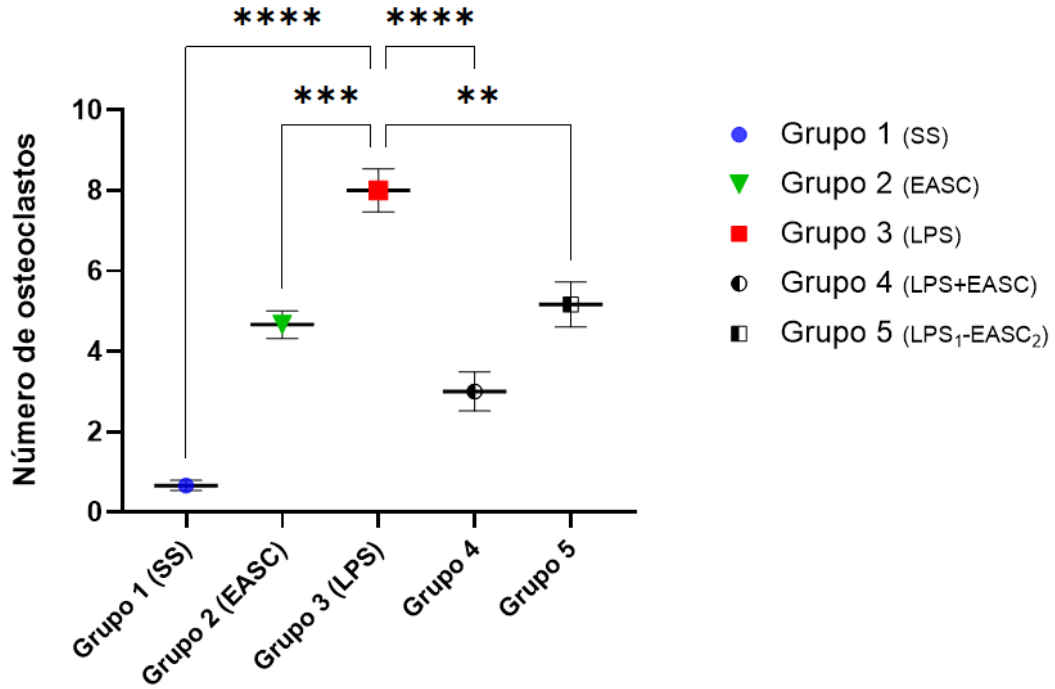


#### **Grupo 4 (LPS+EASC 3 días)**

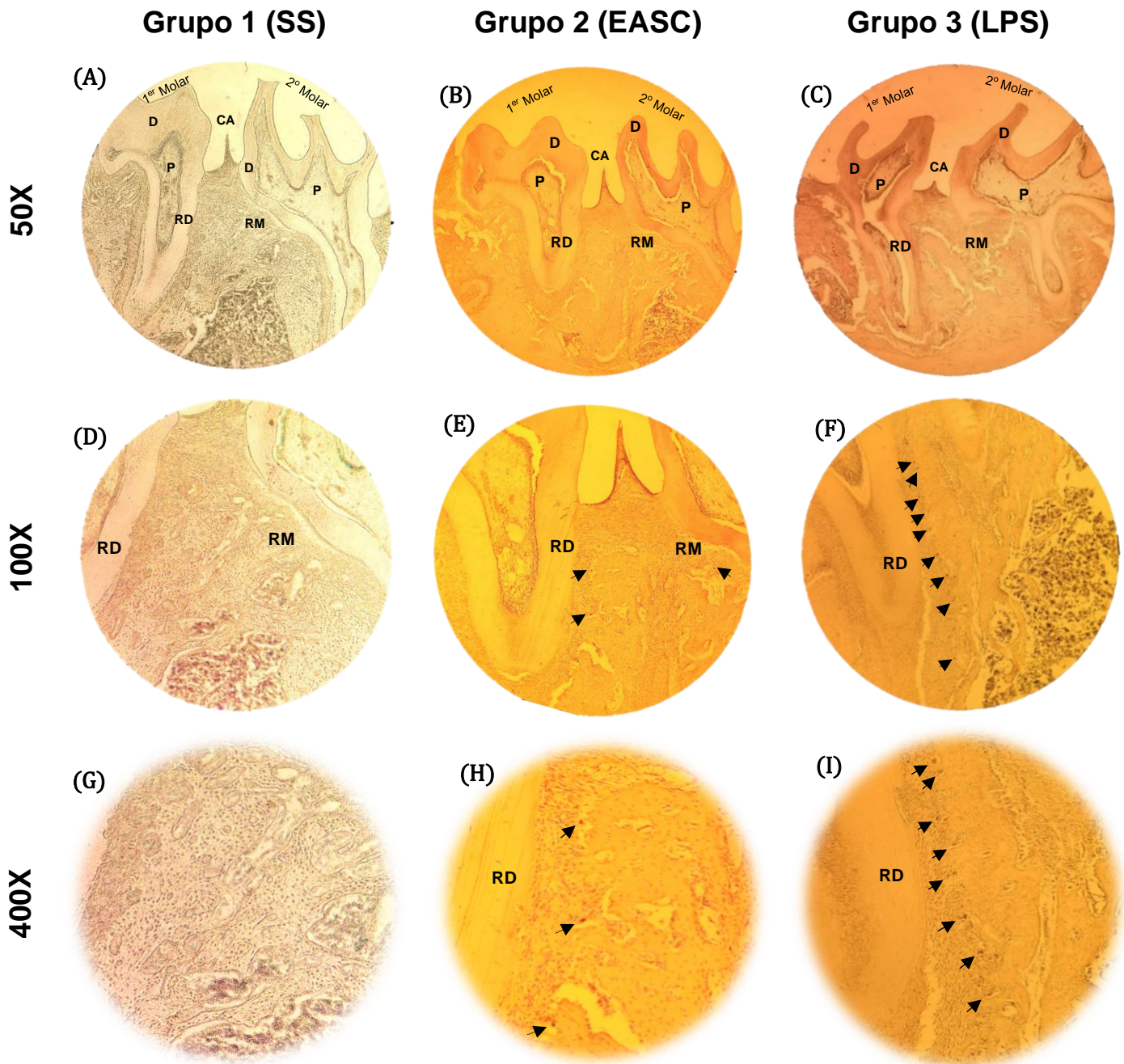
Se obtuvo una media y error estándar de las células osteoclasticas de  $3 \pm 0.49$ , y presentó diferencias estadísticamente significativas con el grupo 1 SS ( $P < 0.01$ ), con el grupo 3 LPS control positivo ( $P < 0.0001$ ), con el grupo 5 ( $P < 0.05$ ), y no hubo diferencia significativa con el grupo 2 EASC ( $P = 0.09$ ) (Fig. 26). En el análisis histológico no se observó una alteración notoria en la altura de la cresta ósea alveolar (Fig. 28 J, L, N; Fig. 29 D). Sin embargo, en algunos cortes histológicos la CA se veía ligeramente más angosta en comparación al grupo 1 SS control negativo, aunque predominó la conservación de la altura de la cresta en todos los análisis histológicos.

#### **Grupo 5 (LPS 3 días – EASC 5 días)**

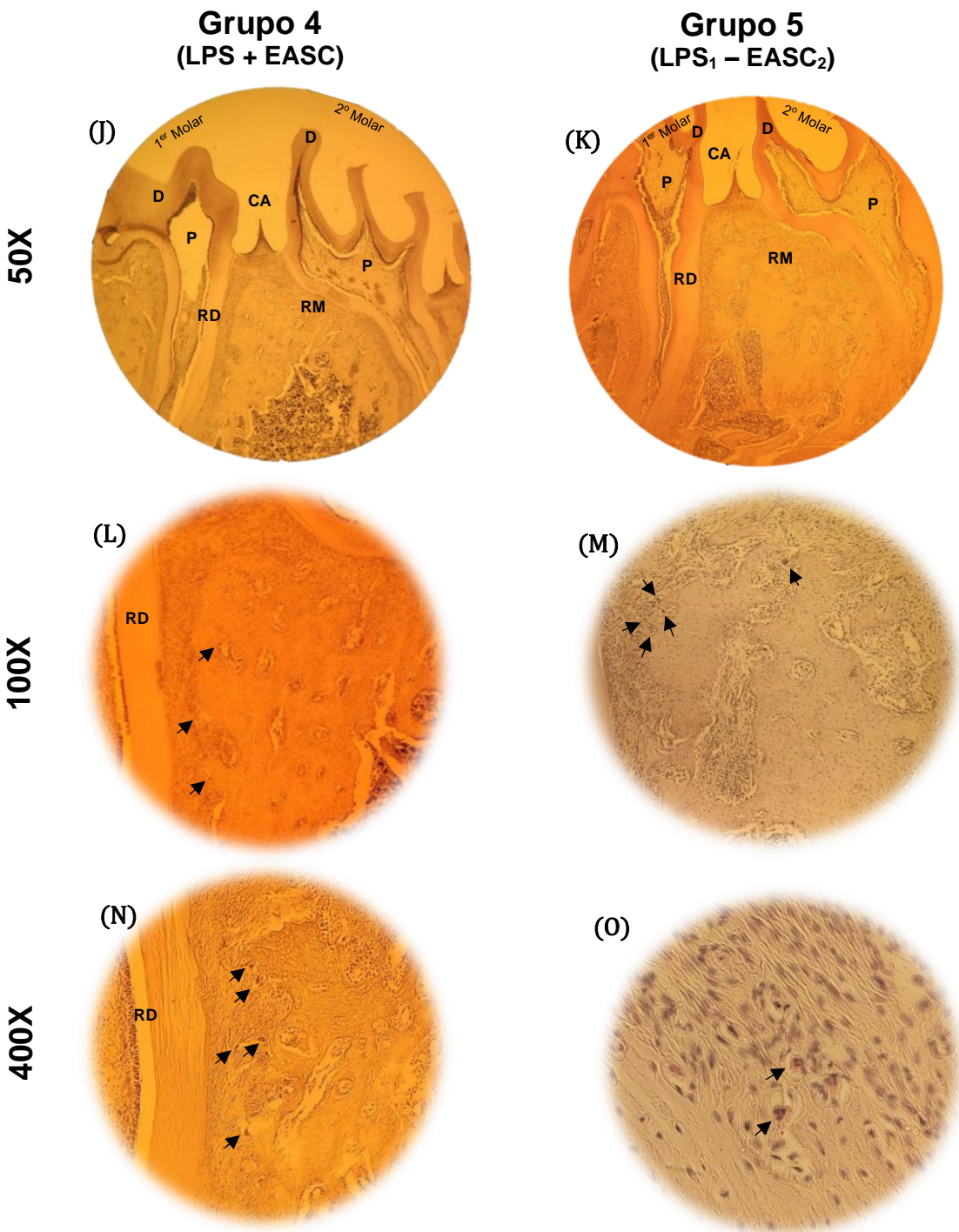
Se obtuvo una media y error estándar del número de osteoclastos de  $5.16 \pm 0.56$  (Fig. 26), presentando diferencias estadísticamente significativas con el grupo 1 SS ( $P < 0.0001$ ), con el grupo 2 LPS control positivo ( $P < 0.01$ ), con el grupo 4 ( $P < 0.05$ ), y no hubo diferencia estadística con el grupo 2 EASC ( $P = 0.92$ ). En el análisis histológico se observó una alteración en la parte más alta de la cresta alveolar, observándose una pérdida ósea notoria (Fig. 28 K, M, O; Fig. 29 E).



