

Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana

Facultad de Estomatología “Raúl González Sánchez”

Centro de Investigaciones Biomédicas

**EFFECTO DEL ANTIOXIDANTE NATURAL VIMANG SOBRE LAS
CARACTERISTICAS HISTOPATOLOGICAS GINGIVALES EN LA
ENFERMEDAD PERIODONTAL EXPERIMENTAL**

*DrC. Bárbara E. García Triana . Calle 23 Núm.6606 entre 66 y 66A, Buena Vista,Playa.Ciudad de La Habana. Teléfono:205-7595. barbara.garcia@infomed.sld.cu.

**Dr. Rafael Delgado Fernández. 7ma. Núm. 159 entre L y K. El Vedado. Ciudad de La Habana. Teléfono : 832-9914.

***Dra. Nereida Riesgo Lobaina. Calle Gelabert Núm.165 entre Gertrudis y Josefina. Víbora. Ciudad de La Habana.Teléfono: 40-9530. nereida.riesgo@infomed.sld.cu

****DrC. Luis Carlos Silva Ayzaguer. 5ta.A Núm. 9009 entre 90 y 92. Playa. Ciudad de La Habana.Teléfono: 209-3957. lcsilva@infomed.sld.cu

*****Dra. Amelia L. García Montes de Oca. Calle 36 Núm. 724 entre 7ma. y 17. Madruga La Habana. Teléfono : 064-81-5167.

*****Dra. Maritza Osorio Núñez. Lucena Núm. 310 entre San Rafael y San Miguel, Apto. 102, Centro Habana. Ciudad de La Habana.Teléfono: 879-5268.
marioso@infomed.sld.cu

*Especialista Segundo Grado en Bioquímica Clínica. Profesora e Investigadora Auxiliar.Doctor en Ciencias Médicas

**Especialista Segundo Grado en Patología. Profesor Auxiliar.

***Especialista Segundo Grado en Periodoncia. Profesora Auxiliar.

**** Investigador Titular.

*****Especialista Primer Grado en Periodontología. Instructora.

*****Especialista Primer Grado en Bioestadística. Instructora.

RESUMEN

El Vimang es un extracto de la corteza del árbol *Mangifera indica L.* con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Por ello, nos propusimos evaluar su efecto sobre las características histopatológicas de la encía, en un modelo de enfermedad periodontal. Se colocaron ligaduras en el surco gingival de dos dientes de las hemiarcadas superiores derechas, a diez perros *Beagles*. A cinco de ellos, seleccionados al azar, se les aplicó localmente una solución de Vimang a 1%, dos veces al día; a los otros, se les aplicó el vehículo. A los 21 días, se tomaron muestras gingivales de los dientes en estudio y se procesaron para su evaluación histopatológica. La aplicación del extracto disminuyó el grado de infiltrado inflamatorio crónico y de hiperplasia del epitelio del surco gingival, en las encías de los dientes ligados. Se concluye que el Vimang atenúa la inflamación gingival en el modelo de enfermedad periodontal por ligadura en perros.

Palabras clave: Periodontitis, Vimang, antioxidantes, ligadura, perros.

INTRODUCCION

EL Vimang es un producto natural desarrollado a partir de la corteza del árbol *Mangifera indica L.*, cuya composición química le confiere un elevado efecto protector antioxidante e inmunomodulador. 1-5

De gran importancia para el posible uso estomatológico de esta formulación, es la descripción del empleo de extractos de *Mangifera indica L.* (hojas y tallo) en afecciones inflamatorias, incluyendo la enfermedad periodontal (EP). 6,7

La enfermedad periodontal constituye la segunda causa de la pérdida de dientes en el humano, al afectar los tejidos que sostienen el diente. Su prevalencia es elevada en el adulto aunque su gravedad es moderada, con un 10% de periodontitis grave. 8 En Cuba, se ha registrado una alta prevalencia. 9,10

Se considera este grupo de enfermedades como procesos infecciosos, en cuya progresión la defensa del hospedero tiene un papel esencial. 11,12 Esta respuesta incluye la liberación de proteasas, citocinas y derivados del ácido araquidónico, así como la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO), 13-19 los cuales en su conjunto pueden conducir al daño oxidativo de los tejidos periodontales. Por ello, nos propusimos evaluar el efecto de la aplicación del antioxidante natural Vimang sobre las características histopatológicas de la encía, en el modelo de enfermedad periodontal por ligadura en perros.

