UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

Efecto anti-inflamatorio del ácido hibiscus en la periodontitis inducida en un modelo de ratas Wistar

Tesis que para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA SALUD

Presenta:
C.D.E.O. Alelí Julieta Izquierdo Vega

Director(a) de Tesis
Dr. Manuel Sánchez Gutiérrez

San Agustín Tlaxiaca Hgo. Noviembre de 2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
Instituto de Ciencias de la Salud
School of Medical Sciences
Área Académica de Medicina
Department of Medicine

18/octubre/2021
AAM/MCBS/095/2021
Asunto: Asignación de Jurado de Examen

Alelí Julieta Izquierdo Vega
Alumna de la Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud

Por este conducto le comunico el jurado que le fue asignado a su Tesis titulada "Efecto anti-inflamatorio del ácido hibiscus en la periodontitis inducida en un modelo de ratas Wistar" con el cual obtendrá el **Grado de Maestra en Ciencias Biomédicas y de la Salud**; después de revisar la tesis mencionada y haber realizado las correcciones acordadas, han decidido autorizar la impresión de la misma.

A continuación, se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del jurado:

PRESIDENTE	Dra. Jeannett Alejandra Izquierdo Vega
PRIMER VOCAL	Dr. Manuel Sánchez Gutiérrez
SECRETARIO	Dr. Eduardo Osiris Madrigal Santillán
SUPLENTE	Dr. Carlos Enrique Cuevas Suárez
SUPLENTE	Dra. Araceli Hernández Zavala

Araceli Hdez Zavala

Sin otro asunto en particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.

Atentamente
"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD UAEH UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO DIRECCIÓN

M.C. ESP. ADRIÁN MOYA ESCALERA
DIRECTOR

DRA. LYDIA LÓPEZ PONTIGO
COORDINADORA DE POSGRADO ICSA

DR. MANUEL SÁNCHEZ GUTIÉRREZ
COORDINADOR DEL PROGRAMA

Circuito ex-Hacienda La Concepción s/n Carretera Pachuca Actopan, San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo, México. C.P. 42160
Teléfono: 52 (771) 71 720 00 Ext. 4308,2361,4346,4310
medicina@uaeh.edu.mx

Durante el desarrollo de estos estudios, se contó con una beca de manutención otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), número de beca **1006255**.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme cumplir una más de mis metas y a pesar de las adversidades nunca soltarme de su mano.

A mis Padres Alicia y Felipe por ser mis más grandes maestros de vida y motivarme a seguir adelante por enseñarme que mis límites son el cielo.

A mis hermanas Jeannett, Judith y Andrea por ser mis compañeras de vida y apoyarme incondicionalmente en todos mis proyectos.

A Chiwis y Luna por ser mi fuente de inspiración y por su cariño incondicional, gracias por desvelarse junto conmigo.

A todos mis profesores por compartir todo su conocimiento y apoyarme en la realización de este proyecto.

A Manuel por tu apoyo incondicional y por fungir además de mi director de tesis como mi hermano mayor, gracias por acompañarme en todo momento en la realización de este proyecto.

A Jeannett por todo el cariño y apoyo más que incondicional que me ofreciste para este proyecto, por los regaños y risas compartidas, te quiero mucho.

A mis amigos por acompañarme en esta aventura de vida por la bonita amistad que tenemos y por ser cómplices y apoyarme siempre.

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL V

RESUMEN IX
ABSTRACT X
INTRODUCCIÓN 1
I. GENERALIDADES 3
1.1 Periodonto 3
1.1.2 Encía 3
1.1.3 Ligamento periodontal 4
1.1.4 Cemento 5
1.1.5 Hueso alveolar 5
1.2 Enfermedad periodontal 6
1.2.1 Etiología y clasificación 6
1.2.2 Microbioma patógeno en la enfermedad periodontal 10
1.2.3 Epidemiología de la periodontitis 10
1.2.4 Mecanismo celular de la inflamación 11
1.2.5 La inflamación en la gingivitis 14
1.2.6 Proceso inflamatorio en la periodontitis 15
1.2.7 Terapéutica no quirúrgica de la periodontitis 16
1.2.8 Terapias alternativas para el control de la enfermedad periodontal 18
2. ANTECEDENTES DEL PROBLEMA 19
2.1 Jamaica *Hibiscus sabdariffa* L 19
2.1.2 Actividad bacteriostática y bactericida del extracto etanólico de la flor de la jamaica *Hibiscus sabdariffa* L 21
2.1.3 Actividad bactericida del extracto etanólico de la flor de la jamaica *Hibiscus sabdariffa* L. en cepas asociadas a la enfermedad periodontal 22
2.1.4 Actividad bactericida del extracto etílico de la flor de *Hibiscus sabdariffa* L. y enjuagues bucales a base de clorhexidina en modelos *in vitro* en cepas asociadas a enfermedad periodontal 23
2.1.5 Desarrollo de la biopelícula 25

2.1.5.1 Actividad bactericida del extracto etílico de la flor de *Hibiscus sabdariffa* L. en modelos *in vitro* con cepas de *Streptococcus sanguis* asociado a enfermedad periodontal 26

2.1.6 Actividad citotóxica de la clorhexidina al 2% en comparación con los extractos etanólicos de la flor de *Hibiscus sabdariffa* L. 27

2.1.7 Actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de la flor de *Hibiscus sabdariffa* L., en cepas de *Porphyromonas gingivalis y Streptococcus sanguis* comparadas con ampicilina 28

2.2 Planteamiento del problema 30

III. JUSTIFICACIÓN 32

IV. HIPÓTESIS 32

V. OBJETIVOS 32

5.1 Objetivo general 32

5.2 Objetivos específicos 32

VI. MATERIALES Y MÉTODOS 32

6.1 Tipo de estudio 32

6.2 Diseño del estudio 32

6.2.1 Registro del peso de los animales 33

6.3 Modelo de inducción de la enfermedad periodontal en ratas Wistar y sondeo periodontal 34

6.3.1 Criterios de la evaluación clínica de la enfermedad periodontal 35

6.3.2 Aplicación del ácido hibiscus 36

6.4 Obtención y manejo de las muestras para el análisis histológico 36

6.5 Análisis estadístico 38

VII. RESULTADOS 39

7.1 Peso 39

7.2 Evaluación de la periodontitis 40

7.2.1 Sondeo periodontal 40

7.2.2 Evaluación de la periodontitis mediante el sondeo periodontal 40

7.2.3 Evaluación clínica 41

7.3 Análisis histológico 43

VIII. DISCUSIÓN 45
8.1 Inducción de la periodontitis con ligadura y LPS 45
8.2 Actividad antimicrobiana del ácido hibiscus 46
8.3 Actividad antiinflamatoria del ácido hibiscus 47
X. CONCLUSIONES 48
XI. RECOMENDACIONES 49
XII. REFERENCIAS 50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características clínicas de una encía sana 4
Figura 2. Mecanismo de inflamación 13
Figura 3. Gingivitis 14
Figura 4. Periodontitis grado 4 15
Figura 5. Flor de la jamaica *Hibiscus sabdariffa* L 19
Figura 6. Estructura molecular de ácido hibiscus 20
Figura 7. Diagrama del modelo experimental 34
Figura 8. Sondeo periodontal 35
Figura 9. Procesamiento del ácido hibiscus 36
Figura 10. Procesamiento de la muestra para análisis histológico 37
Figura 11. Evaluación del peso durante la fase experimental 39
Figura 12. Registro de sondeo periodontal 40
Figura 13. Evaluación del sondeo periodontal durante la fase inicial, intermedia y post-tratamiento 41
Figura 14. Valoración clínica de la periodontitis durante la fase experimental 42
Figura 15. Evaluación histológica de las encías de las ratas 52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estadios de Periodontitis según la clasificación de 2018 8

Tabla 2. Grado de severidad de Periodontitis según la clasificación de 2018 9

Tabla 3. Recopilado de actividad bactericida a diferentes cepas bacterianas por extracto etanólico de la flor de la jamaica *Hibiscus sabdariffa* L 21

Tabla 4. Recopilado de actividad bactericida a diferentes cepas bacterianas asociada a enfermedad periodontal por el extracto etanólico de la flor de la jamaica *Hibiscus Sabdariffa* L. 23

Tabla 5. Recopilado de actividad bactericida sobre diferentes cepas bacterianas asociada a enfermedad periodontal por extractos acuoso, metanólico, acetato de etilo y etanólico de la flor de la jamaica *Hibiscus sabdariffa* L. 24

Tabla 6. Recopilado de la actividad bactericida del extracto etílico de la flor de *Hibiscus Sabdariffa* L. en modelos *in vitro* con cepas de *Streptococcus sanguis* asociado a enfermedad periodontal. 27

Tabla 7. Recopilado de actividad bactericida del extracto etanólico de la flor de la jamaica *Hibiscus Sabdariffa* L. en dos cepas bacterianas asociadas a enfermedad periodontal. 28

Tabla 8. Actividad bactericida de *Streptococcus sanguis* y *Porphyromonas gingivalis* cepas bacterianas asociadas a enfermedad periodontal por el extracto etanólico de la flor de la jamaica *Hibiscus Sabdariffa* L. 29

RESUMEN

La enfermedad periodontal representa uno de los padecimientos bucodentales de mayor prevalencia a nivel mundial. Los compuestos bioactivos de la flor de la jamaica (*Hibiscus Sabdariffa* L.), han demostrado tener actividad antinflamatoria además de actividad antimicrobiana contra diferentes cepas bacterianas como el *Streptococcus mutans*, y el *Streptococcus sanguis* entre otros; atribuyéndose dichas propiedades a los compuestos bioactivos de la flor de la jamaica. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto antiinflamatorio del ácido hibiscus obtenido de la flor de la jamaica, en un modelo de periodontitis inducida en ratas Wistar. La inducción de la periodontitis se realizó mediante la colocación de una ligadura entre los incisivos inferiores seguida de la inoculación de lipopolisacárido de *Porphyromona gingivalis* en la encía de las ratas. Con este modelo, se indujo una periodontitis grado 3, posteriormente se aplicó el tratamiento durante 15 días con ácido hibiscus en gel al 2% y al 4% y se comparó con la terapéutica con clorhexidina en gel al 2%. Después de los 15 días de tratamiento, en el grupo con ácido hibiscus se observó una disminución del edema en las encías generado por la periodontitis, acompañada de una reducción en la profundidad del surco. Este efecto antiinflamatorio se corroboró con el análisis histológico de las encías en donde se observó la reinserción del epitelio de unión en la zona cervical del diente, y de esta manera se limitó la pérdida vertical en las zonas de lesión periodontal. Estos resultados sugieren que el ácido hibiscus puede ser una alternativa de tratamiento natural no quirúrgico para controlar el daño generado en la encía por la periodontitis.

Palabras clave:
Ácido hibiscus, efecto antiinflamatorio, jamaica, periodontitis.

ABSTRACT

Periodontal disease represents one of the most prevalent oral diseases worldwide. The bioactive compounds of the hibiscus flower (*Hibiscus Sabdariffa* L.) have shown to have anti-inflammatory activity as well as antimicrobial activity against different bacterial strains such as *Streptococcus mutans*, and *Streptococcus sanguis* among others; These properties are attributed to the bioactive compounds of the hibiscus flower. The objective of the present study was to evaluate the anti-inflammatory effect of hibiscus acid obtained from hibiscus flower, in a model of induced periodontitis in Wistar rats. Induction of periodontitis was performed by placing a ligation between the lower incisors followed by inoculation of *Porphyromona gingivalis* lipopolysaccharide into the gingiva of rats. With this model, a grade 3 periodontitis was induced, subsequently the treatment was applied for 15 days with hibiscus acid gel at 2% and 4% and it was compared with the therapy with chlorhexidine gel at 2%. After 15 days of treatment, in the group with hibiscus acid, a decrease in edema in the gums generated by periodontitis was observed, accompanied by a reduction in the depth of the sulcus. This anti-inflammatory effect was corroborated with the histological analysis of the gums, where the reinsertion of the junctional epithelium in the cervical area of the tooth was observed, thus limiting the vertical loss in the periodontal lesion areas. These results suggest that hibiscus acid may be a non-surgical natural treatment alternative to control gum damage caused by periodontitis.

Keywords:
Hibiscus acid, anti-inflammatory effect, jamaica, periodontitis

INTRODUCCIÓN

Los procesos inflamatorios de las encías son uno de los principales motivos por los cuales los pacientes acuden a revisión odontológica, este problema es mejor conocido como gingivitis y se atribuye a un desbalance en el microbioma intraoral (1), acompañado de un déficit de higiene. Es importante controlar y evitar que se desarrolle una inflamación de tipo crónica, dando pie a que aparezca la enfermedad periodontal (2,3), afección que está directamente relacionada con algunas complicaciones importantes como la pérdida de los tejidos de soporte del diente, específicamente la inserción de la encía, el ligamento periodontal, el cemento y el hueso (3) este padecimiento es la principal causa de la pérdida de órganos dentales a edades tempranas por lo cual los pacientes debe someterse a procedimientos terapéuticos, quirúrgicos e invasivos para tratar de detener el daño gradual de sus tejidos. (4)

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera a la enfermedad periodontal como una de las 5 principales enfermedades bucodentales a nivel mundial (5,6) motivo por el cual es importante investigar alternativas terapéuticas, ya que se estima que en algún momento de la vida un individuo puede presentar gingivitis (7) y de no ser atendido oportunamente puede evolucionar y desarrollar la enfermedad periodontal. (8) La prevención nos ayuda a limitar las posibilidades de presentar esta enfermedad, por ello, siempre se recomienda atender los primeros signos y síntomas, como parte del control terapéutico. Para revertir el proceso inflamatorio ocasionado por la biopelícula (9,10) se utilizan algunas soluciones desinfectantes en las zonas de la encía afectadas, tales como clorhexidina, triclosán, yodopovidona, principalmente, sin embargo no puede ser utilizados por tiempo prolongado ya que se ha evidenciado su efecto citotóxico además de que el uso prolongado puede pigmentar los dientes. (11,12)

Por tal motivo, en este estudio se propone encontrar una alternativa terapéutica para el tratamiento no quirúrgico de la periodontitis; la flor de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.*)*, la cual ha demostrado tener diversos efectos benéficos para la salud, que incluyen actividades antiinflamatorias, antioxidantes, antimicrobianas, antihipertensiva e hipoglucemiante, entre otras. (13–17) Las propiedades de los extractos de *Hibiscus*

sabdariffa L. son atribuidas a sus compuestos orgánicos, antocianinas, polisacáridos y flavonoides y dentro de sus compuestos orgánicos se encuentra el ácido hibiscus, compuesto que tiene propiedades antimicrobianas y antiinflamatorias (18–23), por lo cual proponemos que ayudará a revertir los efectos producidos por la periodontitis inducida en un modelo inducido en ratas Wistar.

El presente estudio fue planteado para evaluar el efecto del ácido hibiscus en la inducción de la periodontitis en ratas Wistar. Para su desarrollo y presentación esta investigación se dividió en secciones. En la sección 1 se refieren conceptos teóricos relacionados con la enfermedad periodontal y las propiedades de la flor de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.*)*, y del ácido hibiscus. En la sección 2 se plantea la justificación, hipótesis, objetivos, material y métodos desarrollados en este trabajo. En la sección 3 se describen los resultados, discusión y conclusiones. Por último, se encuentra el listado de referencias que dan soporte teórico a esta tesis.