**Figura 26.** Medias y errores estándar del número de osteoclastos en los cinco grupos del estudio. \*\*( $P < 0.01$ ), \*\*\*( $P < 0.001$ ), \*\*\*\*( $P < 0.0001$ )



**Figura 27.** Microfotografías de cortes histológicos teñidos mediante técnica histoquímica TRAP de **grupos 1, 2 y 3** a 50X, 100X y 400X. Se observan las características morfológicas de la zona interdental (cresta ósea alveolar) entre el primer y segundo molar mandibular. Los osteoclastos teñidos de rojo están señalados con flechas negras. CA: cresta alveolar, RD: raíz distal, RM: raíz mesial, D: dentina, P: pulpa dental.



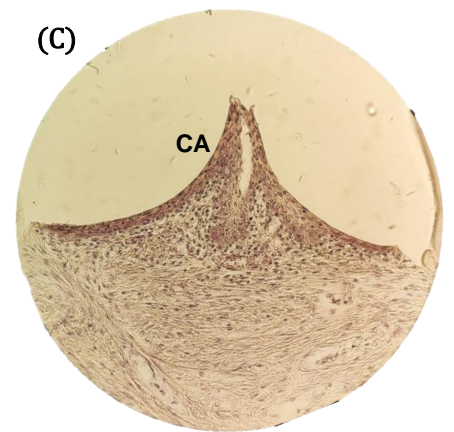
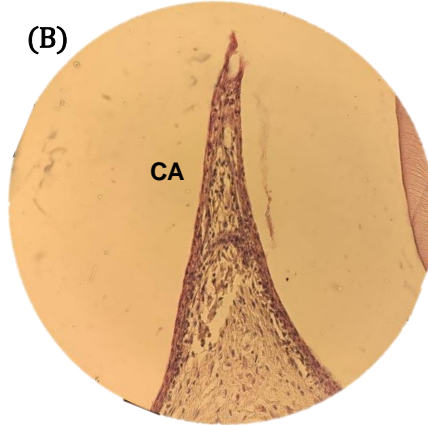
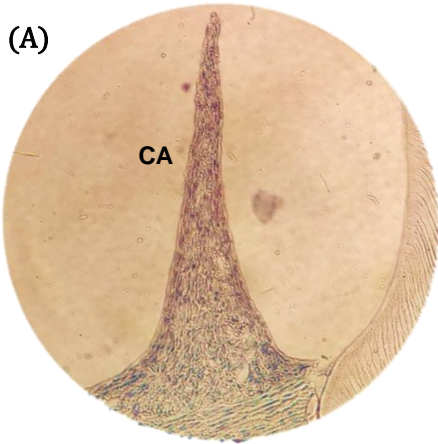
**Figura 28.** Microfotografías de cortes histológicos teñidos mediante técnica histoquímica TRAP de **grupos 4** y **5** a 50X, 100X y 400X. Se observan las características morfológicas de la zona interdental (cresta ósea alveolar) entre el primer y segundo molar mandibular. Los osteoclastos teñidos de rojo están señalados con flechas negras. CA: cresta alveolar, RD: raíz distal, RM: raíz mesial, D: dentina, P: pulpa dental.

**Grupo 1 (SS)**

**Grupo 2 (EASC)**

**Grupo 3 (LPS)**

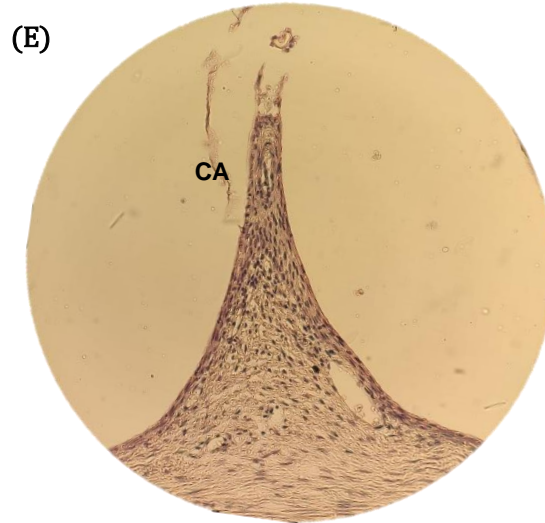
400X



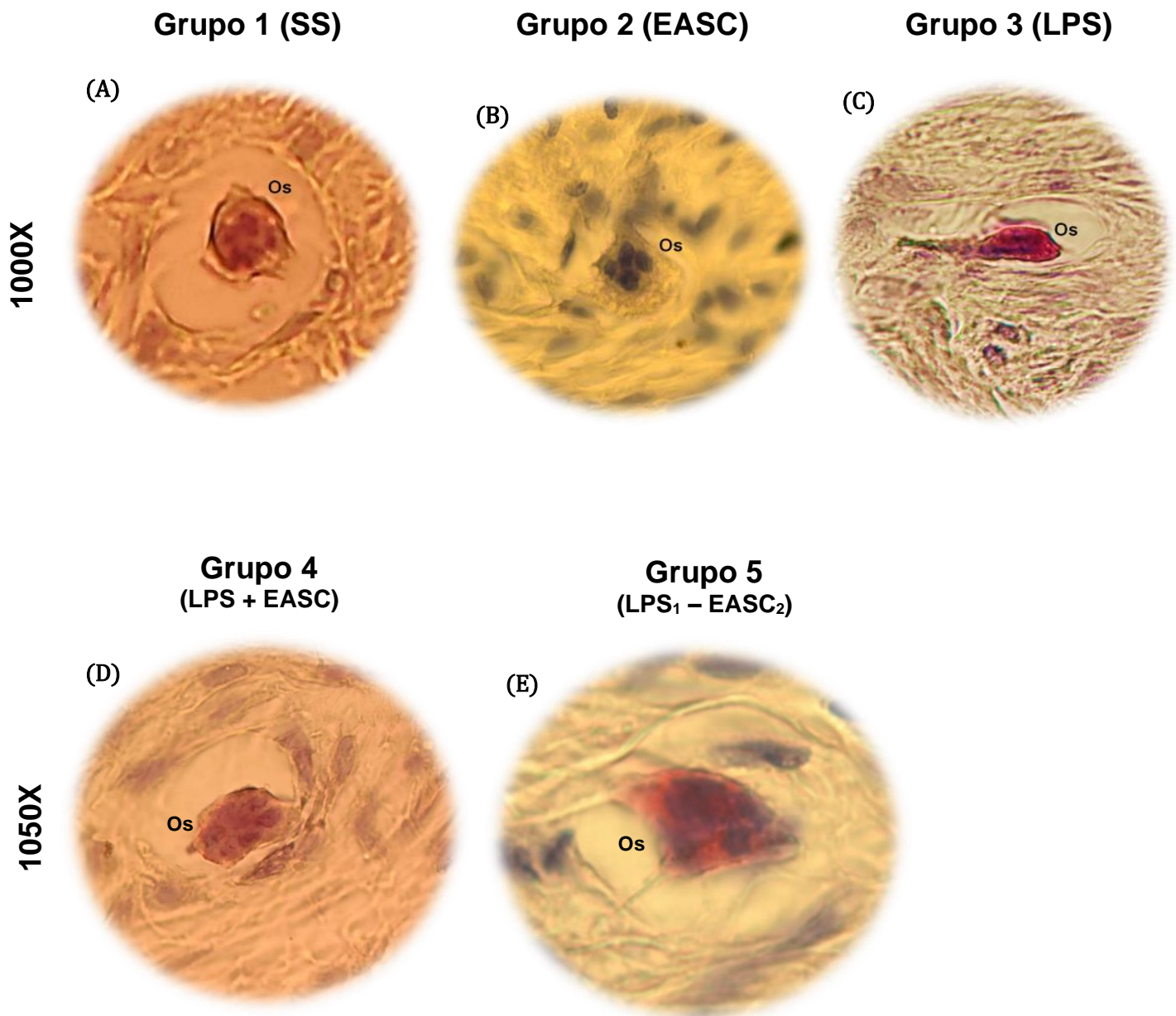
**Grupo 4  
(LPS + EASC)**

**Grupo 5  
(LPS<sub>1</sub> - EASC<sub>2</sub>)**

1000X



**Figura 29. Cresta ósea alveolar.** Microfotografías de cortes histológicos teñidos mediante técnica histoquímica TRAP de **grupos 1, 2 y 3**. Las imágenes **A, B y C** muestran las características morfológicas de la cresta alveolar en los tres grupos (400X). Nótese el daño y pérdida ósea de la cresta alveolar en el grupo 3 LPS (**C**). En las imágenes **D, E y F** se observan osteoclastos activos de los grupos 1, 2 y 3, correspondientemente, a una magnificación de 1000X. CA: cresta alveolar, Os: osteoclasto.