METODOS

Diseño experimental: Se utilizó el modelo de enfermedad periodontal por ligadura reportado en la literatura. 20 Diez perros *Beagles* machos, de ocho a diez meses de edad (*Cenp:Beag*), fueron anestesiados con pentobarbital sódico intravenoso (30 mg/kg de peso). Se estudiaron los dientes: cuartos premolares y primeros molares superiores de

las hemiarcadas derechas e izquierdas. A los dientes de las hemiarcadas derechas se les colocó una ligadura de hilo de algodón en el interior del surco gingival. Los dientes contralaterales constituyeron los controles sanos. A cinco de los animales, elegidos a través de una tabla de números aleatorios, se les aplicó con jeringuilla una solución de Vimang a 1% (p/v) en el interior del surco gingival de los dientes en estudio, dos veces al día, durante 21 días. El resto recibió el vehículo (suero fisiológico) en igual forma y frecuencia. Los animales fueron alimentados una vez al día con pienso peletizado para la especie 1503 cco (*ALYco. Cenp*), y permanecieron alojados en perreras colectivas, con patio exterior y capacidad para cuatro animales cada una.

Evaluación histopatológica: Al final del experimento, se tomaron muestras de la encía vestibular de los dientes en estudio, y seguidamente se fijaron en formalina neutral a 10%, durante 24 horas. Posteriormente, los tejidos se procesaron por el método de inclusión en parafina. Se realizaron cortes entre 4 y 6 m m, se tomaron las secciones impares (1, 3, 5, 7 y 9) y se colorearon con la técnica de hematoxilina y eosina. La evaluación histopatológica se realizó a ciegas por un solo examinador, en cinco campos por cada lámina, utilizando un microscopio binocular de luz. Las variables estudiadas fueron dos: **grado de infiltrado inflamatorio crónico (IIC)** y **grado de hiperplasia del epitelio del surco gingival (HESG)**. En ambos casos, se empleó una escala ordinal con cuatro categorías: ausente, ligero, moderado e intenso. La operacionalización fue la siguiente:

Para el **IIC** , la clasificación se basó en el número de elementos promedio por campo según la siguiente regla:

Ausente 0

Ligero 1-15

Moderado 16-25

Intenso ³ 26

Para la **HESG** , la clasificación se basó en la siguiente regla:

Ausente El epitelio de la bolsa se presenta uniforme sin prolongaciones epiteliales dentro del tejido conectivo 0.

Ligero El epitelio de la bolsa presenta prolongaciones epiteliales que penetran hasta un tercio del tejido conectivo.

Moderado Las prolongaciones epiteliales penetran dos tercios del tejido conectivo.

Intenso Las prolongaciones epiteliales se extienden más de dos tercios en el tejido conectivo.

Análisis estadístico: Se determinó la distribución de las muestras, según las categorías establecidas para el IIC y la HESG. Posteriormente, se calculó el índice de posición para escalas ordinales y su intervalo de confianza por cada grupo de dientes. 21

Normas éticas: Se cumplieron los requisitos exigidos en el Código de Ética para el trabajo con animales de laboratorio y el Código de Las Buenas Prácticas de Laboratorio de Toxicología Experimental (CENPALAB, 1992), en concordancia con las normas internacionales que rigen el cuidado y manejo de los animales de laboratorio. El proyecto fue aprobado previamente por la Comisión de Ética del Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas “Victoria de Girón”.

RESULTADOS

Grado de infiltrado inflamatorio crónico: En los dientes no-ligados, se observó este tipo de células sólo en un pequeño porcentaje de las muestras correspondientes al grupo vehículo (20%), que se reportaron con un grado moderado (Figura 1); en el resto, estuvo ausente (Figuras 1 y 2a).

Por el contrario, los dientes ligados exhibieron, por lo general, cierto grado de IIC en ambos tratamientos (Figuras 2b y 2c). No obstante, en la encía de los dientes tratados con vehículo, 80% de las muestras reflejaron un IIC moderado y 20% intenso (todas las muestras se encontraron entre los grados moderado e intenso), para un índice de posición de 0,733 con intervalo de confianza (0,651;0,816), mientras que, en los tratados con Vimang, las muestras se distribuyeron entre los grados ausente (40%), moderado (20%) e intenso (40%), para un índice de posición de 0,533 con intervalo de confianza (0,253;0,814) (Figura 1).

Grado de hiperplasia del epitelio del surco gingival: El incremento en el número de capas del epitelio de la bolsa es característico de este modelo de EP (Figura 2b).