I. GENERALIDADES

1.1 Periodonto

El periodonto es considerado como la unidad biofuncional dentro de la cavidad oral conformada por los tejidos que rodean y dan soporte a los dientes, dentro de sus funciones principales se encuentran el anclaje para mantener los dientes en un sitio específico, mantener la integridad de la mucosa masticatoria, la amortiguación de las fuerzas masticatorias, la protección contra el medio externo, también representa una parte importante de las terminaciones de irrigación vascular y nerviosas que está sujeta al cambio a lo largo de la vida; estas funciones son llevadas a cabo a través de estructuras especializadas como: la encía, el cemento, el ligamento periodontal, y el hueso alveolar. (24,25)

1.1.2 Encía

La encía representa la unidad funcional primordial del periodonto; es la porción de la mucosa masticatoria que recubre los procesos alveolares y la porción cervical de los dientes, histológicamente está formada por tejido conectivo denso, altamente vascularizado, cubierto por epitelio escamoso estratificado y un tejido subyacente denominado lámina propia. (24,25)

Anatómicamente se divide en:

a) Encía marginal: sigue el patrón establecido por el contorno de la unión con el esmalte de los dientes.
b) Encía adherida: es firme, resistente y está firmemente unida al periostio subyacente del hueso alveolar.
c) Encía interdental: ocupa el espacio interproximal debajo del área de contacto del diente.

Cada uno de estos subtipos de encía tienen diferencias histológicas de acuerdo a la zona anatómica donde se ubican (Figura 1), debido a que la función primordial de la encía es proteger al diente de la interacción de la masticación con el medio ambiente y de la agresión de agentes patógenos en el medio interno. (26,27)

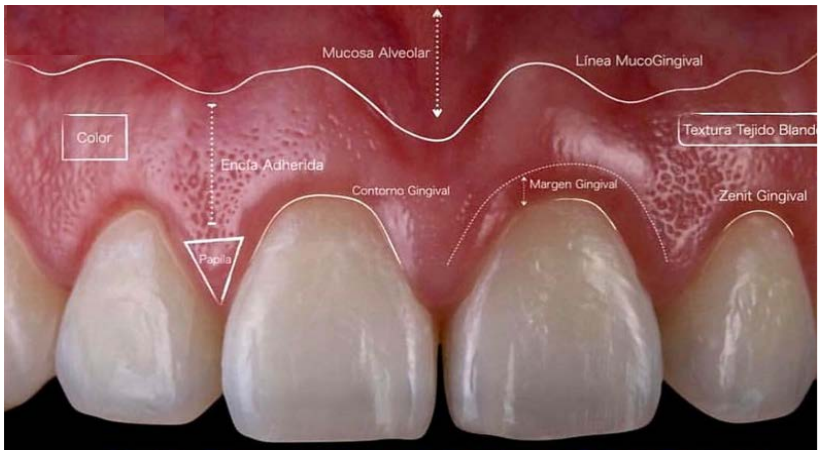

Figura 1. Características clínicas de una encía sana. Carranza y cols. 2014 (26)

Existen ciertas características macroscópicas que nos ayudan a determinar el estado de salud de los tejidos periodontales; en el caso de la encía, el color varía de rosa pálido a coral, esta variación está relacionada con el grado de vascularización, queratinización y espesor del epitelio, la textura debe presentar un puntilleo similar a una cáscara de naranja, lo cual es signo de salud y de consistencia firme y resilente. (27)

1.1.3 Ligamento periodontal

El ligamento periodontal es una estructura conformada por tejido conectivo fibroso y vascularizado, localizado en el espacio periodontal, está constituido principalmente por:

a) Fibras: Su función principal es la unión del diente con el proceso alveolar entre ellas se encuentran fibras de: colágena, reticulares, elásticas, oxitalánicas y de elaunina, las cuales están distribuidas en diferentes direcciones en la periferia del órgano dental con el objetivo de distribuir las fuerzas de la masticación. (28)
b) Sustancia fundamental: Está compuesta principalmente por ácido hialurónico, condroitín 4-sulfato, condroitín 6-sulfato, dermatán sulfato y heparán sulfato. (25,27)
c) Células: Se encuentran fibroblastos, osteoblastos y cementoblastos, además de células resortivas como: osteoclastos y cementoclastos, células defensivas como: macrófagos, mastocitos y eosinófilos, células o restos epiteliales de Malassez y células mesenquimatosas indiferenciadas; por el contenido celular especializado con

el que cuenta, participa activamente en el metabolismo óseo y tiene un papel muy importante en los procesos del movimiento dental. (25,27)

1.1.4 Cemento

El cemento es un tejido mineralizado especializado, no vascularizado; su función principal es el anclaje de las fibras del ligamento periodontal al hueso alveolar, recubre y protege la superficie radicular de los dientes desde la zona apical hasta la región cervical y puede extenderse sobre el esmalte dental, se caracteriza por que no tiene la capacidad de ser remodelado y es por lo general más resistente a la resorción que el hueso. El cemento está formado por elementos celulares como los cementoblastos y los cementocitos y por una matriz extracelular calcificada. Son células fenotípicamente diferentes de las células óseas. (25,28)

1.1.5 Hueso alveolar

Es la estructura de sostén que tiene en su interior espacios llamados alvéolos donde se alojan los órganos dentarios y cuenta con una serie de conexiones, a través de las cuales pasan los vasos sanguíneos, nervios y vasos linfáticos, de acuerdo a la zona específica donde se encuentre el hueso tiene diferentes características (28):

a) En el alvéolo: En esta capa compacta se distingue una zona ósea laminar, donde se insertan las fibras de Sharpey y recibe el nombre de hueso de inserción. El resto del tejido óseo se denomina hueso de sostén. También se le denomina lámina cribosa o placa cribiforme debido a los orificios de los conductos de Volkmann, por donde entran y salen los vasos sanguíneos del hueso.
b) En el periostio: La capa externa compacta cortical es de origen perióstico, mientras que la zona interna es de origen medular.
c) Tejido óseo compacto: Constituido por los sistemas de Havers, se localiza en las capas corticales.
d) Tejido óseo esponjoso o medular: Constituido por trabéculas, espículas y espacios medidores, se localiza en los tabiques alveolares.

Celularmente el hueso alveolar se compone de:

a) Osteoblastos: Son células formadoras de hueso que revisten el tejido óseo que se está formando como una capa epitelio, dejando entre ésta y el hueso un área de matriz no mineralizada llamada tejido osteoide.

b) Osteocitos: Emiten múltiples prolongaciones que contactan con las de otros osteocitos a través de unos *conductos calcóforos* que permiten constituir un *sistema canalicular* o sistema de microcirculación ósea.

c) Osteoclastos: Células gigantes multinucleadas destructoras de hueso.

1.2 Enfermedad periodontal

La enfermedad periodontal es una enfermedades inflamatoria e infecciosa propia de la encía y su evolución crónica que se caracteriza por la destrucción del periodonto o tejidos de soporte (hueso alveolar, ligamento periodontal, cemento, entre otros); por lo general su evolución es lenta y progresiva, inicia por un proceso inflamatorio en la encía caracterizado por la presencia de sangrado llamado gingivitis, si este proceso inflamatorio no es controlado, genera a largo plazo una periodontitis en donde además del sangrado de encías, clínicamente se observa una recesión gingival a causa de la pérdida de elementos importantes para la inserción y soporte epitelial como es la colágena y la fenestración ósea. (28)

1.2.1 Etiología y clasificación

La enfermedad periodontal es de origen multifactorial en donde la interacción de las condiciones de equilibrio periodontal del huésped, con la patogenicidad del microbioma oral, la dieta, el tiempo, el control mecánico de la biopelícula, y aspectos del medio ambiente, propician las condiciones ideales para la aparición de dicha afección. (7) Se consideran responsables del daño periodontal a las bacterias anaerobias: *Porphyromonas gingivalis, Actinobacillus actinomycetemcomitans, Prevotellas, Bacteroides forsythus, Eikenella*, y *Capnocytophaga;* las cuales se encuentran fuertemente asociadas a los diferentes tipos de periodontitis, aunque existen otros microorganismos relacionados con

menor frecuencia, los cuales también aparecen en las diversas formas de enfermedad periodontal. (29)

Recientemente, en 2018, la Asociación Americana de Periodontología (AAP) y la Federación Europea de Periodontología dieron a conocer una nueva clasificación para enfermedad periodontal, donde consideran nuevamente los criterios descriptivos para poder establecer una herramienta adecuada de identificación de dicho padecimiento, incluyendo principalmente tres tipos de enfermedad periodontal. (30)

1. La unificación del tipo de periodontitis (anteriormente crónica y agresiva).
2. Periodontitis asociada a condiciones sistémicas.
3. Periodontitis necrotizante.

Asimismo, en el instrumento diagnóstico se introduce el término de estadificación (Tabla1) y graduación de severidad (Tabla 2), en donde el estadio se refiere a las fases de progresión de la enfermedad periodontal y clínicamente describe la extensión de una lesión. Y la graduación determina el grado de progresión de la periodontitis. (31)

Dado que en la actualidad los avances en materiales dentales han logrado que las rehabilitaciones orales sean posibles gracias a los sustitutos biocompatibles (implantes), la nueva clasificación establece el estado de salud del sustituto en relación al periodonto e introducen términos diagnósticos para valorar el estado de salud peri-implantar, y sus equivalentes (mucositis peri-implantar y peri-implantitis). (32)

Tabla 1. Estratificación de los estadios de la periodontitis según la clasificación de American Academy of Periodontology and European Federation of Periodontology en 2018. (31)

Estadio de Periodontitis		Estadio I	Estadio II	Estadio III	Estadio IV
Severidad	Perdida de la inserción del epitelio de unión interproximal	1-2mm	4-3mm	≥5mm	≥5mm
	Valoración de la pérdida ósea Radiográfica	Tercio coronal <15%	Tercio coronal 15%-33%	Extensión del tercio medio al tercio apical de la raíz	Extensión del tercio medio al tercio apical de la raíz
	Dientes perdidos	No hay perdida dental		Perdida a causa de periodontitis ≤4dientes	Perdida a causa de periodontitis ≤5dientes
Complejidad	Local	profundidad de sondeo máxima ≤ 4mm mayormente pérdida ósea horizontal	Profundidad de sondeo máxima ≤ 5mm mayormente pérdida ósea horizontal	complejidad II profundidad de sondeo ≥ 6mm pérdida ósea vertical ≥3mm lesión en furca clase II o III moderado defecto de cresta moderado	Complejidad III Necesita rehabilitación a causa de disfunción masticatoria secundaria a trauma oclusal Grado de movilidad dental ≥2mm Perdida de la dimensión vertical
Extensión y distribución	Descripción del estadio	Descriptor de la extensión de la lesión localizada en el rango de incisivos hasta molares			

Tabla 2. Grado de severidad de Periodontitis según la Clasificación 2018 American Academy of Periodontology and European Federation of Periodontology. (31)

	Grado de periodontitis		**Grado A:** **Nivel bajo de progresión**	**Grado B:** **Nivel Moderado** **De progresión**	**Grado C:** **Nivel rápido de progresión**
Criterios primarios	Evidencia directa de progresión	Longitud de perdida radiográfica	Evidencia nula de pérdida desde hace 5 años	<2mm más de 5 años	≥2mm más de 5 años
	Evidencia indirecta de progresión	% perdida de hueso/años	<0.025	0.25-1.0	>1.0
		Fenotipo	Alto nivel de biofilm con pocos nivel de destrucción	Destrucción con acumulación de biofilm	Destrucción excesiva Acumulación excesiva de depósitos de biofilm Patrón de progresión rápida de avance de la enfermedad
Grado de modificaciones	Factores de riesgo	Fumadores	No fumadores	Consumo de <7 cigarros al día	Consumo de >10 cigarros al día
		Diabetes	Normo glicémicos /diagnóstico de no diabéticos	Hemoglobina glucosilada <7.0% en pacientes con diabetes	Hemoglobina glucosilada ≥7.0% en pacientes con diabetes

1.2.2 Microbioma patógeno en la enfermedad periodontal

Se ha determinado que el origen étnico y la genética juegan un papel muy importante en el desarrollo de la enfermedad periodontal y probablemente estén relacionados con el microbioma oral. (33)

Respecto al origen étnico se han aislado diferentes cepas de *A. actinomycetemcomitans* en distintas regiones geográficas, mientras que *P. gingivalis y Peptostreptococcus anaerobius* se han asociado a pacientes afroamericanos con periodontitis, en caucásicos *F. nucleatum* es la especie más frecuente; en latinos, así como en asiáticos y americanos se ha aislado más de un periodontopatógenos, entre ellos *P. gingivalis*, *T. forsythia* y *T. denticola*. La biopelícula tiene cambios con la edad del huésped y se ha demostrado que cepas de *P. gingivalis* parecen aumentar con la edad. En otro contexto, algunos estados fisiológicos temporales como el incremento de hormonas en el embarazo favorecen la predisposición a la presencia de ciertas especies de periodontopatógenos como *P. gingivalis* y *P. intermedia*. (33,34) Se ha demostrado que algunos factores detonantes de la enfermedad periodontal son el mal control de las técnicas de higiene y la acumulación de biopelícula, la raza, la edad, el sexo, el tabaquismo y las condiciones sistémicas comprometidas como la diabetes mellitus e hipertensión y obesidad. (35)

1.2.3 Epidemiología de la periodontitis

Reportes de la OMS, aseguran que a nivel mundial aproximadamente 3,580 millones de personas en algún momento de su vida, presentarán algún tipo de afección periodontal, ya que este padecimiento se encuentra dentro de las 5 afecciones bucodentales más comunes. (36) La Academia Americana de Periodoncia (AAP) reporta-hasta un 70% de incidencia de enfermedad periodontal presente en adultos mayores de 65 años en adelante. (37)

En Hidalgo, se ha reportado que un 80% de la población adulta mayor de 60% ha perdido piezas dentales a causa de enfermedad periodontal resultante de compromiso sistémico (diabetes mellitus). (38)

En México se han realizado estudios que aseguran que la frecuencia de padecer enfermedades periodontales es mayor en los sujetos de 40 a 80 años, del 70 al 90% de dicha población presenta periodontitis, los hombres presentan cuadros de periodontitis crónica avanzada y dicho padecimiento está directamente correlacionado con la situación económica del individuo. (39,40)

1.2.4 Mecanismo celular de la inflamación

La inflamación se define como la respuesta en cadena, donde ciertos sensores especializados son activados ante el daño generado a las células a causa de algún agente externo de origen biológico, químico, físico o mecánico, que altera el estado funcional, dependiendo del nivel en el que se encuentre la lesión (células, tejidos u órganos), y a través de mediadores químicos especializados que activan el sistema inmunológico, el cual emite una respuesta con actividad reparadora ante tal defecto (Figura 2). (41)

Los signos clínicos característicos del proceso inflamatorio se han descrito desde la antigüedad como rubor, tumor, coloración y dolor en la zona dañada. (42) En la inflamación los cambios fisiopatológicos más sobresalientes son:

a) Cambios vasculares: En el proceso inflamatorio los vasos sanguíneos sufren cambios importantes en el flujo y calibre que posibilitan y maximizan la salida de proteínas y células plasmáticas desde la circulación hacia el foco inflamatorio. Uno de los primeros cambios vasculares es la vasodilatación, inducida por la histamina, producida por las células cebadas y el ácido nítrico, que actúa sobre el músculo liso vascular, dilatándose, con el consiguiente aumento de la permeabilidad microvascular, resultado de la combinación del aumento de la presión hidrostática y la disminución de la presión osmótica, lo que lleva a la salida de líquidos del espacio intravascular al extravascular con la formación de edema. (42)

Estos cambios tienen como consecuencia la disminución de la velocidad sanguínea, que, sumada a la pérdida de líquido intravascular, concentración de hematíes y aumento de la viscosidad de la sangre, da como resultado la estasis venosa, la cual es responsable de la

marginación de los leucocitos, los cuales en condiciones normales circulan por el centro de los vasos. (42)

Simultáneamente se producen:

b) Cambios celulares: Los leucocitos deben viajar desde la luz de los vasos sanguíneos al sitio de la lesión y ejecutar ahí sus funciones de defensa, es decir, fagocitar al agente patógeno. A este proceso se le denomina extravasación y consta de tres etapas: Marginación, rodadura y adhesión al endotelio, diapédesis y migración a los tejidos intersticiales. Para que los leucocitos migran a través de las uniones inter endoteliales hacia el sitio de la lesión siguen el curso de una locomoción orientada por un gradiente químico, que es la quimiotaxis; los leucocitos se dirigen a esa zona, gracias a los agentes quimiotácticos, los cuales a su vez causan la activación leucocitaria. (43)