**Figura 30.** Microfotografías de osteoclastos multinucleados teñidos mediante técnica histoquímica TRAP. Se observan las células osteoclásticas multinucleadas en los distintos grupos de estudio. Se logran ver las lagunas de resorción ósea en la circunferencia de los osteoclastos. **A-C** magnitud de 1000X, **D** y **E** magnitud de 1050X. Os: osteoclasto.



## 8. DISCUSIÓN

En el presente estudio se evaluó por primera ocasión un extracto polifenólico de la planta *Spathodea campanulata* en un modelo animal con periodontitis inducida por LPS, con la finalidad de conocer sus efectos sobre la diferenciación y actividad de osteoclastos.

### Descalcificación de muestras

La primera parte del estudio fue estandarizar la descalcificación de las muestras, cuyas metodologías fueron comparables con diversos autores (Liu et al., 2017; Savi et al., 2017; Hatta et al., 2014; Sanjai et al., 2012). Debido a que los dientes son un tejido complejo, compuesto por un componente orgánico blando como la pulpa dental, y un componente mineralizado inorgánico duro circundante que incluye hueso alveolar, dentina, cemento y esmalte, la elección de las técnicas de procesamiento histológico óptimas para procesar tejidos tan complejos es fundamental para garantizar la preservación de la morfología reproducible con el mínimo de daño tisular. La evaluación histológica de tejidos altamente mineralizados generalmente requiere descalcificación como paso inicial para eliminar los iones/sales de calcio en el tejido calcificado para realizar la inclusión en parafina, seccionar y teñir los tejidos para el análisis histológico. Los agentes descalcificantes ampliamente utilizados han sido el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y el ácido nítrico a diferentes concentraciones (Liu et al., 2017). Los efectos de los agentes descalcificantes están influenciados por la concentración de la solución, la temperatura, el tiempo de exposición y la tasa de penetración. La descalcificación ácida actúa a través de un sistema de difusión que forma sales de calcio solubles, mientras que la descalcificación del EDTA actúa uniendo los iones de calcio que forman reacciones EDTA-Ca estables (Savi et al., 2017). El uso inadecuado de un agente descalcificante puede dañar la estructura tisular, a menudo es observado por la pérdida de tinción citoplasmática y nucleica (Savi et al., 2017).

En el presente estudio se utilizaron dos métodos de descalcificación para estandarizar el método a seguir en el procesamiento de las muestras. En un grupo 1 con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 10% pH 7, y en un grupo 2 con ácido nítrico al 5%. En las microfotografías obtenidas de la tinción de H&E (Fig. 17), se logró observar que



al utilizar el ácido nítrico 5% se obtuvo una descalcificación rápida en 48 horas, a diferencia del EDTA al 10% que se obtuvo en 8 semanas. Sin embargo, en los dientes y mandíbulas descalcificadas con EDTA 10%, se observó histológicamente una excelente conservación de la morfología del tejido (Fig. 17 A). Por otro lado, el tejido descalcificado con ácido nítrico 5% presentó un daño notorio en todos los tejidos circundantes de diente y hueso mandibular en el análisis microscópico (Fig. 17 B), lo que impide valorar con detalle las zonas de la cresta alveolar (CA), ligamento periodontal (LP) y hueso trabecular (HT). Por lo tanto, el método de descalcificación con EDTA 10%, permitió ver a gran detalle la morfología y estructuras anatómicas tanto de diente como del hueso, con una conservación óptima del tejido, permitiendo un mejor análisis histopatológico. La tinción H&E demostró que diferentes soluciones descalcificantes afectaron la intensidad de tinción de las secciones del tejido. El método con EDTA 10% pH 7.0, dio como resultado el mejor brillo y uniformidad de tinción en relación con el ácido nítrico 5%. Como era de esperar, observamos una excelente conservación de la morfología del tejido celular con EDTA al 10%. El único inconveniente de este método es el tiempo necesario para lograr la desmineralización completa. Es probable que esto esté relacionado con la formación de un sistema amortiguador físico en el que los iones de calcio se eliminan de la capa externa a la capa interna mediante el agotamiento del tamaño del cristal de hidroxiapatita (Liu et al., 2017). Por otro lado, el tiempo que tomó en completarse la descalcificación en EDTA 10% fue mayor a las 4 semanas que se ha reportado por diversos autores (Savi et al., 2017; Wu et al., 2018). Este suceso puede deberse a que, en las metodologías mencionadas, los autores realizaron lavados de las muestras durante 24 h en agua corriente posteriormente al ser retiradas de formaldehído, permitiendo una mejor penetración del EDTA en el tejido. En el presente estudio el proceso de descalcificación se realizó a temperatura ambiente, considerado como el “estándar de oro”, siendo la técnica más citada en la literatura, pero tiene la desventaja asociada de un tiempo de descalcificación prolongado. Algunos autores han realizado la descalcificación con EDTA 10% aumentando la temperatura a 37°C durante todo el proceso (Savi et al., 2017), o a una temperatura de 4°C en refrigeración (Liu et al., 2017). Sin embargo, Liu et al. (2017)



mencionan que el tiempo de descalcificación reportado para EDTA varía de 2 a 4 meses, lo cual concuerda con nuestros resultados.

### Antecedentes de metabolitos en EASC

La dosis utilizada del EASC para administrar a las ratas se basó en estudios anteriores del equipo de trabajo (Escamilla-Barrera 2019), en donde obtuvieron una dosis optima hipoglucemiante a 300 mg/Kg en ratas diabéticas. A esta dosis no presentaron efectos adversos y se encontraron las siguientes cantidades de metabolitos del EASC (tabla 2):

**Tabla 2. Metabolitos secundarios en extracto acuoso de *Spathodea campanulata* (EASC)**

|             | <b>Flavonoides</b>     | <b>Fenoles</b>           | <b>Polifenoles</b>     |
|-------------|------------------------|--------------------------|------------------------|
|             | (mg QCE/g extracto)    | (mg GAE/g extracto)      | (mg EPG/g extracto)    |
| <b>EASC</b> | <b>190.41 ± 0.39 a</b> | <b>1373.23 ± 52.91 b</b> | <b>311.16 ± 2.59 c</b> |

Tomada de Escamilla-Barrera, 2019

QCE: equivalentes de quercetina;

GAE: equivalentes de ácido gálico; EPG: equivalentes de floroglucinol

$\bar{X} \pm DE$ : Media y desviación estándar

Es importante conocer las concentraciones de los compuestos secundarios del EASC, como son los flavonoides, fenoles y polifenoles, a los cuales se les atribuyen diversos beneficios en la salud (Al Mamun et al., 2020; Orozco-Montes et al., 2019). Estas concentraciones encontradas en EASC son comparables con las de dos plantas diferentes, pero de la misma familia Bignoniaceae: *Jacaranda mismosifolia* (Aguirre-Becerra et al, 2020) y *Tecoma stans* (Anand & Basavaraiu 2021).



## Administración de LPS

La segunda parte del estudio fue inducir la periodontitis en ratas mediante la administración de LPS en el tejido gingival, cuya metodología es comparable con otros autores (Jeong-Hyon et al., 2020; Kantarci et al., 2015; Cheng et al., 2010; Zhang et al., 2008). El desarrollo de la periodontitis involucra mecanismos complejos asociados con las bacterias y las modulaciones inmunes; por lo tanto, la periodontitis experimental que inducimos en ratas en este estudio tiene ciertas limitaciones (Graves et al., 2008). La inyección de LPS, por ejemplo, es una simplificación de los mecanismos de la enfermedad (Liu et al., 2008; Garcia de Aquino et al., 2009). Sin embargo, el LPS puede inducir inflamación y daño tisular a través de la inducción de citocinas, como la IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-6, y estas citocinas podrían inducir aún más la producción de mediadores secundarios, lo que resultaría en la amplificación de la respuesta inflamatoria que conduce a la destrucción del tejido conectivo y la reabsorción ósea osteoclástica (Jeong-Hyon et al., 2020). Sin embargo, si se logró generar la periodontitis en el presente modelo animal en rata de manera localizada en el sitio de inyección de LPS, lo cual permitió evaluar los efectos del EASC en esta enfermedad periodontal.