Se apreció que en los dientes no-ligados-vehículo no apareció hiperplasia en 60% de las muestras de encía, y se observó hiperplasia ligera en 40% [índice de posición 0,133 con intervalo de confianza (-0,032;0,299)]. En los no-ligados-Vimang la hiperplasia estuvo ausente en 100% (Figura 3).

En los dientes ligados, se obtuvo un incremento del porcentaje de muestras que presentan esta característica histopatológica en ambos tratamientos. No obstante, en los dientes tratados con vehículo, todas las muestras se ubicaron entre los grados moderado e intenso (40% y 60% respectivamente), para un índice de posición de 0,867 con intervalo de confianza (0,765;0,968), mientras que en los tratados con Vimang, la mayor parte de las muestras se encontró entre los grados ausente y ligero (40% y 20% respectivamente); 40% restante se reportó intenso, para un índice de posición de 0,111 con intervalo de confianza (0,186;0,747). (Figura 3).

DISCUSION

Grado de infiltrado inflamatorio crónico: La inflamación crónica se caracteriza por ser de mayor duración que la aguda, así como por la presencia predominante de células

plasmáticas, linfocitos y macrófagos. 22 El predominio de este tipo de células fue claramente superior en las muestras gingivales de los dientes ligados que en los no ligados, como revela el hecho de que los índices de posición correspondientes a las primeras sean evidentemente superiores a los de las segundas (Figura 1). Tal resultado es coherente con lo reportado para la encía de ratas con periodontitis por ligadura durante 21 días. 23 Esto demuestra la efectividad de la colocación de ligaduras en el surco gingival para provocar el desarrollo de la inflamación gingival.

La disminución de la presencia de células del IIC por la aplicación del Vimang, según lo indica el valor del índice de posición, inferior al obtenido por la aplicación del vehículo (Figura 1 y 2), permite suponer que esta formulación logró inhibir la inflamación de la encía en los dientes ligados.

Este resultado se explica por el poder antioxidante, antiinflamatorio e inmunomodulador descrito para esta formulación, 1-5,24 el cual se debe a su composición química, caracterizada por una mezcla de polifenoles, terpenoides, polialcoholes, ácidos grasos y microelementos. La mangiferina, el ácido mangiferónico y la amentoflavona son los componentes mayoritarios, mientras que los microelementos predominantes son potasio, calcio, magnesio, hierro, cobre, zinc y selenio. 1,3 Esto le confiere un elevado efecto protector antioxidante con capacidad de secuestro de radicales hidroxilo y ácido hipocloroso, lo cual, a su vez, protege a las macromoléculas biológicas del daño oxidativo. 1-4 Sus ingredientes manifiestan, además, efecto mitogénico sobre poblaciones linfoides, lo que demuestra su actividad inmunomoduladora al estimular procesos de división y proliferación celular de linfocitos. 5

La generación de ERO y los mecanismos antioxidantes están involucrados en la inflamación. Las especies reactivas del oxígeno activan proteínas quinasas y fosfatasas, así como factores de transcripción génico-específicos que promueven el desarrollo de la reacción inflamatoria, al estimular la biosíntesis de citocinas. 25-28 Entre las citocinas proinflamatorias se encuentran el factor necrosante de tumores alfa (TNF α) y las interleucinas 1, 6 y 8 (IL-1, IL-6, IL-8), cuya expresión y concentraciones plasmáticas se han encontrado elevadas en pacientes con EP. 29-32 Se ha demostrado que el Vimang posee capacidad de inhibir mediadores de la inflamación como el TNF α y el ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular-1). 4,33

Grado de hiperplasia del epitelio del surco gingival: La hiperplasia es una respuesta del epitelio frente a un irritante crónico; en este caso, el hilo colocado en el interior del surco gingival. Se ha reportado en humanos como una de las respuestas más frecuentes en los procesos crónicos gingivales. 34 También se ha descrito su aparición en el modelo de enfermedad periodontal por ligadura. 20

El potente efecto atenuador del Vimang sobre el incremento de esta variable, reflejado por un valor inferior del índice de posición (Figura 2 y 3), refuerza lo obtenido respecto al grado de IIC y permite afirmar que esta formulación es capaz de contrarrestar el poder irritante de la ligadura.

Se concluye que la administración tópica del antioxidante natural Vimang atenúa el desarrollo de la inflamación gingival en el modelo de enfermedad periodontal por ligadura en perros. Esto justifica la realización de ensayos clínicos, para el uso de

antioxidantes como el Vimang en la prevención y terapéutica de la enfermedad periodontal.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a los doctores Dr. Alberto Núñez Sellés y René Delgado, del Centro de Química Farmacéutica, por suministrar el producto (Vimang), así como la información científica relevante sobre él. Este estudio formó parte de un proyecto financiado por el Programa Ramal de Medicamentos del MINSAP.