Los leucocitos activados cumplirán su función principal, eliminar al agente agresor del foco inflamatorio mediante la fagocitosis, que se dará en tres etapas, el reconocimiento y unión de partículas, interiorización con formación de vacuola fagocítica, y muerte o degradación del material patógeno ingerido. (43) La inflamación es una reacción rápida, por lo cual su cese también es rápido cuando el agente lesivo es eliminado y los mecanismos antiinflamatorios finalizan el proceso, se reabsorbe totalmente el exudado y se regeneran los tejidos destruidos. Este proceso dependerá del grado de respuesta de cada organismo a los mediadores químicos, y se podrán evidenciar tres posibles resultados del mismo, (resolución completa, curación por reemplazo de tejido conectivo es decir generación de una fibrosis, o progresión a una inflamación crónica. (42,43)

En la inflamación crónica las características más importantes son:

La actividad celular compuesta por macrófagos, linfocitos, células plasmáticas y una importante destrucción tisular y la formación de tejido fibroso y angiogénesis (proliferación de pequeños vasos sanguíneos), prevalece sobre exudado de líquidos. (42) Los macrófagos son derivados de los monocitos del torrente sanguíneo, los cuales, al igual que los neutrófilos en la inflamación aguda, son inducidos a migrar de la luz de los vasos hasta el foco de la inflamación, por acción de los factores quimiotácticos. Estos macrófagos se

activan gracias a citocinas producidas por las células T o por otros factores de origen no inmunitario. Este grupo celular será el de acumulación más persistente en la inflamación crónica. Otras células que interfieren en este cuadro inflamatorio son los linfocitos y los eosinófilos. Las células cebadas están distribuidas por los tejidos conjuntivos y están presentes tanto en inflamación aguda como en la crónica. Una forma específica de inflamación crónica es la inflamación granulomatosa, como reacción inflamatoria distintiva, la cual consiste en la presencia de granulomas. (42)

Los granulomas son focos microscópicos que se caracterizan por la presencia de agregados de macrófagos transformados en células epiteliales, que se refleja por un aplanamiento celular además de aumento de volumen, y a su vez estas células epiteliales están rodeadas por un collar de leucocitos mononucleares. Entre las causas para que se desencadene este tipo de inflamación, podemos mencionar causas bacterianas, como en el caso de tuberculosis y lepra, parasitarias, micóticas, por metales pesados, por presencia de cuerpos extraños, y por causas desconocidas. (41–43)

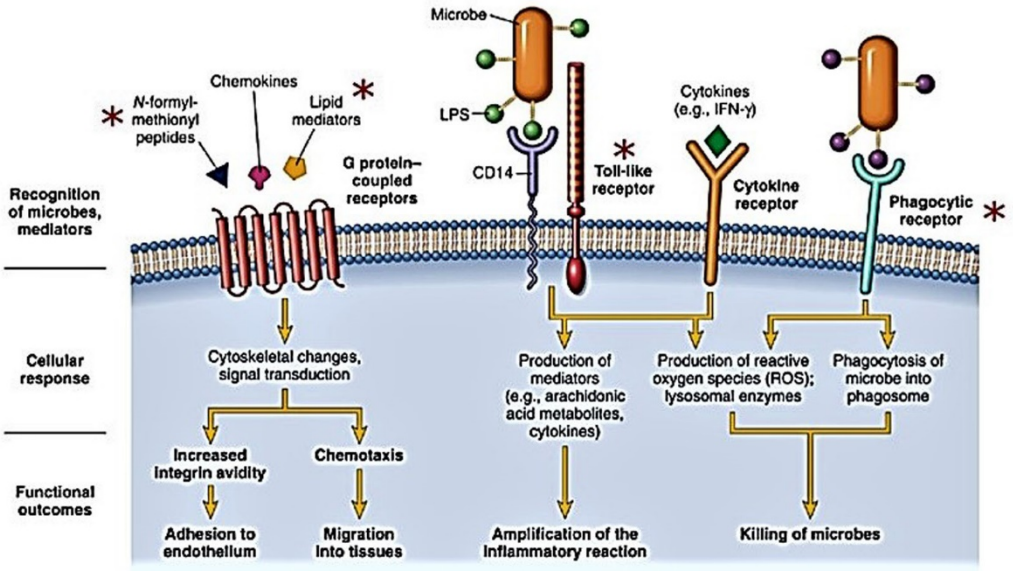

Figura 2. Mecanismo de inflamación. Kumar y cols 2012. (43) En el esquema se precia la activación de un proceso inflamatorio el cual comienza en respuesta a una lesión en el organismo, existen algunos compuestos químicos que, al ser liberados por el tejido dañado, activan al sistema de defensa a través de receptores específicos los cuales inician el mecanismo de reparación del daño.

1.2.5 La inflamación en la gingivitis

La inflamación en la gingivitis inicia cuando las bacterias patógenas entran en contacto con las células del epitelio del surco, células del epitelio de unión que producen defensinas y citoquinas pro-inflamatorias. (44) Las defensinas son péptidos antimicrobianos que dañan la superficie de las bacterias, permitiendo su eliminación y son de gran importancia para la producción de IL-1 y TNFα que generan cambios vasculares, incrementa el calibre de los vasos sanguíneos e inducen la expresión de proteínas de adhesión celular Figura 3. (44,45)

Figura 3. Gingivitis. En esta imagen se precia una arquitectura irregular en la morfología de la papila interdental, el enrojecimiento y sangrado de la zona causado por la gingivitis. (25)

Adicionalmente, producen IL-8, una citoquina con actividad quimiotáctica para los polimorfo nucleares y estos van a la zona de crecimiento bacteriano, salen del vaso sanguíneo y se acumulan en el tejido conectivo adyacente al surco del epitelio de unión, liberando consigo reactivos del oxígeno y enzimas como catepsina G, lactoferrina, defensinas, mieloperoxidasa, metaloproteinasas (MMP-8) y proteasas séricas; el agente infeccioso es controlado en la mayoría de casos, el estímulo disminuye y se establece un balance de la respuesta inmune. (44,45) En una lesión “estable”, es decir, gingivitis o un periodonto en donde hay inflamación muy ligera, la respuesta inmune es principalmente del tipo innata y por linfocitos T CD4 del perfil Th1 (T helper). Este perfil de linfocitos produce TNF e IL-2, y esto favorece una fuerte respuesta de macrófagos y PMNs y producción de anticuerpos tipo IgG, el objetivo es ayudar a resolver el proceso

inflamatorio, la respuesta innata es fundamental para mantener la salud periodontal. Los linfocitos T CD4 producen citoquinas (IFNγ, IL-2) que promueven mejor actividad de macrófagos y co-estimulan a los linfocitos B a producir anticuerpos tipo IgG e IgA neutralizantes; 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. (44–46)

1.2.6 Proceso inflamatorio en la periodontitis

En la periodontitis clínicamente se puede observar la formación de la bolsa periodontal debido a la pérdida de la inserción del epitelio de unión y pérdida ósea, esta lesión presenta características inmunológicas de una respuesta inmune innata disminuida, con presencia de abundantes plasmocitos (50%) y linfocitos T CD4 del perfil (T helper) Th2, los cuales producen IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, favoreciendo la producción de IgG4, IgE y la supresión de los macrófagos, un paciente con periodontitis puede tener grandes cantidades de linfocitos B productores de anticuerpos, solo que estos no brindan protección ni neutralización del agente infeccioso, una lesión periodontal avanzada presenta todos los indicadores de una respuesta inmune activa frente a la placa bacteriana; si bien los linfocitos B dominan la lesión, no brindan protección en algunos pacientes y ocurre pérdida de inserción Figura 4. (46)

Figura 4. Periodontitis grado 4. En esta imagen se observa la destrucción de la inserción de epitelio de unión a causa de la periodontitis, por lo cual las raíces de los dientes pierden la protección de la encía y se encuentran expuestas, lo cual las hace susceptibles de otras patologías. (25)

Existen varios eventos celulares y moleculares que determinan que ocurra la pérdida de inserción; cuando la respuesta inmune no es capaz de eliminar el agente infeccioso, el proceso inflamatorio se vuelve crónico; con esto, la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-1β, TNFα), continúa por largos períodos de tiempo y pasando desapercibida por el sujeto. Esto genera un gradiente progresivo que se distribuye inicialmente en el tejido conectivo subyacente al epitelio de unión y luego progresa hacia apical hasta la inserción de tejido conectivo y hueso alveolar. A medida que siguen llegando células como monocitos y linfocitos T CD4, se van estableciendo en estas zonas; los monocitos, macrófagos y fibroblastos gingivales son estimulados por estas citoquinas para producir aún más IL-1β y TNFα. Por otra parte, los linfocitos T CD4 expresan y producen RANK-L, una citoquina determinante en la activación de osteoclastos junto con IL-1β y TNFα, pero los monocitos y macrófagos no solo producen citoquinas, también producen metaloproteinasas MMP-2, MMP-3 y MMP-9, mientras que los fibroblastos gingivales producen principalmente MMP-1. (46)

Estas enzimas y otras, producidas dentro del tejido conectivo por las células inflamatorias, permiten la degradación de las fibras colágenas y por ende, la inserción de tejido conectivo; de forma paralela, se está produciendo localmente en la zona cercana a la cresta ósea, IL-1β, TNFα y RANK-L: adicionalmente se ha reportado que los linfocitos B pueden ser una fuente importante de IL-1β. (45) Esta cascada de mediadores moleculares favorece la activación de osteoclastos y permite la pérdida ósea, al quedar sin soporte periodontal, el epitelio de unión migra de forma patológica en sentido apical, presentándose clínicamente como la bolsa periodontal. El epitelio de unión, que antes servía de mecanismo de defensa, ahora se encuentra ulcerado y con poca resistencia a la penetración de factores de virulencia y en menor frecuencia, microorganismos hacia el tejido conectivo. (46)

1.2.7 Terapéutica no quirúrgica de la periodontitis

La terapéutica no quirúrgica empleada en la enfermedad periodontal siempre va encaminada al control del microbioma oral, por medio de:

Fase 1: Concientización del paciente, control mecánico de la biopelícula (técnica de cepillado), eliminación de factor de riesgo como tabaquismo, control dietético, control de afección sistémica en caso de presentarla, eliminación de bolsas periodontales, cálculo dental supragingival por medio de una profilaxis, se pueden utilizar sustancias químicas para el control de los niveles de microbioma oral. (47,48)

Fase 2: Curetaje cerrado raspado y alisado de las superficies expuestas a causa de la pérdida de inserción de tejido gingival, con el objetivo de que no exista resistencia mecánica sobre las superficies y de esta manera la biopelícula pueda ser controlada. (47)

Fase 3: Curetaje abierto: microcirugía en las zonas donde existe mayor deterioro periodontal y donde es posible localizar cálculo dental en las zonas infra gingivales, el objetivo es eliminar el factor mecánico detonante de abscesos periodontales, alisar la superficie dañada infra gingival, con el objetivo de mejorar la calidad de los tejidos internos de soporte. (47)

Actualmente se utiliza aparatología ultrasónica con el objetivo de adicionar a esta terapia mecánica, la desinfección por medio de soluciones desinfectantes como la clorhexidina en diferentes concentraciones para un control químico de la biopelícula. (48)

La povidona yodada o polivinilpirrolidona yodada ha sido utilizada como antiséptico subgingival, entre otros, se utiliza en 2 concentraciones distintas; al 1% como solución irrigadora del aparato ultrasónico, con el que se realiza la instrumentación mecánica, o al 10% para irrigación subgingival en un tiempo de exposición de 5 minutos. (48)

La clorhexidina, tiene efectos bactericidas, para tener alguna eficacia a nivel subgingival, la concentración ideal es del 1 al 2%, y en un tiempo de exposición de 10 minutos; esto se debe a que tiene menos adherencia a la superficie radicular, y es neutralizada rápidamente por las proteínas séricas y abundantes en esta zona subgingival, y por las que esta sustancia tiene mucha afinidad. Cuando el paciente tiene que utilizar esta solución la concentración cambia y suele utilizarse tópicamente al 0.12% (15 cc durante 60 seg) o al 0.2% (10 cc

durante 30 seg), con similares resultados, disminuyendo el índice, la biopelícula y el índice de sangrado. El antiséptico más utilizado, quizá por su eficacia y economía, para este fin es el hipoclorito sódico, a una concentración del 0.1% en la terapéutica suelen mezclarlo con alguna infusión herbolaria para mejorar el sabor, el tiempo recomendado de exposición del producto es de 1 minuto durante 30 días o hasta ver efectos en la reparación tisular. (47,48)

1.2.8 Terapias alternativas para el control de la enfermedad periodontal

La medicina herbolaria es la forma más antigua de la cual se tiene registro para la atención de diversas enfermedades a nivel mundial. (49)

En México existe una diversidad muy grande de plantas catalogadas de tipo medicinal y que en la actualidad su terapéutica sigue siendo utilizada, algunas organizaciones reconocidas internacionalmente, aprueba la atención de enfermedades con esta terapéutica alternativa, ya que en algunos países en vías de desarrollo no han logrado establecer buenos programas de atención de salud pública y ante la evidencia científica de los beneficios de utilizar la medicina herbolaria aprueban el uso y manejo de plantas y extractos por su valor terapéutico. (49)

En el campo de la odontología algunos medicamentos están hechos a base de concentrados herbolarios por su gran capacidad de acción, como es el caso del eugenol que está hecho a base de extracto de clavo el cual tiene efectos sedantes, antisépticos y quelantes. En el intento de buscar cada vez mejores materiales para la atención odontológica se ha puesto gran interés por los compuestos naturales y se ha logrado evidenciar los efectos terapéuticos de los mismos, de tal forma que se han propuesto nuevas alternativas de tratamiento para las principales afecciones más comunes incluida la enfermedad periodontal. (50)

Para ello se han utilizado de manera popular y por mucho tiempo algunas raíces, plantas y cortezas para reducir el problema, y la terapéutica empleada ha sido a través de infusiones, enjuagues, extractos o masticando directamente la raíz o corteza; para ejemplificar esto,

uno de los signos característicos de la gingivitis es el sangrado y dolor de las encías para lo cual se han utilizado plantas como *Caléndula, Equinácea purpúrea, Manzanilla, Cocolmeca, Arayán, Capulín, Sanguinaria mexicana, Aloe, Propóleo*; sin embargo si el problema periodontal es más grande como en los estadios de periodontitis crónica algunos otros signos clínicos es la movilidad dental y para aminorar estos efectos se han utilizado *Encino, Palo de pulque, Acacia, Nance agrio, Cabello de ángel, Pata de león, Tepehuaje, Hierbabuena, Palo de aguacate.* (49) El efecto astringente, antiséptico, antiinflamatorio, hemostático, sedante, antibacterial entre otros que ofrecen, logran generar una mejoría notable en los tejidos periodontales, de ahí la necesidad de utilizarlos como un recurso terapéutico, sin embargo, al no tener evidencia suficiente de la concentración el tiempo de uso y la forma de aplicación de cada uno de ellos para lograr el efecto generan la necesidad de investigar cada vez más y a profundidad la utilización de los mismos. (49,50)

2. ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

2.1 Jamaica *Hibiscus sabdariffa* L.

La jamaica *(Hibiscus sabdariffa* L.*);* conocida como hibisco, pertenece a la familia de las malváceas y es originaria de África tropical, aunque, su cultivo se extiende por México, América Central y del Sur y Sudeste Asiático, algunas regiones de México, particularmente Guerrero y Oaxaca, son los principales productores con el 85% de la producción nacional. Las flores o cálices se han utilizado como alimento ya sea para bebidas frías o calientes, como agente saborizante en la industria de los alimentos y como tratamiento herbal por parte de la medicina popular por lo que es ampliamente utilizada entre la población en general. (51)

Figura 5. Flor de la jamaica *Hibiscus sabdariffa* L. (50)