## Temperatura rectal

Al medir las temperaturas ( $^{\circ}\text{C}$ ) de las ratas, se observó que las temperaturas se mantuvieron en un rango de  $37.4 - 38.4^{\circ}\text{C}$  durante los 9 días del estudio. Esto concuerda con Gudjonsson (1932), quien reportó una temperatura rectal fisiológica en ratas de  $37-38.5^{\circ}\text{C}$ , y que suele ser muy inestable. Estas variaciones se deben a que la temperatura de una rata depende de: la situación psicológica (emocional / estrés) de la rata; los sitios anatómicos donde se mide la temperatura; y el tiempo solar cuando se mide la temperatura (ritmo circadiano) (Briese 1998). Para medir la temperatura de una rata normalmente es necesario manipular al animal, es decir, sacar al animal de su jaula e introducirle un termómetro en el colon (o un termistor o termopar en una cánula guía intracraneal). Se ha demostrado que este procedimiento es suficiente para producir cambios inmediatos en la temperatura inicial. Por ejemplo, Miles (1962) registró la temperatura en ratas mediante transmisores de radio. En ratas no manipuladas, la temperatura diurna osciló en  $35.7^{\circ}\text{C}$  y la temperatura nocturna fue  $2^{\circ}\text{C}$  más alta. Por otro



lado, tomar la temperatura rectal cada hora suprimió el ritmo circadiano de la temperatura intraperitoneal. La temperatura se mantuvo alrededor de 38°C día y noche. Asimismo, Briese (1965) demostró en un grupo de ratas sanas que, al colocarlas en un nuevo entorno aumentó la temperatura rectal alrededor de 1.5°C. Briese (1970; 1985) mostró que las ratas retiradas de su jaula de origen, a las que se les midió la temperatura rectal 20 minutos y se colocaron en una jaula nueva, mostraron un aumento de la temperatura de aproximadamente 1.3°C. Este aumento de la temperatura disminuyó con el tiempo (9-10 semanas) con la repetición del procedimiento y aumentó abruptamente con la presentación de nuevos estímulos y se denominó hipertermia emocional (Briese 1998). En consecuencia, como expresó Miles (1962), "cualquier medición de la temperatura corporal que requiera manipular al animal sería inexacta". En el presente estudio, las ratas eran llevadas a un cuarto de prueba en donde fueron manipuladas para realizar cada etapa del estudio. Por lo tanto, nuestros datos obtenidos en todos los grupos concuerdan con lo antes mencionado de otros autores, acerca de las causas de variaciones en temperatura corporal, debido a la manipulación necesaria para lograr obtener el peso, temperatura rectal, administrar el extracto, anestesarlas y administrar el LPS. En los 5 grupos del estudio hubo variaciones en las temperaturas desde el día 1 hasta el día 9 del experimento. Sin embargo, no hubo diferencia significativa desde el día 1 y 9 en cada grupo. Este estudio es el primero de nuestro conocimiento en evaluar la temperatura rectal en ratas Sprague-Dawley con periodontitis inducida por LPS, y administrando un extracto acuoso de *Spathodea campanulata*.

### **Peso corporal de las ratas**

Se obtuvo el peso corporal (g) de todas las ratas del estudio durante los 9 días de experimentación como se mostró en la figura 20. El grupo 1 (SS) presentó diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.0001$ ) en el día 9 con todos los demás grupos. El grupo 1 fue aumentando de peso cada día de forma gradual, y en todos los demás grupos en el segundo día hubo una disminución de peso. Esto puede deberse a que el grupo 1 al no haber sido expuesta la encía con LPS como en el grupo 3, 4 y 5, no se causó el mismo trauma en el tejido gingival y, por lo tanto, la masticación de alimentos no se modificó. Por otro lado, también es probable que el grupo 1 al no haber ingerido el



extracto acuoso, rico en polifenoles y flavonoides no tuvieron efecto en el metabolismo sistémico, que se discutirá más adelante. En los grupos 3, 4 y 5 hubo una disminución en la ingesta de alimento posterior a la administración de LPS, probablemente por la inflamación local del tejido gingival, causando molestias en las ratas en el proceso de masticación, y como consecuencia un menor peso corporal. Respecto a las variaciones en el peso, nuestros resultados concuerdan con lo reportado previamente por Zhong et al. (2018).

El grupo 2 (EASC) tuvo en promedio el menor peso en relación a los demás grupos. Existen distintos factores para explicar este resultado; una posible explicación es que no todas las ratas de los 5 grupos comenzaron exactamente en el mismo peso, por lo tanto, es de esperarse una variación en los pesos entre los distintos grupos, siendo este *grupo* 2 el que tuvo la camada de ratas con el menor peso (200g) al comenzar el estudio. Sin embargo, otra posible explicación del porqué este grupo 2 mantuvo un menor peso durante el estudio, es debido a que se sabe que los polifenoles, como los que contiene la *Spathodea campanulata* (Escamilla-Barrera et al., 2018), imparten una función contra la obesidad a través de varios mecanismos (Cory et al., 2018). Los mecanismos a través de los cuales los polifenoles imparten funciones antiobesidad, ya sea individualmente o en cierta combinación, incluyen la inhibición de enzimas (amilasa, glucosidasa, lipasa), la estimulación del gasto energético, la supresión del apetito, la inhibición de la diferenciación de adipocitos, la regulación del metabolismo de los lípidos y la modulación de la microbiota intestinal (Liu et al., 2020; Singh et al., 2020; Rodríguez-Perez et al., 2017). Sin embargo, hace falta realizar estudios controlados para evaluar los mecanismos antiobesidad que pueda presentar esta planta.

### **Inflamación gingival**

Se valoraron aspectos clínicos en la zona donde se administró el LPS en el tejido gingival. Se evaluó el grado de inflamación gingival utilizando el índice de Löe (1967) en las ratas del grupo 1, 3, 4 y 5. En el grupo 3 (LPS), se generó una inflamación grado 3 a las 24h post administración de LPS, persistiendo a las 48h. Se revisó el grado de inflamación únicamente los primeros 3 días del experimento y el día 9 de la eutanasia, debido a que solo fueron 3 días en los cuales se les indujo anestesia general a los animales para la



administración del LPS. Los próximos 5 días del experimento no fueron anestesiados los animales, por lo tanto, no fue posible valorar la inflamación gingival sin anestesia general. El día de la eutanasia de este grupo 3 (LPS 3 días), se realizó la última valoración de inflamación gingival, en donde hubo un grado 0 de inflamación, en donde hubo una resolución del proceso inflamatorio de forma fisiológica.

En el grupo 4 (LPS 3 días + EASC 3 días), hubo una inflamación grado 2 a las 24h post coadministración LPS+EASC, y a las 48h disminuyó a grado 0. Esto probablemente se debe a que los metabolitos secundarios del EASC modularon el sistema inmune y hubo una resolución de la inflamación en menor tiempo. Lo cual ha sido reportado por Emmanuel et al. (2010), en donde investigaron la actividad antiinflamatoria de *Spathodea campanulata* en una inflamación aguda inducida por carragenina en ratas, mostrando una importante actividad antiinflamatoria.

El grupo 5 (LPS 3 días - EASC 5 días) presentó una inflamación grado 3 a las 24h y 48h post LPS, y finalmente en el día 9 de eutanasia hubo un grado 0 (ausencia de inflamación clínica). Los primeros 2 días se comportó muy semejante al grupo 3 LPS en relación a la inflamación gingival, debido a que en este grupo 5 se administró el extracto a partir del cuarto día del experimento. En todos los grupos se valoró la inflamación gingival el día de la eutanasia (día 9), obteniendo un grado 0 en todos los animales.

### **Infiltrado inflamatorio H&E**

Para confirmar los efectos antiinflamatorios de *Spathodea campanulata* en la periodontitis experimental, evaluamos el tejido periodontal por H&E para valorar el infiltrado inflamatorio de neutrófilos. En un estudio previo se valoró infiltrado inflamatorio en los tejidos periodontales con periodontitis en rata (Mohammad et al., 2022). En nuestro estudio se logró observar el infiltrado inflamatorio en los grupos donde se administró el LPS (grupo 3,4 y 5), habiendo un mayor proceso inflamatorio en el control positivo grupo 3 LPS ( $35.83 \pm 5.97$ ). Esto se debe a que en el grupo 3 LPS no se administró el EASC y se corroboró la inducción de periodontitis mediante LPS. En el grupo 4 (LPS y EASC 3 días) hubo menor infiltrado inflamatorio ( $10.66 \pm 1.17$ ), y en el grupo 5 (LPS 3 días-EASC 5 días) presentó infiltrado inflamatorio de  $14.66 \pm 2.94$ . Esta



presencia de menor inflamación se le puede atribuir a los componentes del EASC, debido a que se sabe que los polifenoles pueden regular la inmunidad, la producción de citocinas y expresión de genes para contrarrestar los procesos inflamatorios (Yahfoufi et al., 2018). Por otro lado, en el grupo 1 (SS 3 días) y grupo 2 (EASC 3 días) presentaron bajo infiltrado inflamatorio ( $13.5 \pm 0.55$  y  $11.16 \pm 1.33$  respectivamente), debido a que no fueron administrados con LPS. Se sabe que los neutrófilos polimorfonucleares se acoplan al tejido inflamado donde, más que otras células, contribuyen a generar especies reactivas de oxígeno (ROS), que a su vez provocan estrés oxidativo y lipoperoxidación de membrana, amplificando así la respuesta inflamatoria (Gugliandolo et al., 2019).

### **Osteoclastos TRAP**

Posteriormente, investigamos los efectos del EASC en la formación de osteoclastos y la resorción ósea alveolar. Primero, determinamos el número de células de osteoclastos mediante tinción TRAP, ya que TRAP es un marcador citoquímico importante de osteoclastos. El grupo 1 SS presentó varios osteoclastos en la superficie del hueso alveolar, lo que correspondía al metabolismo óseo normal (Wu et al., 2018; Sanbe et al., 2007). Por otro lado, el grupo 3 LPS presentó muchos osteoclastos positivos para TRAP en ambos segmentos, especialmente en los segmentos de la línea Y (raíz distal del primer molar). Por lo tanto, separamos los segmentos de la Línea X (raíz mesial del segundo molar) y la Línea Y (raíz distal del primer molar) (Wu et al., 2018) para evaluar el efecto del EASC en diferentes regiones. Como era de esperarse, el número de células positivas para TRAP en los grupos 4 (LPS y EASC 3 días) y 5 (LPS 3 días-EASC 5 días) fue significativamente menor que el del grupo 3 LPS ( $8 \pm 0.54$ ). Curiosamente, en el segmento de la línea X, todos los grupos con LPS tenían un número significativamente mayor de células osteoclásticas en comparación con los grupos control 1 (SS) y 2 (EASC). De acuerdo con los hallazgos histológicos de la tinción TRAP, el análisis microscópico mostró que los grupos 4 y 5 tenían menos reabsorción ósea alveolar en relación al grupo 3 LPS. Estos resultados corresponden con estudios de otros autores, en donde obtuvieron mayor cantidad de osteoclastos en el grupo control positivo LPS, obteniendo en promedio 12 células osteoclásticas (Cheng et al., 2010). En otro estudio



en donde se generó la periodontitis por ligadura, en el grupo control positivo se obtuvo un promedio de  $11.7 \pm 1.3$  células osteoclasticas (Wu et al., 2018).