ABSTRACT

Vimang is a *Mangifera indica L.* extract with antioxidant and anti-inflammatory properties. Based on this, we evaluated its effect on histopathological characteristics of gingiva using a model of experimental periodontitis. Ten Beagle dogs were subjected to ligature-induced periodontitis in two right upper teeth. A 1% solution of Vimang was topically applied to five randomly selected test animals twice daily; the remaining animals received vehicle. We took gingival samples of test teeth at 21 days, which were processed for histopathological evaluation at the light microscope. The extract diminished the grade of chronic inflammatory infiltrate and hiperplasy of surcal gingival epithelium in the ligated teeth. It is concluded that Vimang inhibit gingival inflammation in the ligature-induced periodontitis model in dogs.

Key words: Periodontitis, Vimang, antioxidants, ligature, dogs.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Sánchez GM, Rodríguez MA, Giuliani A, Núñez-Sellés AJ, Rodríguez NP, León OS, *et al* . Protective effect of *Mangifera indica L.* extract (Vimang) on the injury associated with hepatic ischaemia reperfusion. *Phytother Res* 2003;17:197-201.
2. Martínez G, Delgado R, Pérez GD, Garrido G, Núñez-Sellés AJ, León OS. Evaluation of the in vitro antioxidant activity of *Mangifera indica L.* extract (Vimang). *Phytother Res* 2000;14:424-7.
3. Sánchez GM, Giuliani A, León OS, Pérez-Davison GD, Núñez-Sellés AJ. Effect of *Mangifera indica L.* extract (Vimang) on protein and hepatic microsomes peroxidation. *Phytother Res* 2001;15:581-5.
4. Sánchez GM, Re L, Giuliani A, Núñez-Sellés AJ, Pérez-Davison G, León OS. Protective effect of *Mangifera indica L.* extract, mangiferin and selected antioxidants against TPA-induced biomolecules oxidation and peritoneal macrophage activation in mice. *Pharmacol Res* 2000;42:565-73.

5. Guha S, Ghosal S, Chattopadhyay U. Antitumor, immunomodulatory and anti-HIV effect of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone. *Chemother Basel* 1996;42:443-9.
6. Garrido G, González D, Delporte C, Backhouse N, Quintero G, Núñez-Sellés AJ, *et al* . Analgesic and anti-inflammatory effects of *Mangifera indica* L. extract (Vimang). *Phytother Res* 2001;15:18-21.
7. Bairy I, Reeja S, Siddharth I, Rao PS, Bhat M, Shivananda PG. Evaluation of antibacterial activity of *Mangifera indica* on anaerobic dental microphlora based on in vivo studies. *Indian J Pathol Microbiol* 2002;45:307-10.
8. Carranza SA, Sznajder NG. *Compendio de Periodoncia*. 5ta. ed. Buenos Aires:Panamericana; 1996, p.22-9.
9. Zacca G, Sosa M, Mojáiber A. Situación de salud bucal de la población cubana. Estudio comparativo según provincias, 1998. *Rev Cubana Estomatol* 2001;38:90-110.
10. González ME, Toledo B, Nazco C. Enfermedad periodontal y factores locales y sistémicos asociados. *Rev Cubana Estomatol* 2002;39:193-202.
11. Novak MJ, Donley TG. Using host response modifiers in the treatment of periodontal disease. *Pract Proced Aesthet Dent* 2002;14:suppl 3-10.
12. Gemmell E, Yamazaki K, Seymour GJ. Destructive periodontitis lesions are determined by the nature of the lymphocytic response. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002;13:17-34.
13. Okuda K, Kato T, Ishihara K. Involvement of periodontopathic biofilm in vascular diseases. *Oral Dis* 2004;10:5-12.
14. Garlet GP, Martins W Jr, Ferreira BR, Milanezi CM, Silva JS. Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. *J Periodontal Res* 2003;38:210-7.
15. Novak MJ, Johns LP, Miller RC, Bradshaw MH. Adjunctive benefits of subantimicrobial dose doxycycline in the management of severe, generalized, chronic periodontitis. *J Periodontol* 2002;73:762-9.
16. Lindberg P, Kinnby B, Lecander I, Lang NP, Matsson L. Increasing expression of tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 2 in dog gingival tissues with progressive inflammation. *Arch Oral Biol* 2001;46:23-31.
17. Grayson R, Douglas CW, Heath J, Rawlinson A, Evans GS. Activation of human matrix metalloproteinase 2 by gingival crevicular fluid and *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Periodontol* 2003;30:542-50.
18. Kinane DF, Darby IB, Said S, Luoto H, Sorsa T, Tikanoja S, *et al*. Changes in gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8 levels during periodontal treatment and maintenance. *J Periodontal Res* 2003;38:400-4.