Los principales componentes de *Hibiscus sabdariffa* L. en el contexto de sus propiedades farmacológicas son ácidos orgánicos, antocianinas, polisacáridos y flavonoides, las flores o cálices carnosos y de color rojo intenso (Figura 5), presentan altas concentraciones del ácido L-ascórbico, ácido araquidíco, ácido cítrico, ácido hidroxicitrico, ácido esteárico y ácido málico, además de pectinas, fitoesteroles y polifenoles. Adicionalmente, se han investigado diferentes componentes de la planta en el manejo de diversas afecciones (52); ya que cuenta con propiedades antioxidantes, antidepresivas, diuréticas, hepatoprotectoras (53), antihipertensivas (54), cardioprotectoras, hipo-lipidémicas (55), hipoglucemiantes (56), antiinflamatorias y antibacterianas. (57)

Dentro de los principales componentes orgánicos de la jamaica, encontramos al ácido cítrico y al ácido hibiscus los cuales, por su estructura molecular sugieren poseer actividad antiinflamatoria. (57)

Ácido hibiscus: molecularmente es la forma de lactona de (+) - ácido alo-hidroxicítrico. Es muy parecido del ácido cítrico con un grupo hidroxilo adicional en el segundo carbono y tiene dos diastereómeros debido a la existencia de dos centros quirales del ácido hidroxicítrico, ácido hibiscus y sus derivados como ácidos orgánicos principales en los extractos de las hojas y los cálices de *Hibiscus sabdariffa* L. (57)

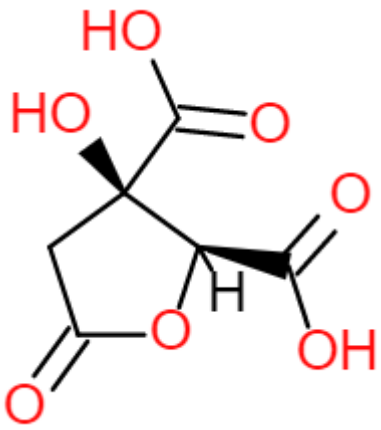

Figura 6. Estructura molecular de ácido hibiscus. (18)

2.1.2 Actividad bacteriostática y bactericida del extracto etanólico de la flor de la jamaica *Hibiscus sabdariffa* L.

Estudios previos han evidenciado los efectos benéficos para la salud que tiene la flor de jamaica. Se ha demostrado que los extractos etanólicos de la flor de *Hibiscus sabdariffa* L., tienen actividad antibacteriana en cepas gram negativas anaerobias ya que cuenta con una gran riqueza en metabolitos fotoquímicos y se ha revelado la presencia de compuestos fenólicos alcaloides, flavonoides y saponinas, estos compuestos son considerados los principales grupos de compuestos antimicrobianos en plantas. (58,59) El grupo de bacterias con el que se ha probado la eficacia del extracto etanólico de la flor de la jamaica se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Recopilado de actividad bactericida a diferentes cepas bacterianas por extracto etanólico de la flor de la jamaica *Hibiscus sabdariffa* L. (58,59)

Cepa bacteriana asociada a la Enfermedades gastrointestinales y enfermedades nosocomiales	Características	Concentración mínima inhibitoria
Acinetobacter baumannii (Gram negativa aeróbica)	Patógenos nosocomiales, responsable de enfermedades intrahospitalarias	25 y 50 mg / mL,
Escherichia coli (Gram negativa aeróbica)	Responsables de las enfermedades gastrointestinales	(6,5 mg / mL)
Vibrio parahaemolyticus (Gram negativa aeróbica)	Responsables de las enfermedades gastrointestinales	100 µL (10, 5, 2.5,)
Salmonella enteritidis (Gram negativa aeróbica/anaeróbica)	Responsables de las enfermedades gastrointestinales	100 µL (10, 5, 2.5)
Bacillus cereus (Gram positiva anaerobia)	Causante de intoxicaciones alimentarias	100 µL (2.5)
Pseudomonas aeruginosa, (Gram negativa aeróbica)	Causante de enfermedades de vías respiratorias, vías urinarias, sepsis en infecciones generalizadas	100 µL (2.5)
Staphylococcus aureus (Gram positiva anaerobia)	Causante de enfermedades como celulitis, abscesos profundos, osteomielitis, meningitis, sepsis, endocarditis	100 µL (2.5)

2.1.3 Actividad bactericida del extracto etanólico de la flor de la jamaica *Hibiscus sabdariffa* L. en cepas asociadas a la enfermedad periodontal

La caries dental y la periodontitis se han convertido en un problema de salud a nivel mundial que ha sido difícil de erradicar, diversos estudios han evidenciado a las cepas que conforman parte del microbioma patógeno dentro de la cavidad oral, entre las más representativas encontramos a: *Streptococcus mutans* un gram positivo, principal responsable de la caries dental, a *Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia Fusobacterium nucleatum* y *Actinobacillus actinomycetemcomitans,* como principales responsables de la enfermedad periodontal crónica. (60)

En ensayos *in vitro* se ha probado la eficacia del extracto etanólico de la flor de la jamaica *Hibiscus sabdariffa* L.*,* y se observó una variación en la concentración mínima inhibitoria para las diferentes cepas (tabla 4), en las concentraciones de 7.2 mg/mL a 28.8 mg/mL y la concentración máxima bactericida varió de 14.4 mg/mL a más de 57.6 mg/mL.; *S. mutans, F. nucleatum y P. gingivalis* fueron las bacterias más sensibles a la concentración mínima inhibitoria (= 7.2 mg/mL). Las bacterias menos sensibles fueron *S. sanguinis, L. casei* y *A. actinomycetemcomitans* (la concentración mínima inhibitoria = 28.8 mg/mL). (60)

Los resultados confirman que el extracto de *Hibiscus sabdariffa* L., tiene actividad bactericida contra bacterias cariogénicas y periodontopatías. La concentración máxima bactericida mostró más fuerte actividad contra *F. nucleatum, P. intermedia* y *P. gingivalis*, que indicó que la concentración máxima inhibitoria, fue más efectiva contra bacterias gram negativas que las bacterias gram positivas, esto puede deberse a las diferencias en la estructura de la pared celular bacteriana. La pared de bacterias gram positivas es más gruesa que la del gram negativo. Los flavonoides tienen la capacidad de unirse con las paredes celulares bacterianas. Además, con el número de los grupos hidroxilo presentes en el anillo fenólico del extracto aumentan porque la hidroxilación, a su vez conduce a un aumento en la actividad antimicrobiana. (60)

Tabla 4. Recopilado de actividad bactericida a diferentes cepas bacterianas asociada a enfermedad periodontal por el extracto etanólico de la flor de la jamaica *Hibiscus Sabdariffa* L. (60)

Cepa bacteriana asociada a la enfermedad periodontal	Tipo	Características	Concentración mínima inhibitoria de extracto etanólico
Streptococcus mutans	Gram positiva	Anaerobia	(7.2 mg/mL)
Porphyromonas gingivalis	Gram negativo	Anaerobio	(7.2 mg/mL)
Prevotella intermedia	Gram negativo	Anaerobia	(7.2 mg/mL)
Fusobacterium nucleatum	Gram negativa	Anaerobia	(7.2 mg/mL)
Actinobacillus actinomycetemcomitans	Gram negativa	Anaerobia	(28.8 mg/mL)

Los efectos inhibitorios del extracto sobre la formación de la biopelícula intraoral dependen de los compuestos fenólicos presentes en el extracto, porque estos compuestos se unen fuertemente a las proteínas y a las enzimas, por lo tanto, las bacterias no pueden unirse a la superficie del diente. (60)

2.1.4 Actividad bactericida del extracto etílico de la flor de *Hibiscus sabdariffa* L. y enjuagues bucales a base de clorhexidina en modelos *in vitro* en cepas asociadas a enfermedad periodontal

Estudios recientes *in vitro* han evaluado la efectividad de la actividad antimicrobiana para cepas patógenas responsables de caries dental y de la enfermedad periodontal, dentro de ellas se encuentran *Streptococcus mutans, Streptococcus sanguinis, Staphylococcus aureus, Capnocytophaga gingivalis*, utilizando extractos acuoso, etanólico, metanólico y de acetato de etilo de la flor de *Hibiscus sabdariffa* L. (61)

A su vez se realizó una comparación con enjuagues bucales comerciales donde los principales componentes bactericidas son la clorhexidina, el cloruro de cetilpiridinio, la hexetidina y el triclosán, los resultados de este estudio demostraron que el extracto etanólico de la flor de la jamaica es capaz de reducir la viabilidad de *S. sanguinis* en la biopelícula, y su eficacia como agente antimicrobiano es más efectivo en la fase de formación de biopelícula. Los resultados de esta investigación demostraron que las concentraciones mínimas inhibitorias para los extractos acuosos de la flor de *Hibiscus*

sabdariffa L., fueron de entre 9.7 y 10.3 mg/mL para las diferentes cepas (tabla 5), mientras que los extractos metanólicos mostraron una inhibición en concentraciones de 10.3 mg/ml a 11.3 mg/mL, el extracto etanólico mostró actividad entre 10.2 y 11.4 mg/mL y los de acetato de etilo de entre 11.6 y 13 mg/mL, mientras que para los controles de uso comercial las concentraciones fueron de 9.7 a 10.3 mg/mL. Es importante destacar que todos los extractos la flor de la jamaica *Hibiscus sabdariffa* L., tienen mayores efectos bactericidas que los enjuagues bucales comerciales. (61)

Tabla 5. Recopilado de actividad bactericida sobre diferentes cepas bacterianas asociada a enfermedad periodontal por extractos acuoso, metanólico, acetato de etilo y etanólico de la flor de la jamaica *Hibiscus sabdariffa* L. (61)

Cepa bacteriana	Extracto acuoso	Extracto metanólico	Extracto acetato de etilo	Extracto etanólico	Concentración de enjuagues bucales comerciales (Astringosol®, Colgate plax ice infinity®, Crest pro – health®, Dental max®, Equate® y Listerine zero)
Streptococcus mutans	10.3mg/mL	10.8mg/mL	13 mg/mL	10.2mg/mL	9.7mg/mL
Streptococcus sanguis	9.8 mg/mL	10.5mg/mL	12.5mg/mL	10.6mg/mL	9.4mg/mL
Porphyromona gingivalis	9.9 mg/mL	11.3mg/mL	12.7mg/mL	11.4mg/mL	9.2mg/mL
Staphylococcus aureus	9.7mg/mL	10.3mg/mL	11.6mg/mL	11.1mg/mL	10.3mg/mL

2.1.5 Desarrollo de la biopelícula

La mayoría de las patologías gingivales están directamente relacionadas con el grado de patogenicidad de las cepas alojadas en la biopelícula, y con el objetivo de controlar a la enfermedad periodontal, la terapéutica ampliamente conocida es la utilización de sustancias químicas como la clorhexidina, el triclosán e hipoclorito de sodio en baja concentración, sin embargo durante años se ha demostrado el efecto citotóxico que se genera por el uso prolongado de estas sustancias, además de la pérdida de la de sensibilidad por parte de las papilas gustativas en la lengua y la irritación en la mucosa, estas desventajas nos dan la pauta para buscar nuevas alternativas terapéuticas. (62)

Es importante considerar que después de la colonización, la biopelícula comienza a madurar y su tendencia de crecimiento está relacionada con el tiempo en que esta placa bacteriana permanezca sobre la superficie intraoral, es decir, a mayor tiempo de colonización más denso se volverá la biopelícula lo cual afecta en algunas ocasiones la efectividad de las sustancias antimicrobianas, por ello es importante considerar las fases de formación de biopelícula. Para comprobar la efectividad del extracto etanólico de la flor de *Hibiscus sabdariffa* L., como antimicrobiano en un modelo *in vitro*, se utilizó cristal violeta como un indicador para medir la cantidad de bacterias de acuerdo a la coloración que estas presentaran. (63)

Fase de adherencia: Se forma 4 horas después de la colonización y se ha descrito que la mayor cantidad de bacterias son (Estreptococos (61-78%) como *S. sanguinis*, *S. mitis*, *S. oralis* y *Actinomyces* (4 a 30%). (63)

Fase de acumulación: Se considera que se ha formado entre 4-20 horas de incubación dentro de la cavidad oral, aquí es muy claro que la cantidad de bacterias tienen un crecimiento exponencial rápido. (63)

Adherencia: Esta fase el crecimiento de colonias bacterianas es demasiado de tal suerte que los ácidos que general las bacterias como parte de su metabolismo pueden generar daños sobre el esmalte dental dando así oportunidad de que se genere caries dental y por otro lado la predisposición a presentar enfermedad periodontal, ya que el desequilibrio del biofilm patógeno es un factor importante para considerar en el desarrollo de dicha enfermedad. (63)

2.1.5.1 Actividad bactericida del extracto etílico de la flor de *Hibiscus sabdariffa* L. en modelos *in vitro* con cepas de *Streptococcus sanguis* asociado a enfermedad periodontal

Por los múltiples beneficios que se le han atribuido a los extractos de la flor de la jamaica *Hibiscus sabdariffa* L., se ha descubierto dentro de sus componentes orgánicos la actividad de los flavonoides quienes participan en la inhibición del crecimiento bacteriano por los compuestos que generan mediante los enlaces de hidrógeno y de los polifenoles que favorecen la desnaturalización de la membrana bacteriana. (64)

El resultado de esta investigación demostró que la utilización del extracto etílico de la flor de la jamaica como antimicrobiano es capaz de reducir la viabilidad de *S. sanguinis* en la biopelícula en la fase de acumulación a bajas concentraciones del 0.02% y hasta el 3.2%, y en la fase de adherencia las concentraciones de 20%, 30%, 40% y 50% fueron más efectivas. La respuesta a este fenómeno es que el aumento de la concentración del extracto etanólico de la flor de *Hibiscus sabdariffa* L., tiende a reducir la unión de *S. sanguinis* a la biopelícula no solo en la fase de acumulación (20 h), también en la fase de adherencia (24h). En la fase de acumulación (20h), las concentraciones del extracto 30%, 40% y 50% no ocasionaron una mejoría en comparación con las dosis de menor concentración; mientras que en la fase de maduración (24h), las concentraciones de extracto de 20%, 30%, 40% y 50% mostraron una mayor tasa de crecimiento en comparación con las de menor concentración. Por otro lado, la capacidad de unión de las bacterias a la biopelícula se ve disminuida ya que *S. sanguinis* necesita de adhesinas, mismas que no se generan a causa del efecto del extracto etílico de la flor de *Hibiscus sabdariffa* L. Por otro lado, la eficacia del extracto etílico de la flor *Hibiscus sabdariffa* L, para reducir la viabilidad de *S. sanguinis* es igual a clorhexidina 0.1% y 0.2% en ambos adherencia fase (20h) y fase de maduración (24h). (64)

Tabla 6. Recopilado de la actividad bactericida del extracto etílico de la flor de *Hibiscus Sabdariffa* L. en modelos *in vitro* con cepas de *Streptococcus sanguis* asociado a enfermedad periodontal. (64)

Cepa bacteriana asociada a la Enfermedad Periodontal	Tiempo de formación de biofilm	Control de proliferación cristal violeta	Concentración mínima inhibitoria
Streptococcus sanguis	20 horas	Concentración 4%	0.02-3.2 %
Streptococcus sanguis	24 horas	Concentración 4%	20%, 30%, 40% y 50%

2.1.6 Actividad citotóxica de la clorhexidina al 2% en comparación con los extractos etanólicos de la flor de la jamaica *Hibiscus sabdariffa* L.