El factor crítico en la reabsorción ósea es la relación RANKL/OPG. En la periodontitis, RANKL está aumentado, mientras que la osteoprotegerina (OPG) está disminuida en comparación con el tejido periodontal sano, resultando en un aumento de la relación RANKL/OPG (Belibasakis et al., 2012). Como se explicó anteriormente en la sección del planteamiento del problema (paginas 20-23), el papel de los polifenoles reduce la diferenciación de osteoclastos, debido que inhiben el RANKL, TNF- $\alpha$ , regula la OPG y el RANKL, disminuyendo de esta forma la maduración acelerada de osteoclastos y la reabsorción ósea (Al Mamun et al., 2020; Wu et al., 2018). Por lo tanto, la posible inhibición de la expresión de RANKL por parte de los componentes del EASC puede ser un mecanismo importante subyacente a la reducción en la diferenciación, formación y pérdida ósea de los osteoclastos en la periodontitis experimental.

Por otro lado, el estrés oxidativo se refiere al daño oxidativo producido por los radicales libres y se ha asociado con muchas enfermedades, incluida la periodontitis, habiendo una producción excesiva de ROS en esta patología. El desequilibrio entre los radicales libres y los antioxidantes localmente da como resultado la destrucción de los tejidos periodontales. Los flavonoides son compuestos naturales conocidos por diversas acciones, como propiedades antiinflamatorias y antioxidantes (Rao et al., 2022).

Respecto al efecto de los polifenoles como reguladores de la inmunidad, la producción de citocinas y expresión de genes. Se sabe que inactivan al factor NF- $\kappa$ B (factor nuclear kappa activador de células B) y modulan las vías de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPk) y los ácidos araquidónicos. Los compuestos polifenólicos inhiben la fosfatidilinositida 3-cinasas/proteína cinasa B (PI3K/AkT), el inhibidor de la cinasa kappa cinasa/c-Jun amino-terminal cinasas (IKK/JNK), el objetivo de mamíferos del complejo de rapamicina 1 (mTORC1), que es un complejo proteico que controla la síntesis de proteínas y JAK/STAT. Pueden suprimir el receptor de tipo toll (TLR) y la expresión de genes proinflamatorios. Su actividad antioxidante y su capacidad para inhibir las enzimas involucradas en la producción de eicosanoides también contribuyen a sus propiedades



antiinflamatorias. Inhiben ciertas enzimas involucradas en la producción de ROS de especies reactivas de oxígeno como la xantina oxidasa y la NADPH oxidasa (NOX), mientras que regulan al alza otras enzimas antioxidantes endógenas como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y la glutatión (GSH) peroxidasa (Px). Además, inhiben la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), la ciclooxigenasa (COX) y la lipoxigenasa (LOX), lo que conduce a una reducción de la producción de prostaglandinas y leucotrienos y al antagonismo de la inflamación. Los efectos de estos compuestos biológicamente activos sobre el sistema inmunitario están asociados con beneficios de salud extendidos para diferentes enfermedades inflamatorias crónicas. (Yahfoufi et al., 2018). Los estudios de extractos y compuestos de plantas muestran que los polifenoles pueden desempeñar un papel benéfico en la prevención y el progreso de enfermedades crónicas relacionadas con la inflamación como en el caso de este trabajo, la periodontitis

Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que el EASC puede desempeñar un papel importante en la inhibición de la resorción ósea alveolar, posiblemente mediante la supresión de los mediadores inflamatorios que causan la osteoclastogénesis. Este estudio refuerza la teoría de que el EASC puede actuar directamente sobre los osteoclastos. Se requieren estudios adicionales para comprender mejor los efectos del EASC en la enfermedad periodontal y para determinar si puede actuar directamente sobre los osteoclastos en la periodontitis experimental inducida por LPS.

Debido al extenso potencial de los polifenoles se han recomendado en la dieta para el tratamiento de la periodontitis (Basu et al., 2018) y para reducir la placa dental (Kurek-Górecka et al., 2022). Con base en estudios clínicos sobre las propiedades bioquímicas de las formulaciones de polifenoles, existe una línea emergente de terapias naturales para la periodontitis que puede maximizar y mejorar la salud bucal. Por ejemplo, la administración de polifenoles de té, manteniendo el té verde o negro en la boca durante 2 a 5 minutos, aumenta la capacidad antioxidante de la saliva, y el uso diario de dos toronjas frescas durante 2 semanas aumenta la capacidad fagocítica de los leucocitos polimorfonucleares dentro del líquido crevicular de la encía (Staudte et al., 2005).



Este estudio es el primero de nuestro conocimiento en evaluar un extracto acuoso de *Spathodea campanulata* para reducir la diferenciación y actividad de los osteoclastos en un modelo animal con periodontitis inducida con LPS.

## 9. CONCLUSIÓN

La administración del EASC reduce la cantidad de células osteoclásticas en ratas con periodontitis inducida con LPS. Asimismo, disminuye la inflamación de tejidos periodontales y la reabsorción ósea, por lo tanto, el EASC tiene un potencial preventivo y terapéutico en el tratamiento de la enfermedad periodontal.

## 10. PERSPECTIVAS

- Evaluar las concentraciones de citocinas proinflamatorias expresadas en la periodontitis antes, durante y después de la administración del extracto acuoso de hojas de *Spathodea campanulata*.
- Evaluar el efecto antimicrobiano del extracto acuoso de hojas y flores de *Spathodea campanulata* en bacterias causantes de enfermedad periodontal.
- Identificar los beneficios de la administración local de *Spathodea campanulata* en un modelo animal con periodontitis.



## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelmonem, HM., Khashaba, OH., Al-Daker MA., & Moustafa, MD. (2014). Effects of aloe vera gel as an adjunctive therapy in the treatment of chronic periodontitis: A clinical and microbiological study. *Mans J Dent*, 1(3), 11-19.
- Aguirre-Becerra, H., Pineda-Nieto, S. A., García-Trejo, J. F., Guevara-González, R. G., Feregrino-Pérez, A. A., Álvarez-Mayorga, B. L., & Rivera Pastrana, D. M. (2020). *Jacaranda* flower (*Jacaranda mimosifolia*) as an alternative for antioxidant and antimicrobial use. *Heliyon*, 6(12), e05802. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05802>
- Al Mamun, A., Asim, M.H., Sahin, A.Z., & Al-Bari, A.A. (2020). Flavonoids compounds from *Tridax procumbens* inhibit osteoclast differentiation by down-regulating c-Fos activation. *J Cell Mol Med*, 24, 2542-2551. doi:10.1111/jcmm.14948
- Albiero, M.L., Amorim, B.R., Martins, L., Casati, M.Z., Sallum, E.A., Nociti JR, F.H., & Silvério, K.G. (2015). Exposure of periodontal ligament progenitor cells to lipopolysaccharide from *Escherichia coli* changes osteoblast differentiation pattern. *J Appl Oral Sci*, 23(2), 145-152. doi: 10.1590/1678-775720140334
- Al-Hebshi, N.Z.N., & Skaug, N. (2006). Current concepts on dental plaque and the microbiology of periodontitis and dental caries - A concise review. *Pakistan Oral & Dent Jr*, 26(1), 137-144.
- Alley, C.D., O'Neal, R.B., Strong, S.L., Scheidt, M.J., Van Dyke, T.E., & McPherson, J.C. (1991). The effect of chlorhexidine treatment of root surfaces on the attachment of human gingival fibroblast in vitro. *Journal of Periodontology*, 62, 434-438.
- Ambili, R., Janam, P., Saneesh Babu, P.S., Prasad, M., Vinod, D., et al. (2017). An ex vivo evaluation of the efficacy of andrographolide in modulating differential expression of transcription factors and target genes in periodontal cells and its potential role in treating periodontal diseases. *J Ethnopharmacol*, 196, 160–167. doi: 10.1016/j.jep.2016.12.029
- Anand, M., & Basavaraju, R. (2021). A review on phytochemistry and pharmacological uses of *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth. *Journal of ethnopharmacology*, 265, 113270. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113270>
- Annie, V.I., Jayan, J.M., Majo, A., Arun, J.K., Ajithkumar, P.K., et al. (2015). Management of chronic periodontitis using subgingival irrigation of ozonized water: A clinical and microbiological study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 9(8), 29-33.
- Ara, T., Nakatani, S., Kobata, K., Sogawa, N., & Sogawa, C. (2018). The biological efficacy of natural products against acute and chronic inflammatory diseases in the oral region. *Medicines*, 5(4), 122.