19. Liu RK, Cao CF , Meng HX, Gao Y.

Polymorphonuclear neutrophils and their mediators in gingival tissues from generalized aggressive periodontitis. *J Periodontol* 2001;72:1545-53.

20. Shibutani T, Imai K, Kanazawa A, Iwayama U. Use of hyaluronic acid binding protein for detection of hyaluronan in ligature-induced periodontitis tissue. *J Periodont Res* 1998;33:265-73.

21. Silva LC. Cultura estadística e Investigación científica en el campo de la salud: una mirada crítica. Madrid:Díaz de Santos;1997, p.49-52.

22. Wiebe SH, Hafezi M, Sandhu HS, Sims SM, Dixon SJ. Osteoclast activation in inflammatory periodontal diseases. *Oral Dis* 1996;2:167-80.

23. Sobaniec H, Sobaniec-ütowska ME. Morphological examinations of hard tissues of paradontium and evaluation of selected processes of lipid peroxidation in blood serum of rats in the course of experimental periodontitis. *Med Sci Monit* 2000; 6: 875-81.

24. Sánchez GM, Candelario-Jalil E, Giuliani A, León OS, Sam SR, Delgado R, *et al* . *Mangifera indica L* . extract (Vimang) reduces ischemia-induced neuronal loss and oxidative damage in the gerbil brain. *Free Rad Res* 2001;35:465-73.

25. Aschnoune K, Strassheim D, Mitra S, Kum JY, Abraham E. Involvement of reactive oxygen species in Toll-like receptor 4-dependent activation of NF-kappaB. *J Immunol* 2004;172:2522-9.

26. Xie Z, Singh K. ERK1/2 and JNKs, but not p38 kinase, are involved in reactive oxygen species-mediated induction of osteopontin gene expression by angiotensin II and interleukin-1beta in adult rat cardiac fibroblasts. *Physiol* 2004;180:399-407.

27. Kim SH, Johnson VJ, Shin TY, Shaima RP. Selenium attenuates lipopolysaccharide-induced oxidative stress responses through modulation of p38 MAPK and NF-kappaB signaling pathways. *Exp Biol Med* 2004;229:203-13.

28. Lin SJ, Shyue SK, Liu PL, Chen YH, Ku HH, Chen JW, *et al*. Adenovirus-mediated overexpression of catalase attenuates oxLDL-induced apoptosis in human aortic endothelial cells via AP-1 and c-jun N-terminal kinase/extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways. *J Mol Cell Cardiol* 2004;36:129-39.

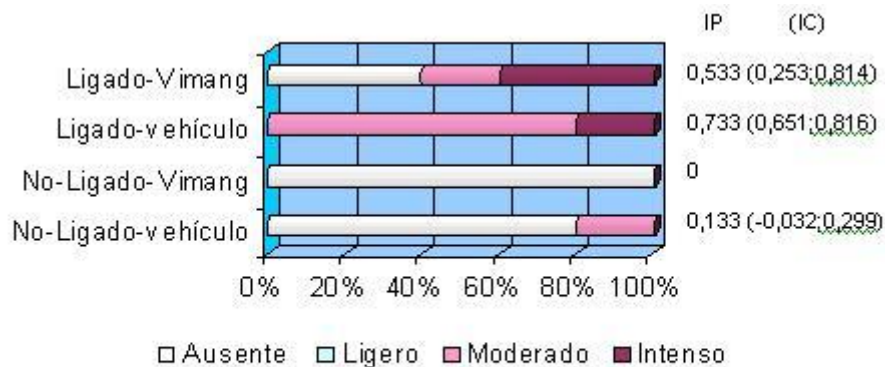
29. Gorska R, Gregorek H, Kowalski J, Laskus-Perendyk A, Syczewska M, Madalinski K. Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2003;30:1046-52.

30. Erdemir EO, Duran I, Haliloglu S. Effects of smoking on clinical parameters and the gingival crevicular fluid levels of IL-6 and TNF-alpha in patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2004;31:99-104.