Bacterias específicas como *Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, Fusobacterium nucleatum* y la familia de los *Actinomicetemcomitanes*, entre otras, son inductores asociados a la periodontitis, uno de los mecanismos para eliminación de estos patógenos sobre la superficie dental es la eliminación mecánica de la biopelícula intraoral cepillando los dientes, el uso de hilo dental y otros coadyuvantes para la higiene dental. La clorhexidina se utiliza generalmente como un tratamiento para el control de placa bacteriana, sin embargo, se han estudiado sus efectos adversos incluyendo manchas en los dientes, y sobre todo el efecto perjudicial sobre tejidos como la encía generando reacciones de hipersensibilidad. (65) Es por ello que los extractos etanólicos de la flor de *Hibiscus sabdariffa* L. pueden servir como una alternativa terapéutica para la enfermedad periodontal al compararlo con la clorhexidina en modelos *in vitro* de cultivos celulares. (66) Se utilizó extracto etanólico de la flor de *Hibiscus sabdariffa* L., y se mostró una fuerte actividad inhibidora contra cepas patógenas localizadas en la biopelícula y asociadas directamente al desarrollo de la enfermedad periodontal (*F. nucleatum, P. intermedia y P. gingivalis*), la concentración bactericida fue de 7.2 mg/mL a 28.8 mg/mL y de 14.4 a 57.6 mg/mL, (tabla 7). El concentrado etanólico de la flor de *Hibiscus sabdariffa* L., tuvo un efecto inhibidor sobre la formación de biopelículas en los niveles de concentración mínima (7.2 mg/mL a 28.8 mg/mL), contra bacterias gram negativas que contra bacterias gram

positivas, la justificación que encuentran es que esto puede deberse a las diferencias en la estructura de la pared celular bacteriana. (66)

La capa de peptidoglicano en la pared de bacterias gram positivas es más gruesa en comparación con las gram negativas, y la efectividad del extracto etanólico de la flor de *Hibiscus sabdariffa* L., se encuentra directamente asociado a la capacidad de los flavonoides para unirse a las paredes de las células bacterianas. Además, los grupos hidroxilo presentes en el anillo fenólico aumentan el efecto de hidroxilación y por ello la actividad antimicrobiana se eleva. (66)

Tabla 7. Recopilado de actividad bactericida del extracto etanólico de la flor de la jamaica *Hibiscus Sabdariffa* L. en dos cepas bacterianas asociadas a enfermedad periodontal. (65)

Cepa bacteriana asociada a la Enfermedad Periodontal	Concentración mínima inhibitoria de extracto
Porphyromonas gingivalis	(14.4-57.6 mg/mL)
Prevotella intermedia	(28 mg/mL)

2.1.7 Actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de la flor de *Hibiscus sabdariffa* L., en cepas de *Porphyromonas gingivalis y Streptococcus sanguis* comparadas con ampicilina

Otra de las cepas patógenas responsables del desarrollo de la enfermedad periodontal son *Porphyromonas gingivalis y Streptococcus sanguis* las cuales en modelos *in vitro* se ha probado la efectividad antimicrobiana del extracto etanólico de la flor de la jamaica *Hibiscus sabdariffa* L., en cultivos microbiológicos; para esta investigación utilizaron las concentraciones de 2.5%, 5%, 7.5% y el 10%, como resultado las concentraciones 7.5% y el 10% mostraron mejor capacidad bactericida en ambas cepas (*P. gingivalis* y *S. sanguis),* y las zonas de inhibición fueron significativas en ambas bacterias. (67)

Tabla 8. Actividad bactericida de *Streptococcus sanguis* y *Porphyromonas gingivalis* cepas bacterianas asociadas a enfermedad periodontal por el extracto etanólico de la flor de la jamaica *Hibiscus Sabdariffa* L. (67)

Cepa bacteriana asociada a la Enfermedad Periodontal	Control negativo ampicilina	Concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de la flor de la jamaica
Streptococcus sanguis	3%	(7.5 y 10 %)
Porphyromonas gingivalis	3%	(7.5 y 10 %)

2.2 Planteamiento del problema

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica de las encías, ocasionada por el desequilibrio del microbioma patógeno oral y el huésped. La evolución de esta enfermedad se caracteriza por la pérdida de los tejidos de soporte del periodonto que incluye el ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar. (68)

La enfermedad periodontal es prevalente en países subdesarrollados y está directamente relacionada a situaciones socioeconómicas, a la raza, la educación y la vida; afectando al 50 % de la población global, algunas organizaciones consideran a la enfermedad periodontal como un problema de salud pública a nivel mundial. (69) La prevalencia de la enfermedad periodontal en México es del 70-90% de la población los cuales presentan algún estadio de enfermedad periodontal en personas de 40 a 80 años (15), ocasionando pérdida de dientes, discapacidad y disfunción masticatoria y un estado de nutrición deficiente. (70)

La terapia periodontal incluye el manejo quirúrgico y no quirúrgico del proceso de la enfermedad, actualmente se utilizan compuestos antimicrobianos como clorhexidina, yodo povidona e hipoclorito de sodio en el tratamiento de enfermedades periodontales no quirúrgicas. Debido a su etiología multifactorial y al complejo proceso de la enfermedad, el tratamiento de la periodontitis sigue siendo un objetivo importante para el área odontológica. Por lo tanto, se ha buscado implementar la terapia alternativa para el manejo y control de la periodontitis, buscando compuestos naturales que tengan efectos antimicrobianos, antioxidantes, antisépticos, y antiinflamatorios. (71) Diversos estudios han evidenciado una amplia gama de aplicaciones de salud tradicional. Recientemente se ha evidenciado la actividad antimicrobiana sobre bacterias gram positivas y negativas de los extractos etanólico y metanólico de la flor de la jamaica, *Hibiscus sabdariffa* L. Interesantemente, la actividad antimicrobiana también se ha presentado con cepas que forman parte del microbioma oral. (58-67) Con estos antecedentes, la propuesta del presente trabajo es conocer el efecto antiinflamatorio del ácido hibiscus para proponerlo como una alternativa natural al tratamiento de la gingivitis.

III. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad periodontal es una afección propia de la encía y se caracteriza por la destrucción irreversible de los tejidos de soporte del diente incluidos ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar. Caracterizada por ser una afección inflamatoria y crónica que afecta a la población entre los 40 y 80 años de edad, genera signos clínicos que por lo general no son identificados a tiempo; por lo que cuando el paciente es diagnosticado generalmente ya se presenta un estadío tardío de la enfermedad, generando así otras complicaciones como el edentulismo, la pérdida de la función masticatoria y deficiencias nutricionales; la periodontitis está catalogada como un problema de salud pública difícil de erradicar, el campo de la terapéutica muestra un área de oportunidad muy amplia para proponer nuevas y mejores alternativas de tratamiento.

Dentro de los protocolos terapéuticos no quirúrgicos, se utilizan algunas soluciones químicas con efectos antiinflamatorios y bactericidas con el objetivo de generar un equilibrio en el microbioma patógeno del paciente para contrarrestar el efecto destructivo de los tejidos de soporte, sin embargo en las últimas investigaciones se ha demostrado que tienen un efecto citotóxico, por lo que se han utilizado extractos naturales como alternativas de tratamiento para el manejo y el control de la periodontitis crónica. Se sabe que los compuestos bioactivos de la flor de jamaica *Hibiscus Sabdariffa* L., han demostrado poseer actividad antiinflamatoria y antimicrobiana.

Uno de los compuestos orgánicos bioactivos de la flor de la jamaica al que se le atribuyen dichas propiedades antimicrobianas es el ácido hibiscus, por tal motivo y con el objetivo de encontrar alternativas de origen natural para el tratamiento de la periodontitis, en este trabajo se llevará a cabo la evaluación de la capacidad antiinflamatoria de dicho compuesto en un modelo de periodontitis inducida en ratas; de esta manera podríamos lograr proponer un tratamiento alternativo no quirúrgico para contrarrestar los efectos destructivos de la enfermedad periodontal.

IV. HIPÓTESIS

El ácido hibiscus tendrá actividad antiinflamatoria en la enfermedad periodontal inducida en un modelo en ratas Wistar.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto antiinflamatorio del ácido hibiscus en un modelo de periodontitis inducida en ratas Wistar.

5.2 Objetivos específicos

1. Implementar el modelo de periodontitis inducida en ratas Wistar mediante la combinación de la ligadura y la inoculación de lipopolisacárido de *Phorphyromona gingivalis*.
2. Evaluar el efecto antiinflamatorio del ácido hibiscus mediante la evaluación clínica de las encías de las ratas.
3. Evaluar el efecto antiinflamatorio del ácido hibiscus a través en la reinserción del epitelio de unión en la periodontitis inducida a través del análisis histológico de las encías de las ratas.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Tipo de estudio

Estudio de investigación experimental.

6.2 Diseño del estudio

Se utilizaron 91 ratas Wistar macho de 6-8 semanas de edad adquiridas en el Bioterio del Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Los animales se mantuvieron en cuartos con una temperatura del 22+/-2 °C, con una humedad relativa de 50%, con ciclos de luz oscuridad de 12h, con libre acceso a agua y alimento.

Dicho proyecto fue aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL), con número de aprobación CICUAL7/002/2020.

El tamaño de muestra fue calculado en base a incidencias seriadas en los procedimientos de acuerdo a la siguiente fórmula X=N/(A/100) x (B/100) Donde: X=Número de animales final; N=Número mínimo estadística; A=100-% incidencia 1; A=100-% incidencia 1 (72).

X=7/((80/100) x (80/100))= 12.5
X=13 ratas x 7 = 91

Los animales recibieron un trato humanitario, de acuerdo a los lineamientos establecidos por la NOM-062-ZOO-1999 para las especificaciones técnicas para el cuidado y uso de animales de laboratorio.

Se formaron 5 grupos de 6 animales en cada grupo tomados al azar:

- Grupo I (Control): Animales sin tratamiento.
- Grupo II (Periodontitis): Colocación de ligadura en la zona interproximal de los incisivos superiores + inoculación de LPS de *Phorpyromona gingivalis*, (5µg/Kg) durante 15 días.
- Grupo III (Clorhexidina): Inducción de la periodontitis + tratamiento con clorhexidina al 2%.
- Grupo IV (hibiscus 2%): Inducción de la periodontitis + tratamiento con ácido hibiscus al 2%.
- Grupo V (hibiscus 4%): Inducción de periodontitis + tratamiento con ácido hibiscus al 4%.

6.2.1 Registro del peso de los animales

Se realizó el registro diario del peso de los animales durante el periodo experimental, con el fin de evaluar si se presentaba alguna deficiencia nutricional causada por la inducción de la periodontitis que impidiera su crecimiento y desarrollo.

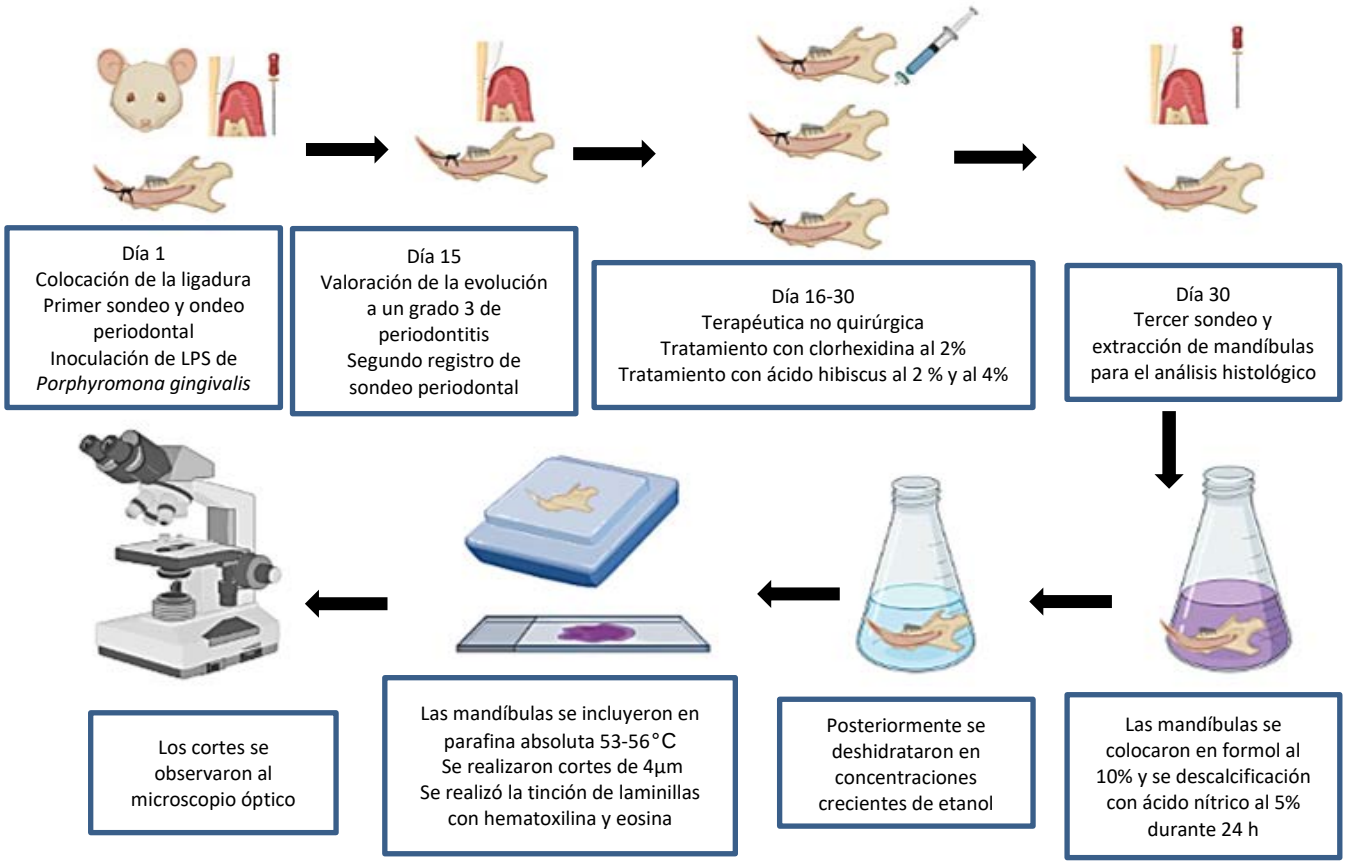

Fig. 7 Diagrama del modelo experimental

6.3 Modelo de inducción de la enfermedad periodontal en ratas Wistar y sondeo periodontal

Para llevar a cabo la inducción de la enfermedad periodontal se realizó la sedación de las ratas con (Avertin 250 mg/kg) intraperitoneal y se colocó la ligadura de seda de 6 mm en la zona interproximal de los incisivos inferiores y se realizó la inoculación LPS de *Phorphyromona gingivalis*, diariamente durante 15 días con la ayuda de una jeringa Hamilton y con una aguja de calibre 33 mm en la zona lingual y la porción mesial, intermedia y distal de los incisivos. Se evaluó el proceso de evolución de la enfermedad periodontal diariamente durante 15 días, evidenciando un cuadro de periodontitis grado 3 en todos los animales en done se observa un proceso inflamatorio y la aparición de la bolsa

periodontal de aproximadamente de 3 mm de profundidad. A partir del día 16 al 30 se realizó el tratamiento correspondiente con clorhexidina al 2%, de ácido hibiscus al 2% y al 4%. Al finalizar el periodo de tratamiento se realizó la evaluación clínica de las encías, posteriormente se sacrificaron los animales en una cámara de CO_2 y se obtuvieron las mandíbulas de las ratas para realizar el análisis histológico. El sondeo periodontal es un método diagnóstico con el cual se puede evaluar el estado de los tejidos periodontales, se realiza la valoración métrica de la profundidad de la bolsa periodontal que se genera a consecuencia del proceso inflamatorio, este procedimiento se realiza midiendo la distancia que existe entre el margen gingival y el surco utilizando la zona periodontal Carolina del Norte (Hu-Friedy, Alemania).

En el presente trabajo se realizó el sondeo periodontal en las ratas, a los días 0, 15 y 30 del tratamiento y se registraron las mediciones con el objetivo de evaluar la evolución de la inducción de la periodontitis.