- Banu, S., & Ramamurthy, J. (2018). Role of animal models in periodontal research - A review. *Asian J Pharm Clin Res*, 11(7), 47-51.
- Basu, A., Masek, E., & Ebersole, J. (2018). Dietary Polyphenols and Periodontitis—A Mini-Review of Literature. *Molecules*, 23(7), 1786. <https://doi.org/10.3390/molecules23071786>
- Bax, B.E., Alam, T., Banerji, B., Bax, C.M.R., Bevis, P.J.R., *et al.* (1992). Stimulation of osteoclastic bone resorption by hydrogen peroxide, 183(39), 1153-1158.
- Belibasakis, G.N., Bostanci, N., (2012). The RANKL-OPG system in clinical periodontology. *J Clin Periodontol*, 39, 239-248. doi: 10.1111/j.1600-051X.2011.01810.x
- Boniface, P.K. (2017). Advances on ethnomedicinal uses, phytochemistry and pharmacology of *Spathodea campanulata* P. beauv. *EC Pharmacology and Toxicology*, 5.2, 51-62.
- Botero, J.E., & Bedoya, E. (2010). Determinants of Periodontal Diagnosis. *Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral*, 3(2), 94-99.
- Briese, E. & de Quijada, M.G. (1970). Colonic temperature of rats during handling. *Acta Physiol Latinoamer*, 20, 97–102.
- Briese, E. (1965). Hyperthermia in self-stimulating rats. *Acta Physiol Latinoamer*, 15, 357–361.
- Briese, E. (1985). Rats prefer ambient temperatures out of phase with their body temperature circadian rhythm. *Brain Res*, 345, 389–393.
- Briese, E. (1998). Normal body temperature of rats: the setpoint controversy. *Neurosci Biobehav Rev*, 22(3), 427-436. doi:10.1016/S0149-7634(97)00051.
- Brindah, P., Nagarajan, A., Saralla, R.P., Narendran, R., & Sridharan, K. (2012). A study on chemical and botanical standards of a traditional drug source- *Spathodea campanulata* beauv. *Int J Pharm Pharm Sci*, 4(Suppl 2), 157-160.
- Byun MR, Sung MK, Kim AR, *et al.* (2014). Epicatechin gallate (ECG) stimulates osteoblast differentiation via Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) and transcriptional coactivator with PDZ-binding motif (TAZ)-mediated transcriptional activation. *J Biol Chem* 289, 9926–9935. doi:10.1074/jbc.M113.522870
- Callaway DA & Jiang JX. (2015). Reactive oxygen species and oxidative stress in osteoclastogenesis, skeletal aging and bone diseases. *J Bone Miner Metab*, 33(4), 359-370. doi:10.1007/s00774-015-0656-4
- Chen J-R, Lazarenko OP, Wu X, *et al.* (2010). Dietary-induced serum phenolic acids promote bone growth via p38 MAPK/ $\beta$ -catenin canonical Wnt signaling. *J Bone Miner Res*, 25, 2399–2411. doi:10.1002/jbmr.137



- Cheng W-C, Huang R-Y, Chiang C-Y, Chen J-K, Liu C-H, *et al.* (2010). Ameliorative effect of quercetin on the destruction caused by experimental periodontitis in rats. *J Periodont Res*, 45, 788–795. doi:10.1111/j.1600-0765.2010.01301.x
- Cikrikci, S., Mozioglu, E., & Yilmaz, H. (2008). Biological activity of curcuminoids isolated from *Curcuma longa*. *Rec Nat Prod*, 2, 19-24. Corpus ID: 29714521
- Cory, H., Passarelli, S., Szeto, J., Tamez, M., Mattei, J. (2018). The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. *Front. Nutr.* 5, 87. <http://doi.org/10.3389/fnut.2018.00087>
- Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep* 26, 1001–1043. doi:10.1039/b802662a
- D'Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C. *et al.* (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanita*, 43(4), 348-361.
- Darout, I.A. (2014). Oral bacterial interactions in periodontal health and disease. *J Dent Oral Hyg*, 6(5), 51-57.
- Diagnóstico y manejo de los problemas bucales en el adulto mayor. México: Instituto Mexicano del Seguro Social, 2012.
- Diagnóstico y tratamiento de focos infecciosos bacterianos en la cavidad bucal, México: Secretaria de Salud, 2011.
- Domínguez-Pérez, R.A., Arroyo-Campos, A., López-Rodríguez, M., Arenas-Perez, A.L., & Letechipia-Vallejo, G. (2016). *Rev Endod Actual*, 11(1), 30-40.
- Dumitrescu, A.L., Abd El-Aleem S, Morales-Aza B, Donaldson LF. (2004). A model of periodontitis in the rat: effect of lipopolysaccharide on bone resorption, osteoclast activity, and local peptidergic innervation. *J Clin Periodontol*, 31, 596–603. doi:10.1111/j.1600-051X.2004.00528.x
- Eke, P.I., Dye, B.A., Wei, L., Slade, G.D., Thornton-Evans, G.O., *et al.* (2015). Update on prevalence of periodontitis in adults in the united states: NHANES 2009-2012. *J Periodontol*, 86(5), 611-622.
- Eke, P.I., Dye, B.A., Wei, L., Thornton-Evans, G.O., Genco, R.J. (2012). Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. *J Dent Res*, 91(10), 914–920.
- Emami, E., Souza, R.F., Kabawat, M., & Feine, J.S. (2013). The impact of edentulism on oral and general health. *International Journal of Dentistry*, 2013(1), 1-7. doi:0.1155/2013/498305



- Emmanuel, E.I., Peter A.A., Theophine, C.O., Edwin, O.O. (2010). Anticonvulsant effects of a glycoside isolated from the leaf of *Spathodea campanulata* P. Beauv. *J Med Plants Res*, 20, 1895-900.
- Erlebacher, A., & Derynck, R. (1996). Increased expression of TGF-beta 2 in osteoblasts results in an osteoporosis-like phenotype. *The Journal of cell biology*, 132, 195–210. doi:10.1083/jcb.132.1.195
- Escamilla-Barrera, M.S. 2019. Evaluación del efecto hipoglucemiante y neuroprotector de la administración oral de *Spathodea campanulata* en ratas diabéticas. Tesis de Maestría. UMSNH. México.
- Escamilla-Barrera, M.S., Cervantes Alfaro, J.M., Torner, L., Cortés Penagos, C., Vázquez Hernández, A. & Fenton Navarro, B. (2018). Hypoglycemic effect of the aqueous extract of Galeana leaves (*Spathodea campanulata*) in diabetic rats. XXXII Congreso Nacional de Bioquímica.
- Garcia de Aquino S, Manzolli Leite FR, Stach-Machado DR, Francisco da Silva JA, Spolidorio LC, Rossa C Jr. Signaling pathways associated with the expression of inflammatory mediators activated during the course of two models of experimental periodontitis. *Life Sci* 2009; 84:745–754.
- Garg, R., Heinzle, E., & Noor, F. (2018). Hepatocytes of Wistar and Sprague Dawley rats differ significantly in their central metabolism. *J Cell Biochem*, 119(1), 909-917.
- Giannelli, M., Chellini, F., Margeri, M., Tonelli, P., & Tani, A. (2008). Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types: A molecular and ultrastructural investigation. *Toxicology in Vitro*, 22, 308-317.
- Gomez-Florit, M., Monjo, M., & Ramis, JM. (2014). Identification of quercitrin as potential therapeutic agent for periodontal applications. *J Periodontol*, 85, 966-974. doi:10.1902/jop.2014.130438
- Graef, J.L., Rendina-Ruedy, E., Crockett, E.K., Ouyang, P., Wu, L., et al. (2017). Osteoclast differentiation is downregulated by select polyphenolic fractions from dried plum via suppression of MAPKs and Nfatc1 in mouse C57BL/6 primary bone marrow cells. *Current Developments in Nutrition*, 1(10), 1-10.
- Graves, D.T., Fine, D., Teng, Y.T., Van Dyke, T.E., Hajishengallis, G. The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 2008;35:89–105.
- Greenstein, G. (1984). The role of bleeding upon probing in the diagnosis of periodontal disease. *J Periodontol*, 55(12), 684-688.
- Gudjonsson, Sk. V. (1932). The body temperature in rats on normal and deficient diets. *J Physiol*, 74, 73-80. doi:10.1113/jphysiol.1932.sp002830



- Gugliandolo, E., Fusco, R., D'Amico, R., Peditto, M., Oteri, G., Di Paola, R., Cuzzocrea, S., Navarra, M. (2019). Treatment with a flavonoid-rich fraction of bergamot juice improved lipopolysaccharide-induced periodontitis in rats. *Front Pharmacol*, 9, 1563. doi:10.3389/fphar.2018.01563
- Hatta, H., Tsuneyama, K., Nomoto, K. (2014). A simple and rapid decalcification procedure of skeletal tissues for pathology using an ultrasonic cleaner with D-mannitol and formic acid. *Acta Histochemica*, 116(5), 753-757.
- Ilodigwe, E.E., & Akah, P.A. (2009). *Spathodea campanulata*: an experimental evaluation of the analgesic and anti-inflammatory properties of a traditional remedy. *Asian J Med Sci*, 1(2), 35-38.
- Jeong-Hyon, K., Bon-Hyuk, G., Sang-Soo, N., & Yeon-Cheol, P. (2020). A review of rat models of periodontitis treated with natural extracts. *Journal of Traditional Chinese Medical Sciences*, 7(2), 95-103. doi: 10.1016/j.jtcms.2020.05.005
- Jiang, Y., Mehta, C.K., Hsu, TY., & Alsulaimani F.F.H. (2002). Bacteria induce osteoclastogenesis via an osteoblast-independent pathway. *Infect Immun*, 70(6), 3143-3148. doi:10.1128/IAI.70.6.3143-3148.2002
- Kantarci, A., Hasturk, H., & Van Dyke, T.E. (2015). Animal models for periodontal regeneration and peri-implant responses. *Periodontology 2000*, 68(1), 66-82. doi:10.1111/prd.12052
- Keong, J.Y., Low, L.W., Chong, J.M., Ong, Y.Y., Pulikkotil, S.J., et al. (2020). Effect of lipopolysaccharide on cell proliferation and vascular endothelial growth factor secretion of periodontal ligament stem cells. *Saudi Dental Journal*, 32, 148-154. doi:10.1016/j.sdentj.2019.08.001
- Khan, H., Ullah, H., Tundis, R., Belwal, T., Devkota, H.P. et al. (2020). Dietary flavonoids in the management of Huntington's disease: mechanism and clinical perspective. *eFood*, 1(1), 38-52. doi:10.2991/efood.k.200203.001
- Khlebnikov, A.I., Schepetkin, I.A., Domina, N.G. et al. (2007) Improved quantitative structure-activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. *Bioorganic Med Chem*, 15,1749-1770. doi:10.1016/j.bmc.2006.11.037
- Kurek-Górecka, A., Walczyńska-Dragon, K., Felitti, R., Baron, S., & Olczyk, P. (2022). Propolis and diet rich in polyphenols as cariostatic agents reducing accumulation of dental plaque. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(1), 271. doi:10.3390/molecules27010271
- Larsen, C., Dashwood, R.H., & Bisson, W.H. (2010). Tea catechins as inhibitors of receptor tyrosine kinases: mechanistic insights and human relevance. *Pharmacol Res*, 62, 457-464. doi:10.1016/j.phrs.2010.07.010