31. Walton AG, Welbury RR, Foster HE, Thomason JM. Juvenile chronic arthritis: a dental review. *Oral Dis* 1999;5:68-75.
32. Kornman KS, Crane A, Wang HY, Di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW. The IL-1 genotype is a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1997;24:72-7.
33. García D, Delgado R, Ubeira FM, Leiro J. Modulation of rat macrophage function by the *Mangifera indica L.* extracts Vimang and mangiferin. *Intern Immunopharmacol* 2002;2:797-806.
34. Riesgo N, Rodríguez G, Urbizo J. Correlación clínico-histopatológica en la enfermedad periodontal inflamatoria crónica. *Rev Cubana Estomatol* 1999;37:197-202.

ANEXOS

Figura 1. Porcentaje de muestras, según grado de infiltrado inflamatorio crónico en la encía de los dientes no-ligados y ligados, según tratamiento. **IP** : índice de posición, **IC** : intervalo de confianza.



crónico en la encía de los dientes no-ligados y ligados, según tratamiento.
 IP: índice de posición, IC: intervalo de confianza.

Figura 2. Microfotografías de las secciones buco-linguales de encía, teñidas con hematoxilina y eosina, características de cada grupo: (a) no-ligado-vehículo, (b) ligado-vehículo y (c) ligado-Vimang (aumento original X40).

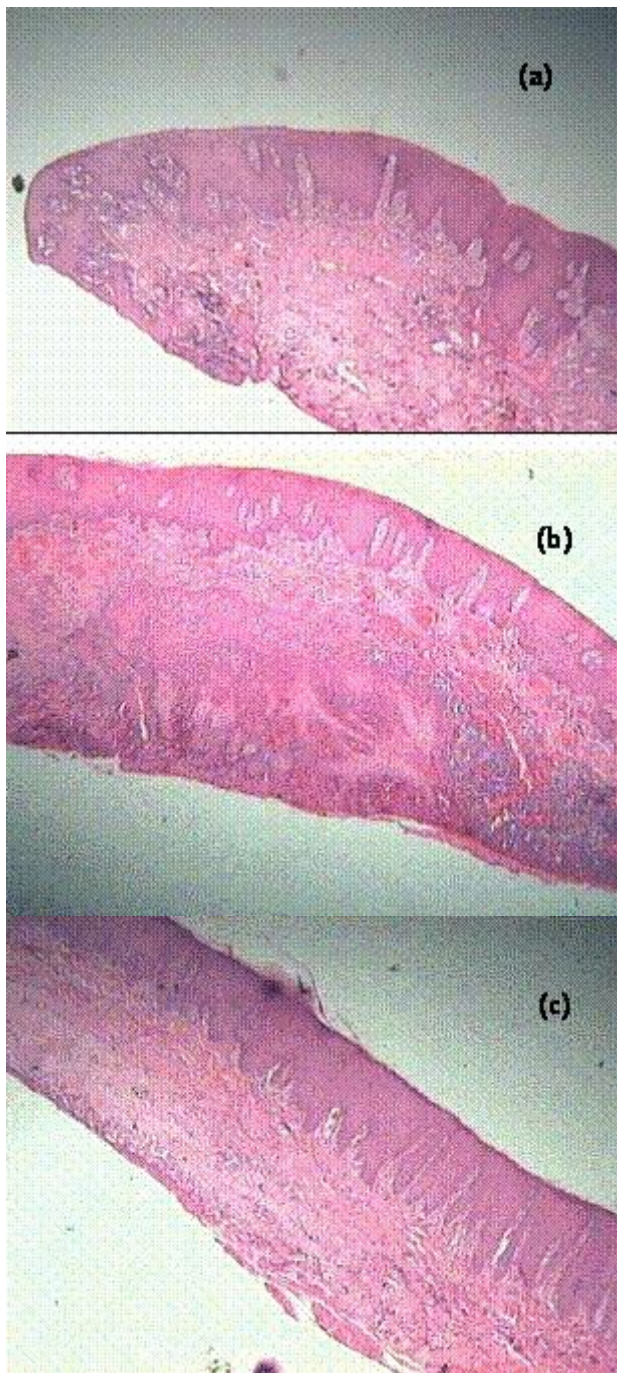


Figura 3. Porcentaje de muestras, según grado de hiperplasia del epitelio del surco gingival en la encía de los dientes no-ligados y ligados, según tratamiento. **IP** : índice de posición, **IC** : intervalo de confianza.