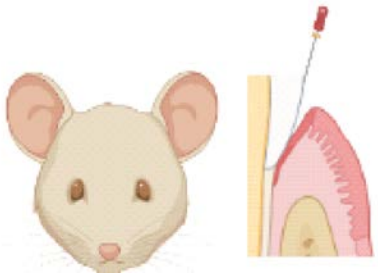

Fig. 8 Sondeo periodontal

6.3.1 Criterios de la evaluación clínica de la enfermedad periodontal

La evaluación clínica del desarrollo de la enfermedad periodontal se llevó a cabo tomando en cuenta los siguientes criterios:

Grado 0. Encía normal (0 mm de profundidad del surco) ausencia de inflamación.

Grado 1. Inflamación leve (1 mm de profundidad del surco) edema leve, cambio leve de color y ausencia de sangrado al sondaje.

Grado 2. Inflamación moderada (2 mm de profundidad del surco) edema, glaseado, enrojecimiento y sangrado al sondaje.

Grado 3. Inflamación severa (3 mm de profundidad del surco) enrojecimiento extremo, presencia de úlceras, edema y sangrado.

6.3.2 Aplicación del ácido hibiscus

Para llevar a cabo la aplicación del ácido hibiscus en las ratas se utilizó una presentación en gel, para preparar el gel se disolvieron 2 g ó 4 g de ácido hibiscus en 100 mL de agua bidestilada, posteriormente, se agregaron 0.5 g de goma xantana (Fig 9); y se mezcló a temperatura ambiente hasta tener una consistencia homogénea. Se aplicaron 30 mg del gel de ácido hibiscus al 2% y al 4%, diariamente en las encías de cada una de las ratas de los respectivos grupos de manera tópica durante 15 días con ayuda de un microbrush, posterior a esto los animales se mantuvieron durante 30 min sin agua ni alimento para que el gel de ácido hibiscus al 2% y al 4% permaneciera durante este tiempo sobre la encía, los animales no fueron sedados para realizar este procedimiento.

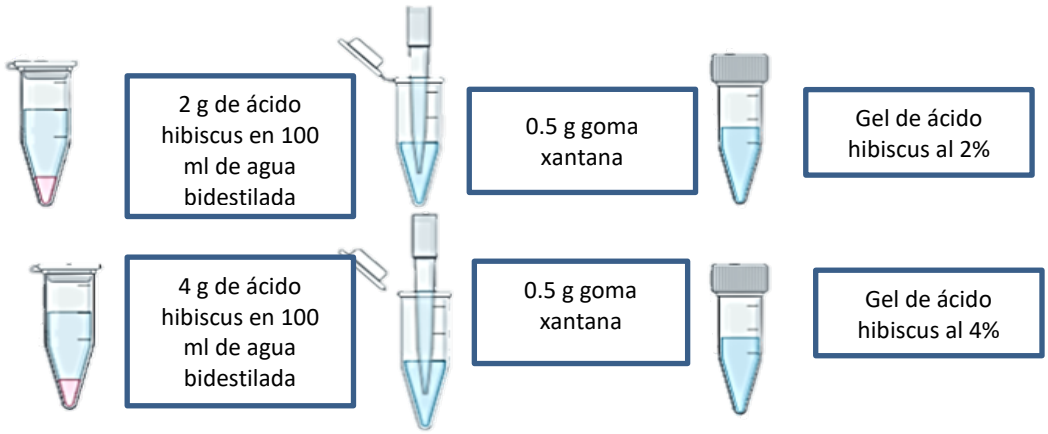

Fig. 9 Preparación de gel de ácido hibiscus

6.4 Obtención y manejo de las muestras para el análisis histológico

Después del sacrificio de los animales, se extrajo la mandíbula y se realizó un corte sagital en la zona interproximal de los incisivos centrales inferiores, el tejido se lavó varias veces con solución salina y se colocó en formol buffer de fosfatos pH 7.4 al 10% durante 24 horas, posteriormente se sumergió en solución descalcificante (ácido nítrico al 5%) durante 24 horas, hasta poder introducir una aguja a través del diente. El tejido descalcificado se lavó con agua corriente y se colocó en bicarbonato de sodio al 10% durante 24 horas. Al finalizar este periodo de tiempo se colocó nuevamente en formol al 10%.

Los tejidos fijados se deshidrataron pasándose a través de concentraciones crecientes de alcohol hasta llegar al alcohol absoluto (80°, 90°, 96° y alcohol absoluto) durante 1 hora en cada concentración de alcohol, posteriormente se clarificaron con xilol al 50% y xilol absoluto durante 1 hora en cada uno y finalmente las muestras se incluyeron en parafina absoluta a 53-56°C durante 1 hora. Posteriormente se colocaron en parafina absoluta dos veces con una diferencia de inmersión de 1 hora y se colocaron en moldes para formar bloques los cuales se dejaron secar por 48 h para que se solidificaran por completo, se realizaron cortes de 4 µm de espesor, en un micrótomo, los cortes se pasaron por baño María a 40°C (al baño María fue agregada grenetina en cantidad suficiente para facilitar la manipulación del corte), se colocaron en un portaobjetos y se secaron sobre una parrilla a 40°C.

Las laminillas fueron teñidas con hematoxilina y eosina, el método de tinción utiliza el colorante de hematoxilina que tiñe estructuras ácidas como ribosomas y cromatina, en tonos azules y púrpuras, y el uso de eosina que tiñe estructuras básicas como organelos citoplásmicos, colágeno, tejido conjuntivo, fibras elásticas y fibras musculares en tonos de color rosa. Para el montaje se colocó resina natural y encima un portaobjetos para su preservación y su posterior lectura al microscopio óptico. Se realizó una evaluación histológica de la encía en cada grupo mediante el uso de un microscopio óptico Olympus CX22LED (Tokio, Japón).

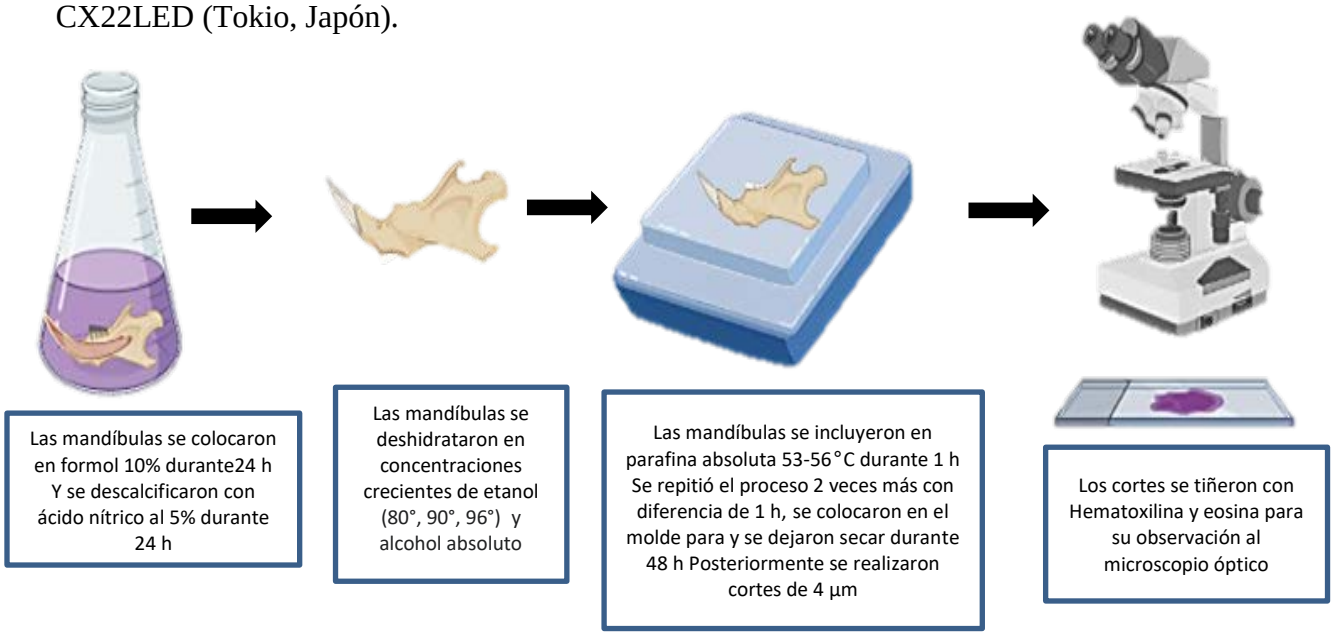

Fig. 10 Procesamiento de la muestra para análisis histológico

6.5 Análisis estadístico

Para comparar las diferencias entre las variables de profundidad del surco y peso de los grupos de experimentación se realizó un análisis estadístico de varianza (por sus siglas en inglés ANOVA) de dos vías. Posteriormente se realizó un post-test de Bonferroni utilizando el software PRISMA GraphPath versión 6.

VII. RESULTADOS

7.1 Peso

Durante la realización de este estudio se registró el peso de los animales diariamente, con el objetivo de observar el efecto del ácido hibiscus sobre el desarrollo y crecimiento de los animales. En la Figura 11 se muestra el registro de los pesos de los animales de los diferentes grupos experimentales, los cuales no mostraron diferencias significativas a los 7, 15, 21 y 30 días (p>0.05) que duró el tratamiento.

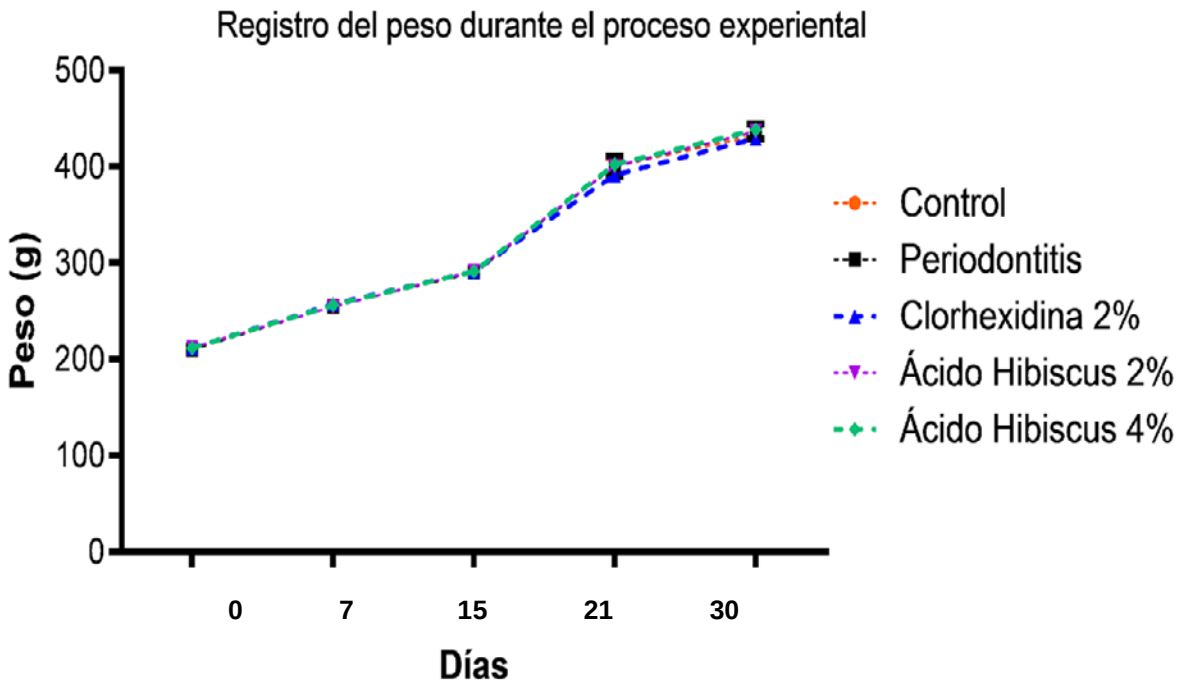

Fig. 11. Análisis del peso durante la fase experimental. Representación gráfica de las medias ± la desviación estándar. Los grupos experimentales fueron suministrados con la misma cantidad de alimento durante la fase experimental, gráficamente podemos observar que no existen diferencias estadísticamente significativas (p >0.05) entre los diferentes grupos.

7.2 Evaluación de la periodontitis

7.2.1 Sondeo periodontal

Para un correcto diagnóstico periodontal es necesario realizar una inspección clínica de la encía, uno de los registros clínicos más importante es el sondeo periodontal.

El surco periodontal se define como el espacio alrededor de los dientes entre la encía marginal y la superficie del diente, el sondeo se realiza a través de un instrumento llamado sonda periodontal la cual se introduce justo en el espacio del surco por la zona mesial, media y distal de la zona vestibular y lingual, cuando hay presencia de bolsa periodontal la sonda sirve para determinar la profundidad patológica del surco Figura 12.

Fig. 12 Registro de sondeo periodontal. Se muestra el registro del sondeo periodontal al día 30 del tratamiento. Panel A control negativo, panel B periodontitis grado 2, (*Referencia métrica de sondeo 5mm).

7.2.2 Evaluación de la periodontitis mediante el sondeo periodontal

Después de realizar el sondeo periodontal de los animales de los diferentes grupos experimentales, al día 15 de tratamiento, esto es, un día antes del inicio del tratamiento con clorhexidina y ácido hibiscus, se observó un aumento estadísticamente significativo ($p<0.001$) en la profundidad de la bolsa periodontal en los grupos de periodontitis, clorhexidina al 2%, ácido hibiscus al 2% y al 4% con respecto al grupo control (Figura 13); lo cual indica la

presencia de un proceso inflamatorio y la inducción de la periodontitis. Los resultados de la medición al día 30 (después de 2 semanas de tratamiento con clorhexidina y ácido hibiscus), mostraron que ocurrió una disminución en la profundidad del surco en los animales tratados con clorhexidina al 2%, ácido hibiscus al 2% y ácido hibiscus al 4% con respecto a los animales del grupo con periodontitis estadísticamente significativa ($p<0.05$) (Figura 13).

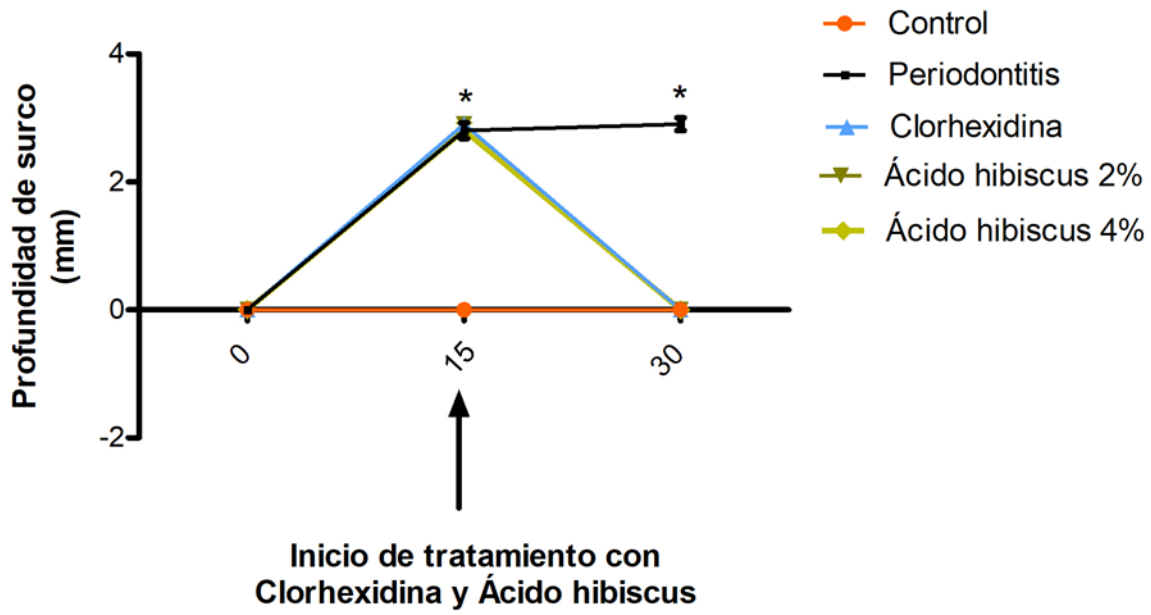

Fig. 13 Evaluación del sondeo periodontal durante la fase inicial, intermedia y post tratamiento. Se llevó a cabo el sondeo periodontal en los animales de los diferentes grupos a los días 0, 21 y 30 del tratamiento. Se muestra la media ± la desviación estándar.