- Lee, H.J., Lee, D.R., Choi, B.K., & Yang, S.H. (2019). Antiperiodontitis effects of magnolia biondii extract on ligature-induced periodontitis in rats. *Nutrients*, 11, 934, 1-10. doi:10.3390/nu11040934
- Liljestrand, J.M., Paju, S., Buhlin, K., Persson, G.T., Sarna, S., et al. (2017). Lipopolysaccharide, a possible molecular mediator between periodontitis and coronary artery disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 44(8), 784-792. doi: 10.1111/jcpe.12751
- Lillie, L. E., Temple, N. J., & Florence, L. Z. (1996). Reference values for young normal Sprague-Dawley rats: weight gain, hematology and clinical chemistry. *Hum Exp Toxicol*, 612–616. doi:10.1177/096032719601500802
- Liu, H., Zhu, R., Liu, C., Ma, R., Wang, L., et al. (2017). Evaluation of decalcification techniques for rat femur using HE and Immunohistochemical staining. *BioMed Res Int*, 2017, 1-6. doi: 10.1155/2017/9050754
- Liu, J., He, Z., Ma, N., Chen, Z. Y. (2020). Beneficial Effects of Dietary Polyphenols on High-Fat Diet-Induced Obesity Linking with Modulation of Gut Microbiota. *J Agric Food Chem*. 68(1), 33-47. <http://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b06817>
- Liu, J.X., Werner, J., Kirsch, T., Zuckerman, J.D., & Virk, M.S. (2018). Cytotoxicity evaluation of chlorhexidine gluconate on human fibroblast, myoblasts, and osteoblasts. *J Bone Joint Infect*, 3(4), 165-172.
- Liu, R, Desta T, Raptis M, Darveau RP, Graves DT. P. gingivalis and E. coli lipopolysaccharides exhibit different systemic but similar local induction of inflammatory markers. *J Periodontol* 2008;79: 1241–1247. 34.
- Löe, H. (1967). The gingival index, the plaque index and the retention index systems. *J Periodontol*, 38(6), 610-616.
- Makinde, J.M., Amusan, O.O.G., Adesogan, E.K. (1988). The antimalarial activity of *Spathodea campanulata* stems bark extract on *Plasmodium berghei berghei* in mice. *Plant Med*, 54(2), 122-125. doi: 10.1055/s-2006-962367
- Marín L, Miguélez EM, Villar CJ, & Lombó F. (2015). *BioMed Res Int*, 2015, 1-18. doi:10.1155/2015/905215
- Martin Paul, A., Jayanthi, D., & Thamizhseran, N. (2019). Bio-physicochemical studies on water calyx fluid in the African tulip tree, *Spathodea campanulata* P. beauv. *Pharmacogn J*, 11(3), 594-599.
- Matsumoto, C., Inoue, H., Tominari, T., Watanabe, K., Hirata, et al. (2015). Heptamethoxyflavone, a citrus flavonoid, suppresses inflammatory osteoclastogenesis and alveolar bone resorption. *Biosci Biotechnol Biochem*. 79. 155–158. doi:10.1080/09168451.2014.952616



- Mayerholz, D.K., Beck, A.P., & Singh, B. (2020). Innovative use of animal models to advance scientific research. *Cell and Tissue Research*, 1, 1-2. doi: 0.1007/s00441-020-03210-z
- Miles, G.H. (1962). Telemetering techniques for periodicity studies. *Ann NY Acad Sci*, 98, 856–865.
- Moghaddam, AA., Radafshar, G., Jadhandidah, Y., & Kakaei, N. (2017). *J Dent (Shiraz)*, 18 (3), 165-172. PMID: 29034270
- Mohammad, C.A., Ali, K.M., Al-Rawi, R.A., Gul, S.S. (2022). Effects of curcumin and tetracycline gel on experimental induced periodontitis as an anti-inflammatory, osteogenesis promoter and enhanced bone density through altered iron levels: Histopathological study. *Antibiotics*, 11, 521. doi:10.3390/antibiotics11040521
- Mysak, J., Podzimek, S., Sommerova, P., Lyuya-Mi, Y., Bartova, J, *et al.* (2014). Porphyromonas gingivalis: Major periodontopathic pathogen overview. *Journal of Immunology Research*, 2014, 1-8.
- Nebel, D., Arvidsson, J., Lillqvist, J., Holm, A., & Nilsson, B-O. Differential effects of LPS from *Escherichia coli* and *Porphyromonas gingivalis* on IL-6 production in human periodontal ligament cells. *Acta Odontologica Scandinavica*, 71, 892–898. doi:10.3109/00016357.2012.734415
- Nicolin V, De Tommasi N, Nori SL, Costantinides F, Berton F., *et al.* (2019). Modulatory effects of plant polyphenols on bone remodeling: a prospective view from the bench to bedside. *Front. Endocrinol.* 10(494), 1-9. doi: 10.3389/fendo.2019.00494
- Niyonzima G, Laekeman G, Witvrouw M, VanPoel B, Pieters L., *et al.* (1999). Hypoglycemic, anticomplement and anti-HIV activities of *Spathodea campanulata* stem bark. *Phytomed*, 6(1), 45-49. doi: 10.1016/S0944-7113(99)80034-8
- Oka, H., Miyauchi, M., Furusho, H., Nishihara, T., & Takata, T. (2012). Oral administration of EP4 antagonist inhibits LPS-induced osteoclastogenesis in rat periodontal tissue. *Journal of Periodontology*, 83, 506–513.
- Orozco-Montes, F., Vázquez-Hernández, A., & Fenton-Navarro, B. (2019). Active compounds of medicinal plants, mechanism for antioxidant and beneficial effects. *ΦYTON*, 88, 1-10. ISSN:0031 9457
- Papapanou, P.N., Sanz, M., Buduneli, N., Dietrich, T., Feres M., *et al.* (2018). Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 world workshop on the classification of periodontal and peri-implant diseases and conditions. *Journal of Clinical Periodontology*, 45(Suppl 20), S162-S170. doi: 10.1111/jcpe.12946
- Paz García, J., Maldonado Rodríguez, A., Díaz Reval, I., Muñoz, J., & Rodríguez Hernández, A. (2011). Sustitución del uso de solución salina fisiológica como irrigante en el manejo de pacientes



sépticos y quirúrgicos por solución electrolizada. *Revista Mexicana de Cirugía Bucal y Maxilofacial*, 7(2), 46-52.

Plaza Useche, M.L., & Soto Chávez, A.A. (2014). Prevalencia de periodontitis crónica en pacientes con enfermedades sistémicas. *Revista Mexicana de Periodontología*, 5(2), 51-55.

Popova, C., Dosseva Panova, V., & Panov V. (2013). Microbiology of periodontal diseases. A review. *Medical Biotechnology*, 27(3), 3754-3759.

Putker, F., Bos, M.P., & Tommassen, J. (2015). Transport of lipopolysaccharide to the Gram-negative bacterial cell surface. *FEMS Microbiology Reviews*, 39(6), 985-1002. doi:10.1093/femsre/fuv026

Rajesh, K., Harsha, R., Mohammed Gulzar, A., Hareesh, A.R., Thammanna, G.S.S., *et al.* (2010). Antimicrobial activity of ethanol extract of leaf and flower of *Spathodea campanulata* P. beauv. *RJPBCS*, 1(3), 691-698. ISSN: 0975-8585

Ramos Perfecto, D., Moromi Nakata, H., & Martínez Cadillo, E. (2011). *Porphyromonas gingivalis*: patógeno predominante en la periodontitis crónica. *Odontol Sanmarquina*, 14(1), 34-38.

Ramos Perfecto, D., Moromi Nakata, H., Martínez Cadillo, E., & Mendoza Rojas, A. (2010). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: patógeno importante en la periodontitis. *Odontol Sanmarquina*, 13(2), 42-45.

Rao, S.M., Naresh, C., Kokatnur, V., Rao, A., Singh, V. (2022). Flavonoids and periodontal tissue: Exploring the link. *J Cel Biotech*, pre-press, 1-8. doi.10.3233/JCB-210062

Rasouli, H., Farzaei, M.H., & Khodarahmi, R. (2017). Polyphenols and their benefits: A review. *Int J Food Prop*, 20, 1-42. doi: 10.1080/10942912.2017.1354017

Reynolds T, Dweck AC. Aloe vera leaf gel: a review update. *J Ethnopharmacol*. 1999; 68(1-3): 3-37.