7.2.3 Evaluación clínica

Se realizó la valoración clínica de la periodontitis la cual se muestra en la figura 14. En el panel A se muestra la encía de un animal del grupo control negativo, se pueden apreciar las características clínicas de un estado de salud periodontal adecuado en donde la coloración de la encía es rosa coral y no hay presencia de recesión gingival, la papila interdental no se encuentra inflamada y se aprecia perfectamente adherida al tercio cervical de los dientes, por lo tanto, no hay presencia de bolsa periodontal. En el panel B se muestra un animal con gingivitis, se puede apreciar el cambio de coloración de la encía con respecto al control negativo, debido al cambio vascular generado por el proceso inflamatorio, la papila interdental se encuentra inflamada por

lo que no se encuentra adecuadamente adherida, hay presencia de bolsa periodontal y secreción de líquido cervicular. El panel C corresponde a un animal del grupo tratado con clorhexidina durante 15 días, se observa una reducción notable del proceso inflamatorio, se aprecia la encía de color rosa coral la papila interdental se encuentra adherida en el tercio cervical de los dientes y no hay presencia de bolsa periodontal. En el panel D se muestra un animal tratado con ácido hibiscus al 2%, no se observan evidencias de un proceso inflamatorio, la encía se aprecia de color rosa coral, la papila interdental se encuentra insertada, no hay presencia de bolsa periodontal. En el panel E se observa un animal tratado con ácido hibiscus al 4%, no hay indicios de proceso inflamatorio, la encía presenta un color rosa coral, la papila interdental está adherida al tercio cervical del incisivo inferior, sin presencia de bolsa periodontal.

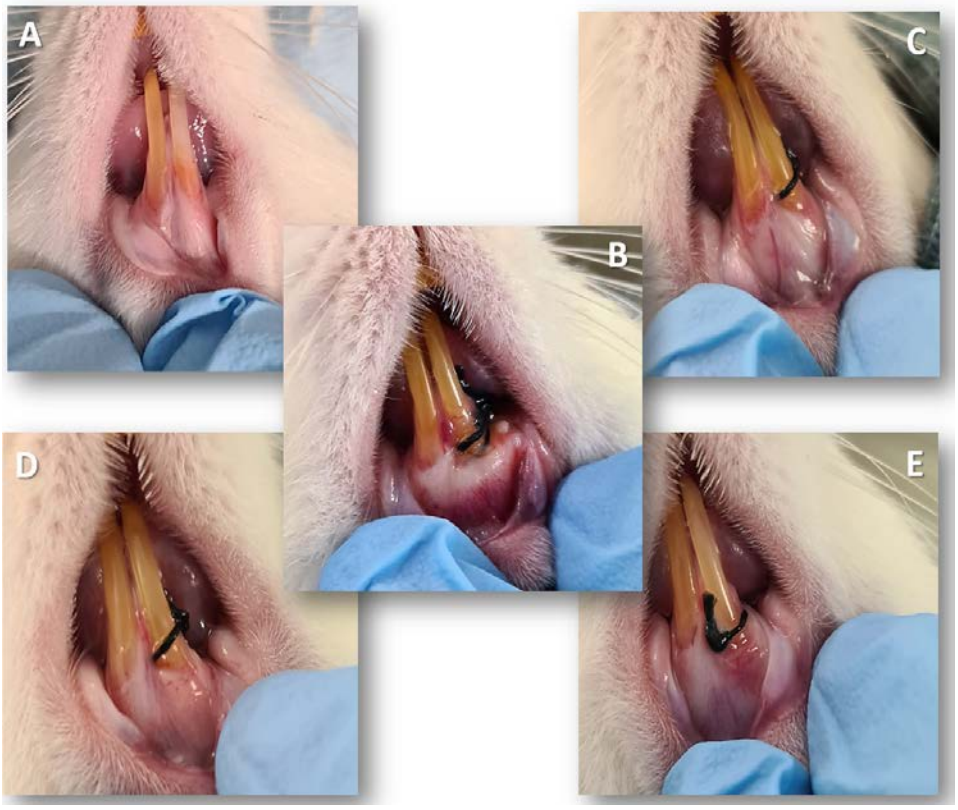

Fig. 14 Valoración clínica de la periodontitis durante la fase experimental. Se muestran fotografías de los diferentes cambios clínicos de las encías en los animales de los diferentes grupos al finalizar la fase experimental (30 días). A Control negativo. B periodontitis. C clorhexidina al 2%. D ácido hibiscus al 2%. E ácido hibiscus al 4%.

7.3 Análisis histológico

En este trabajo se realizó el análisis histológico del tejido periodontal lo cual nos permitió observar de manera clara los cambios morfológicos generados por la inducción de la periodontitis de la encía de los animales después del tratamiento con clorhexidina y ácido hibiscus, Figura 15.

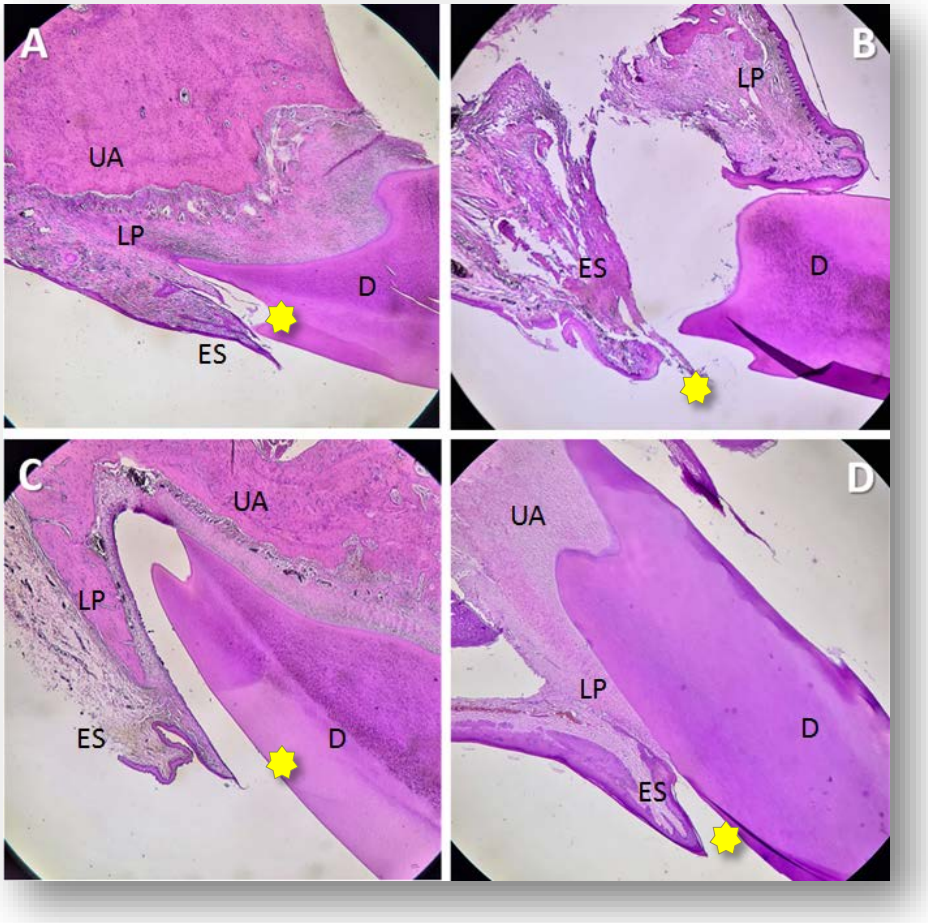

Fig. 15 Evaluación histológica de las encías de las ratas. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina y eosina y se observaron al microscopio óptico. A Control, B Periodontitis, C. Clorhexidina, D. ácido hibiscus al 2%. Donde las letras indican, D (diente), ES (epitelio del surco), LP (ligamento periodontal), UA unión amelo cementaría, ✸unión dentogingival. 40X

En el grupo control se puede observar una buena arquitectura periodontal, ya que la superficie de la unión dentogingival se encuentra perfectamente insertada; el epitelio de unión une la encía con el diente a través de una membrana basal y se extiende hacia la región de unión

amelo cementaría, es decir, el fondo del surco gingival; el epitelio del surco se continúa en el borde gingival con el epitelio bucal y con el epitelio de unión hasta la zona apical, se aprecia la diferenciación entre los mismos. El ligamento periodontal lo observamos con las características de un tejido conectivo denso, tiene un grosor constante en la periferia del diente, condiciones que se presenta en un periodonto sano.

El grupo con periodontitis presenta características, morfológicas diferentes a un periodonto sano, la unión dentogingival no se encuentra insertada, el epitelio de unión tiene una forma irregular y su límite con la unión amelo-cementaria no se encuentra definido a causa de la bolsa periodontal, el ligamento periodontal se observa ensanchado en la periferia total del diente como consecuencia del proceso inflamatorio.

En el grupo tratado con clorhexidina presenta características similares al grupo control, se aprecian mejor definidas las estructuras morfológicas del periodonto, la unión dentogingival se encuentra insertada en la zona cervical, el ligamento periodontal no muestra ensanchamiento en la periferia del diente, la continuidad el epitelio de unión y la unión amelo cementaría evidencian que la formación de la bolsa periodontal se redujo considerablemente, no hay vestigios de actividad celular inflamatoria, al igual que en el grupo control se observa un periodonto sano.

En los grupos tratados con ácido hibiscus al 2% y al 4%, las características estructurales del periodonto son muy similares a las observadas en el grupo tratado con clorhexidina y el grupo control, la unión dentogingival esta insertada, el epitelio de unión se extiende hasta la línea amelo cementaría, es decir hasta el fondo del surco el cual se ha reducido notablemente por lo que no hay presencia de bolsa periodontal. El ligamento periodontal se encuentra de manera definida alrededor del diente, por lo que se puede afirmar que el tratamiento generó un cambio positivo en los daños causados en la encía por la periodontitis inducida, lo cual nos da la pauta para poder considerar el ácido hibiscus como una alternativa terapéutica no quirúrgica para revertir los efectos dañinos de la periodontitis.

VIII. DISCUSIÓN

De acuerdo a la OMS, la enfermedad periodontal es una de las 5 afecciones bucodentales más comunes a nivel mundial (5), por lo tanto es importante realizar investigación en modelos experimentales para proponer alternativas terapéuticas para este padecimiento. En este estudio se utilizó un modelo de inducción de periodontitis en ratas Wistar, los animales de experimentación no mostraron diferencia en el peso corporal a lo largo de todo el tratamiento durante, ni después de la inducción de la periodontitis, o durante el tratamiento con ácido hibiscus. Lo cual indica que el ácido hibiscus no tuvo ningún efecto adverso sobre el crecimiento y desarrollo de los animales.

8.1 Inducción de la periodontitis con ligadura y LPS

En este trabajo, se reprodujo la inducción de un modelo de periodontitis experimental, en donde la combinación de la colocación de una ligadura interdental en los dientes incisivos inferiores en combinación con la administración LPS de *Phorphyromona gingivalis* (5 µg/kg) durante 15 días generó periodontitis en todos los animales de experimentación. Diversos modelos experimentales de inducción de la periodontitis en cepas de ratones BalbC, CD1 y ratas Wistar, han realizado diferentes combinaciones entre la dieta, la colocación de la ligadura interdental en la zona de los molares o de los incisivos inferiores, e inoculación de LPS de algunas bacterias como *Phorphyromona gingivalis, Fusobacterium nucleatum*, o de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*, mismos que se encuentran presentes como parte del microbioma patógeno en la periodontitis; con la ventaja de que la combinación de estos elementos resulte en un proceso de inducción más efectivo. (57-66)

El desarrollo de la periodontitis se caracteriza por que se produce un desequilibro en el microbioma intraoral, el número de bacterias aumenta paulatinamente y da paso al crecimiento descontrolado de cepas patógenas como *Porphyromona gingivalis, Fusobacteriun nucleatum, Actinomycetemcomitans*, lo cual desencadena un proceso inflamatorio crónico en los tejidos de soporte de la encía. (59) Por lo tanto, para la inducción de periodontitis experimental tienen mayor éxito combinando la colocación de la sonda y la inoculación de LPS. Los modelos

experimentales de inducción de periodontitis han sido utilizados para evaluar el comportamiento del evento inflamatorio, así como para identificar los biomarcadores presentes y comparar la interacción con diferentes fármacos para buscar alternativas de tratamiento no quirúrgico para el manejo y control de la enfermedad periodontal. (59-61) En el presente estudio, la evaluación de la inducción de la periodontitis se realizó mediante la medición del sondeo periodontal, que es un método de diagnóstico para la enfermedad periodontal dependiendo de la profundidad de la bolsa formada a consecuencia de la inflamación. (8) El tratamiento local con ácido hibiscus en gel durante 15 días disminuyó significativamente la profundidad del surco en comparación con el grupo con periodontitis. Además, el tratamiento con ácido hibiscus tuvo resultados similares a los observados con el tratamiento con la clorhexidina al 2%, un antiséptico de elección para el control de la enfermedad periodontal.

8.2 Actividad antimicrobiana del ácido hibiscus

Se ha demostrado que los extractos de la flor de la jamaica tienen efectos antioxidantes, antihipertensivos, antiinflamatorios y antibacterianos, estos efectos terapéuticos son atribuidos a sus principales componentes bioactivos como las antocianinas, los ácidos fenólicos y los flavonoides, sin embargo, algunos de estos efectos también se han atribuido a otros componentes de la flor de la jamaica como los ácidos orgánicos, ácido cítrico y ácido hibiscus. (56)

Actualmente, se ha demostrado la capacidad antibacteriana del ácido hibiscus demostrando que es igual de efectivo que diversos antibióticos en cepas responsables de enfermedades gastrointestinales, enfermedades nosocomiales y bucodentales, estas últimas asociadas a caries, y enfermedades inflamatorias de la encía. (57) Portillo-Torres y colaboradores demostraron que el ácido hibiscus tiene un efecto antimicrobiano sobre cepas de *Salmonella* resistentes a la amoxicilina o la penicilina sobre cepas patógenas de *E. coli*, los autores determinaron que el ácido hibiscus posee una actividad bactericida que altera la permeabilidad de la membrana externa de las bacterias. (66) La ausencia de la membrana celular externa de las bacterias genera automáticamente su destrucción debido a que el aumento del gradiente de osmolaridad que suele existir entre el medio y el citoplasma bacteriano destruye por completo su estructura. (73) En este trabajo se observó que el tratamiento tópico con un gel de ácido hibiscus redujo notablemente la periodontitis inducida en las ratas ya que después de realizar la evaluación

clínica del tejido periodontal, esto es, la coloración, la textura y la arquitectura de la encía y de la papila interdental se observaron signos de buena salud periodontal. Este efecto del ácido hibiscus sobre la disminución de la enfermedad periodontal puede deberse a sus propiedades antimicrobianas; debido a que la disminución del número de bacterias dentro de la cavidad oral reduce la proliferación de cepas patógenas, lo que favorece la recuperación del tejido periodontal. En este contexto, el medicamento más utilizado para el tratamiento de la periodontitis, conocido como clorhexidina, tiene un efecto antimicrobiano y actividad bactericida; se ha demostrado que a bajas concentraciones (0.05% a 0.2%) la clorhexidina se une a la membrana celular bacteriana y genera poros, lo cual altera de manera importante el transporte celular, mientras que a altas concentraciones (2%) es capaz de penetrar al citoplasma de la bacteria y ocasionar su lisis, de esta manera la clorhexidina inhibe la formación de la placa y reduce la periodontitis (64). En este mismo contexto se ha demostrado que los extractos de la flor de la jamaica (*Hibiscus Sabdariffa* L.) poseen mayores efectos antimicrobianos que los enjuagues bucales comerciales (60), por lo que podrían ser una alternativa de origen natural para el control de bacterias patógenas de la cavidad oral.