Ribeiro-Santos, F.R., Silva, G.G., Petean, I.B.F., Arnez, M.F.M., Silva, L.A.B., *et al.* (2019). Periapical bone response to bacterial lipopolysaccharide is shifted upon cyclooxygenase blockage. *J Appl Oral Sci*, 27, 1-9. doi: 10.1590/1678-7757-2018-0641

Rodríguez-Perez, C., Segura-Carretero, A., Del Mar Contreras, M. (2017). Phenolic compounds as natural and multifunctional anti-obesity agents: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1-18. <http://doi.org/10.1080/10408398.2017.1399859>

Rojo Botello, N.R., Flores Espinosa, A., & Arcos Castro, M. (2011). Prevalencia, severidad y extensión de periodontitis crónica. *Revista Odontológica Mexicana*, 15(1), 31-39.

Sahebjam, A.M., Moradi, H.J., Khoshhal, M., Arabi, R., Khodadoostan, A., *et al.* (2011). Clinical effect of periodontal pocket irrigation with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *DJH*, 3(1), 53-59.



- Sampath Kumar, KP., Bhowmik, D., Chiranjib., & Biswajit. (2010). Aloe vera: A potential herb and its medicinal importance. *J Chem Pharm Res*, 2(1), 21-29. ISSN No: 0975-7384
- Sanbe, T., Tomofuji, T., Ekuni, D., Azuma, T., Tamaki, N., & Yamamoto, T. (2007). Oral administration of vitamin C prevents alveolar bone resorption induced by high dietary cholesterol in rats. *Journal of periodontology*, 78(11), 2165–2170. doi:10.1902/jop.2007.070181
- Sanjai, K. Kumarswamy, J. Patil, A. Papaiah, L. (2012). Evaluation and comparison of decalcification agents on the human teeth. *J Oral Maxillofac Pathol*, 16, 222-227.
- Savi, F.M., Brierly, G.I., Baldwin, J., Theodoropoulos, C., & Woodruff, M.A. (2017). Comparison of different decalcification methods using rat mandibles as a model. *J Histochem Cytochem*, 65(12), 705 –722. doi:10.1369/0022155417733708
- Sharma, V., & Kalsi, DS. (2016). Effects of topical application of *Curcuma longa* extract in the treatment of early periodontal diseases. *Indian J Dent Sci*, 8, 118-23. doi:10.4103/0976-4003.191725
- Sindhura, H., Harsha, R.H., & Shilpa, R.H. (2017). Efficacy of subgingival irrigation with 10% povidone-iodine as an adjunct to scaling and root planning: A clinical and microbiological study. *Indian J Dent Res*, 28, 514-518.
- Singh, M., Thrimawithana, T., Shukla, R., Adhikari, B. (2020). Managing obesity through natural polyphenols: A review. *Future Foods*, 1-2(100002), 1-18. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2020.100002>
- Smiley, C.J., Tracey, S.L, Abt, E., Michalowicz, B., John, M., *et al.* (2015a). Evidence-based clinical practice guideline on the nonsurgical treatment of chronic periodontitis by means of scaling and root planning with or without adjuncts. *JADA*, 146(7), 525-535.
- Smiley, C.J., Tracey, S.L, Abt, E., Michalowicz, B., John, M., *et al.* (2015b). Systematic review and meta-analysis on the nonsurgical treatment of chronic periodontitis by means of scaling and root planning with or without adjuncts. *JADA*, 146(7), 508-524.
- Sriraman, P., Mohanraj, R., & Neelakantan, P. (2014). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in periodontal disease. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 5(2), 406-419.
- Stabholz, A., Nicholas, A. A., Zimmerman, G.J., & Wikeyci, U.M.E. (1998). Clinical and antimicrobial effects of a single episode of subgingival irrigation with tetracycline HCl or chlorhexidine in deep periodontal pockets. *J Ciin Periodontol*, 25, 794-800.
- Staudte, H., Sigusch, BW., & Glockmann, E. (2005). Grapefruit consumption improves vitamin C status in periodontitis patients. *Br Dent J*, 4, 213–217. doi:10.1038/sj.bdj.4812613
- Struillou, X., Boutigny, H., Soueidan A., & Layrolle, P. (2010). Experimental animal models in periodontology: A review. *The Open Dentistry Journal*, 4, 37-47.



- Teinkela, J.E.M., Nguedia, J.C.A., Meyer, F., Donfack, E.V., Ndjakou, B.L., *et al.* (2016). *In vitro* antimicrobial and anti-proliferative activities of plant extracts from *Spathodea campanulata*, *Ficus bubu*, and *Carica papaya*. *Pharmaceutical Biology*, 54(6), 1086-1095.
- Teixeira, A.H., Freire, J.M.d., de Sousa, L.H.T., Parente, A.T., de Sousa, N.A., *et al.* (2017). *Stemodia maritima* L. extract decreases inflammation, oxidative stress, and alveolar bone loss in an experimental periodontitis rat model. *Frontiers in Physiology*, 8(988), 1-10. doi:10.3389/fphys.2017.00988
- Tonetti, M.S., Greenwell, H., & Kornman, K.S. (2018). Staging and grading of periodontitis: framework and proposal of a new classification and case definition. *Journal of Clinical Periodontology*, 45(Suppl 20), S149–S161. doi:10.1111/jcpe.12945
- Torre, E. (2017). Molecular signaling mechanisms behind polyphenol-induced bone anabolism. *Phytochem Rev*, 16, 1183–1226. doi:10.1007/s11101-017-9529-x
- Torres Capetillo, E., Carrillo Fuentesvilla, R., De la Garza Ramos, M.A., Mercado Hernández, R., Torres Martínez, H.H., *et al.* (2013). Antimicrobial efficacy of neutral super-oxidized electrolyzed gel versus chlorhexidine digluconate 0.12% in biofilm formation on orthodontic mini-implants: An *in vitro* study. *Academic Journals*, 5(4), 64-71.
- Torres-Estrada, J.L., Velazquez-Gonzalez, J.C., Rios Delgado, S.M., Vazquez-Martinez, M.G., Panilla-Navarro, R.P., *et al.* (2010). Toxicity of *Spathodea campanulata* P Beauvois (Scrophulariales: Bignoniaceae) aqueous extracts against immature stages of *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) under laboratory conditions. *Res Rep Trop Med*, 1, 83-87.
- Trzeciakiewicz A, Habauzit V, Mercier S, *et al.* (2010a). Hesperetin stimulates differentiation of primary rat osteoblasts involving the BMP signalling pathway. *J Nutr Biochem*, 21, 424–431. doi:10.1016/j.jnutbio.2009.01.017
- Trzeciakiewicz A, Habauzit V, Mercier S, *et al.* (2010b). Molecular mechanism of hesperetin-7-O-glucuronide, the main circulating metabolite of hesperidin, involved in osteoblast differentiation. *J Agric Food Chem*, 58, 668–675. doi:10.1021/jf902680n
- Vaishnavi Rajaraman., Ariga, P., Dhanraj, M., & Jain, A.R. (2018). Effect of edentulism on general health and quality of life. *Drug Invention Today*, 10(4), 549-553. ISSN: 0975-7619
- Vijayasanthi, M., Doss, A., & Kanna, K.V. (2015). Anti-inflammatory activity of *Spathodea campanulata* P.Beauv leaves against carrageenan induced paw edema. *Elixir Bio Tech*, 78, 29450-29452.
- Wagh, A.S., & Buttle, S.R. (2018). Plant profile, phytochemistry and pharmacology of *Spathodea campanulata* P. beauvais (African tulip tree): a review. *Int J Pharm Pharm Sci*, 10(5), 1-6.
- Welch AA, Hardcastle AC. (2014). The effects of flavonoids on bone. *Curr Osteoporos Rep*, 12, 205–210. doi:10.1007/s11914-014-0212-5



- Yahfoufi N, Alsadi N, Jambi M, Matar C. (2018). The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols. *Nutrients*, 10 (11), 1618. doi:10.3390/nu10111618
- Yucel-Lindberg, T., & Bage, T. (2013). Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. *Expert Rev Mol Med*, 15, 1-22. doi:10.1017/erm.2013.8
- Zaheer, Z., Painthankar, A.P., Deshpande, S.D., Khan, S., & Ahmed, R.Z. (2011). Comparative phytochemical screening of flowers and bark of *Spathodea campanulata*. *IJABT*, 2(1), 233-235.
- Zhang, D., Chen, L., Li, S., Gu, Z., & Yan, Jie. (2008). Lipopolysaccharide (LPS) of *Porphyromonas gingivalis* induces IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6 production by THP-1 cells in a way different from that of *Escherichia coli* LPS. *Innate Immunity*, 14(2), 99-107. doi:10.1177/1753425907088244
- Zhang, Y., Zhen, M., Zhan, Y., Song, Y., Zhang, Q., et al. (2017). Population-Genomic insights into variation in *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolates and its association with periodontal disease. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(409), 1-13.
- Zhong, Y., Zhang, X., Hu, X., Li, Y. (2018). Effects of repeated lipopolysaccharide treatment on growth performance, immune organ index, and blood parameters of Sprague-Dawley rats. *J Vet Res*, 62 (3), 341-346. doi: 10.2478/jvetres-2018-0048.
- Zhou, X., & Li, Y. (2015). Subgingival microbes. En: Zhou, X., & Li, Y. *Atlas of oral microbiology: from healthy microflora to disease*. London: Academic Press, p. 67-93.
- Zmarowski, A., Beekhuijzen, M., Lensen, J., & Emmen, H. (2012). Differential performance of Wistar Han and Sprague Dawley rats in behavioral tests: differences in baseline behavior and reactivity to positive control agents. *Reprod Toxicol*, 34(2), 192-203. doi:10.1016/j.reprotox.2012.05.091
-