8.3 Actividad antiinflamatoria del ácido hibiscus

La periodontitis es un proceso inflamatorio que inicia cuando las bacterias patógenas dañan los tejidos adyacentes al diente al unirse a las células del epitelio del surco y del epitelio de unión, debido a lo cual, se activa el sistema inmunológico del organismo en donde se producen defensinas y citocinas proinflamatorias como IL-1 y TNF-α y linfocitos T y polimorfo nucleares, en un inicio la respuesta inmune es de tipo innata, cuando se presenta una lesión periodontal avanzada intervienen los macrófagos, linfocitos T CD4 e inmunoglobulinas, esta respuesta inmune activa frente a la placa bacteriana genera daño en el tejido conectivo subyacente al epitelio de unión y progresa hacia la zona apical hasta la inserción del tejido conectivo, generando bolsas periodontales y recesiones gingivales. (44-46)

En el presente trabajo, se observó que el tratamiento con un gel de ácido hibiscus durante 15 días disminuyó el proceso inflamatorio de la bolsa periodontal en la encía de las ratas, el cual se ha asociado al aumento descontrolado del microbioma patógeno en la cavidad oral. La

evaluación de la reducción de la bolsa periodontal se realizó a través del registro del sondeo periodontal. La disminución del proceso inflamatorio ocasionada por el tratamiento con el ácido hibiscus, puede deberse a su actividad antimicrobiana ya que, al disminuir el número de cepas patógenas localizadas en la porción interna de la bolsa periodontal, se genera una simbiosis entre las condiciones internas del huésped y la biopelícula por lo que se presenta un estado tolerancia inmunológica favoreciendo la regeneración tisular permitiendo regresar a un estado de salud periodontal óptimo. Igualmente, se ha asociado el aumento en el número de bacterias con cuadros de periodontitis crónica en pacientes ya que son microorganismos estrechamente asociados con la etiopatogenia de la enfermedad. (60)

Adicionalmente, en este trabajo, se estudió el efecto antiinflamatorio del ácido hibiscus en la periodontitis inducida a través de la observación de cortes histológicos de las encías de las ratas. El análisis microscópico de los cortes mostraron que en el tejido de los animales con periodontitis existe un daño evidente en la zona de inserción del epitelio del surco de los incisivos inferiores, hay presencia de leucocitos polimorfo nucleares y una migración de infiltrado celular inflamatorio hacia el tejido conectivo , mientras que en el grupo tratado con un gel de ácido hibiscus y en el grupo tratado con clorhexidina las condiciones del epitelio fueron similares a las del grupo control negativo, esto es, se puede apreciar que la inserción del epitelio del surco se encuentra perfectamente adherida a la zona cervical de diente sin signos aparentes de inflamación.

Estos resultados demuestran que el ácido hibiscus posee un potente efecto antiinflamatorio cuando se utiliza de manera tópica en las encías de los animales a los cuales se les ha inducido la periodontitis, el mecanismo mediante el cual lleva a cabo esta acción antinflamatoria se desconoce aún, sin embargo, sugerimos que puede deberse en gran parte a sus propiedades antimicrobianas, ya que se ha observado que la clorhexidina, que es el medicamento más potente contra la periodontitis actúa generando daño sobre la membrana bacteriana ocasionando finalmente la muerte celular.

X. CONCLUSIONES

1. La colocación de la ligadura en combinación con la inoculación de LPS (*Porphyromona gingivalis*) generó una periodontitis en las ratas.
2. La periodontitis inducida no ocasionó diferencias estadísticamente significativas en el peso de los animales durante la fase experimental.
3. El tratamiento de ácido hibiscus en gel al 2% y al 4%, no ocasionó ningún efecto clínico adverso en la encía de los animales.
4. El tratamiento con ácido hibiscus en gel al 2% y al 4% disminuyó significativamente el proceso inflamatorio de la encía y mejoró las características clínicas periodontales en comparación con el grupo de periodontitis.
5. El tratamiento con ácido hibiscus al 2% y al 4% mostró resultados similares a los observados con el tratamiento de clorhexidina al 2% en la valoración de las características clínicas de la periodontitis.

XI. RECOMENDACIONES

- Realizar la detección inmunohistoquímica de moléculas proinflamatorias en las encías de los animales de experimentación.
- Evaluar la expresión de las citocinas proinflamatorias IL-1 y TNF-α en las encías de los animales con periodontitis inducida.
- Prolongar el tiempo de inducción de la periodontitis para observar el efecto destructivo sobre el hueso alveolar.

XII. REFERENCIAS

1. Azcona Barbed Leire. Gingivitis. Farmacia Salud 2010; 2(2):66-68

2. Navarro Nápoles, Josefa. Enfermedad periodontal en adolescentes. Rev Med Electrón. 2017; 39(1):15-23.

3. Solís-Suárez Diana Laura, Pérez-Martíne Issac Obed, García-Hernández Ana Lilia. Mecanismos inflamatorios en la destrucción periodontal. Revista Odontológica Mexicana. 2019; 3(3):159-72.

4. Duque Andrés. Prevalencia de periodontitis crónica en Iberoamérica.Chronic periodontitis in Latin America. 2016; 9(2):208-15.

5. Erik Petersen Poul. The Global Burden of Oral Diseases and Risks to Oral Health. World Health Organization 2004, 83(9):661-669.

6. Erik Petersen Poul. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century--the approach of the WHO Global Oral Health Programme. Community dentistry and oral epidemiology 2003; 1(1):3-23.

7. Taboada-Aranza Olga, Cerón Argüelles Jesús, Rodríguez Hernández Adrián. Frecuencia y distribución de enfermedades periodontales asociadas a placa bacteriana en pacientes que acuden a una clínica universitaria. Revista ADM. 2018; 147-52.

8. Castro-Rodríguez Yuri. Enfermedad periodontal en niños y adolescentes. A propósito de un caso clínico. Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral. 2018; 11(1):36-8.

9. Villalón Fernández Paula Celerina, Hernández Fernández Gisselle Leylí, Simon Rodriguez Josefa y Abad Villalon Sucel. Autocuidado de las encías y salud periodontal. Revista Información Científica. 2018; 97(4):868-79.

10. Rosales Corria, Erma Nairelis et al. Prevención de enfermedades periodontales. Métodos mecánicos de control de placa dentobacteriana. Multimed. 2019; 23(2):386-400.

11. Hernández Pacheco Athina Edurner, Guevara Cabrera Sandra Daniela, Henckell Sime Clara Luisa del Carmen. Antisépticos orales: clorhexidina, flúor y triclosán. Revista Salud & Vida Sipanense.2019; 6(2):4-14.

12. Armenta Salazar MG, Serrano Díaz P, García Contreras R, Díaz Acevedo A, Acosta Torre LS. Efecto antimicrobiano de la clorhexidina en odontología. Revista Odontológica Latinoamericana. 2016; 8(2):31-4.

13. Duarte-Valenzuela Zayda N., Zamora-Gasga Víctor M., Montalvo-González Efigenia y Sáyago-Ayerdi Sonia G. Caracterización nutricional de 20 variedades mejoradas de jamaica (*Hibiscus Sabdariffa* L.) Cultivadas en México. Revista Fitotecnia Mexicana. 2016; 39(3):199-206.

14. Najafpour Boushehri S, Karimbeiki R, Ghasempour S, Ghalishourani SS, Pourmasoumi M, Hadi A, Mbabazi M, Pour ZK, Assarroudi M, Mahmoodi M, Khosravi A, Mansour-Ghanaei F, Joukar F. The efficacy of sour tea (*Hibiscus Sabdariffa* L.) on selected cardiovascular disease risk factors: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. Phytotherapy Research. 2020; 34(2):329-339.

15. Maciel LG, do Carmo MAV, Azevedo L, Daguer H, Molognoni L, de Almeida MM, Granato D, Rosso ND. *Hibiscus sabdariffa* L. anthocyanins-rich extract: Chemical stability, *in vitro* antioxidant and antiproliferative activities. Food and Chemical Toxicology. 2018; 113:187-197.

16. Ghazala Riaz, Rajni Chopra. A review on phytochemistry and therapeutic uses of *Hibiscus sabdariffa* L. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2018; 102:575-86.

17. Mohammed Bule, Ahmed Hassan Albelbeisi, Shekoufeh Nikfar, Mohsen Amini, Mohammad Abdollahi. The antidiabetic and antilipidemic effects of *Hibiscus sabdariffa*: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. Food Research International. 2020; 130:1-27.

18. Izquierdo-Vega JA, Arteaga-Badillo DA, Sánchez-Gutiérrez M, Morales-González JA, Vargas-Mendoza N, Gómez-Aldapa CA, Castro-Rosas J, Delgado-Olivares L, Madrigal-Bujaidar E, Madrigal-Santillán E. Organic Acids from Roselle (Hibiscus *sabdariffa* L.)-A Brief Review of Its Pharmacological Effects. Pharmacological Effects. Biomedicines. 2020; 8(5):100.

19. Escobar Ortiz A, Castaño-Tostado E, Rocha-Guzmán NE, Gallegos-Infante JA, Reynoso-Camacho R. Anthocyanins extraction from *Hibiscus sabdariffa* and identification of phenolic compounds associated with their stability. 2021; 15(101):110-9.

20. Chen BH, Stephen Inbaraj B. Nanoemulsion and Nanoliposome Based Strategies for Improving Anthocyanin Stability and Bioavailability. Nutrients. 2019; 11(5):1052.

21. Pimentel-Moral S, Borrás-Linares I, Lozano-Sánchez J, Arráez-Román D, Martínez-Férez A, Segura-Carretero. Microwave-assisted extraction for *Hibiscus sabdariffa* bioactive compounds. 2018; 15(156):313-22.

22. Herranz-López M, Olivares-Vicente M, Encinar JA, Barrajón-Catalán E, Segura-Carretero A, Joven J, Micol V. Multi-Targeted Molecular Effects of *Hibiscus sabdariffa* Polyphenols: An Opportunity for a Global Approach to Obesity. Nutrients. 2017; 9(8):907

23. Baena-Santillán ES, Piloni-Martini J, Santos-López EM, Gómez-Aldapa CA, Rangel-Vargas E, Castro-Rosas J. Comparison of the Antimicrobial Activity of *Hibiscus sabdariffa* Calyx Extracts, Six Commercial Types of Mouthwashes, and Chlorhexidine on Oral Pathogenic Bacteria, and the Effect of *Hibiscus sabdariffa* Extracts and Chlorhexidine on Permeability of the Bacterial Membrane. Journal of Medicinal Food. 2021; 24(1):67-76.

24. Jan Lindhe NPL. Periodontología Clínica e Implantologia Odontologica. 6 ta. Vol. 2. Wiley-Backwell; 2017.

25.Thomas G.Wilson, Jr, DDS Kenneth S.Kornman, DDS P. Fundamentals of Periodontics. 2da ed. Honng Kong: Quintessence Publishing Co I, editor. Hong Kong; 2003.

26. Carranza F, Newman M, Takei H KP. Periodontologia clinica de Carranza. 11.ª ed. Venezuela: AMOLCA; 2014.

27. J. J. Echeverria García. Periodoncia e Implantología. 1 a. España: Oceano; 2011.

28. Muller H-P. Periodontología. 1a ed. México: Moderno; 2006.

29. Arramendi Benítez Elsa María, Remón Santiesteban Ailen. La Periodontitis, un trastorno más allá de las encías. Revista en internet 2020; 60(81):1-6.

30. Contreras A, Moreno SM, Jaramillo A, Pelaez M, Duque A, Botero JE, et al. Periodontal microbiology in Latin America. Periodontol 2000. 2015; 67(1):58-86.

31. Graetz C, Mann L, Krois J, Sälzer S, Kahl M, Springer C, et al. Comparison of periodontitis patients' classification in the 2018 versus 1999 classification. J Clin Periodontol. Sep 2019; 46(9):908-917.

32. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri- Implant Diseases and Conditions. J Periodontol. 2018; 45:162-70.

33. Rylev M, Kilian M. Prevalence and distribution of principal periodontal pathogens worldwide. J Clin Periodontol. 2008; 35:346-61.

34. Harpenau LA, Kao RT, Lundergan WP, M S. Periodoncia e implantología dental de Hall. 2014: Manual Moderno; México.

35. Zhou X, Zhang P, Wang Q, Ji N, Xia S, Ding Y, et al. Metformin ameliorates experimental diabetic periodontitis independently of mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibition by reducing NIMA related kinase 7(Nek7) expression. J Periodontol. 2019; 1(1):1032-1042.

36. Health WO. World Health Organization. World Oral Health Report 2003. Health WO. 2003;1.

37. Fernández Presas Ana María, En México, la enfermedad periodontal tiene una prevalencia de 70 porciento, Boletines Recientes Boletín UNAM-DGCS-476, 2016 https://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2016_476.html

38. Medina Solis CE, Ávila-burgos L. Prevalencia de la periodontitis. Hidalgo D Artemisa. 2006; 17(4):269-86.

39. Rojo Botello N, Flores Espinosa A, Arcos Castro M. Prevalencia, severidad y extensión de periodontitis crónica. Rev odontológica Mex. 2011; 15(1):31-9.

40. Vargas, YañeZ M. Periodontología e Implantología. In: Panamericana, editor. Epidemiologia de la Enfermedas Periodontal. 1a ed. México: Panamericana; 2016

41. Dyke TE Van, Kornman KS. Inflammation and Factors That May. J Periodontol. 2008; 79(8Suppl):1503-7.

42. Barreno PG. Inflamación. Rev R Acad Cienc Exact Fís Nat. 2008; 102(1):91-152.

43. Kumar Vinay, Abbas A. Basic Patology. 9na ed. EUA: Elsevier; 2012. 928 p.

44. Dale BA. Periodontal epithelium: a newly recognized role in health and disease. Periodontol 2000. 2002; 30:70-8.

45. Marja T. Pöllänen, Search for more papers by this author, Jukka I. Salonen, Veli-Jukka Uitto. Structure and function of the tooth–epithelial interface in health and disease. Periodontol 2000. 2003; 31:12-31.

46. Li Jiatao, Tan Jean, Martino Mikaël M., Lui Kathy O. Regulatory T-Cells: Potential Regulator of Tissue Repair and Regeneration. Journal Frontiers in Immunology. 2018; 23(9):585.

47. Slots J. Selection of antimicrobial agents in periodontal therapy. J Periodontal Res. 2002; 37(5):389-98.

48. Baruch Hernández Norma Beatriz et al. Eficacia de la clorhexidina en el tratamiento de gingivitis: tabletas o colutorio. Rev Med Universidad de Venezuela. 2012;12(2):6-12.

49. Waizel Bucay J, Martínez RIM. Algunas plantas usadas en México en padecimientos periodontales. Revista de la Asociación Dental Mexicana. 2012; 68(2):73-88.

50. Escobar RG. Eugenol: propiedades farmacológicas y toxicológicas. Rev Cubana Estomatol. 2002; 32(9):139-156.

51. Ariza-Flores Rafael, Serrano-AltamiranoVíctor, Navarro-Galindo Salvador, Ovando-Cruzet Manuel E, et al. Variedades Mexicanas de Jamaica (*Hibiscus Sabdariffa* L.). Rev Fitotec Mex. 2014; 37(2):181-5.

52. Guardiola Soledad y Mach Nuria. Potencial terapéutico del Hibiscus sabdariffa: una revisión de las evidencias científicas. Endocrinología y Nutrición. 2014; 61(5):274-97.

53. Pragya Singh, Mahejibin Khan, Hailu, Hailemariam. Nutritional and health importance of *Hibiscus sabdariffa*: a review and indication for research needs. Journal of Nutritional Health & Food Engineering. 2017; 6(5):00212.

54. Herrera-Arellano A, Flores-Romero S, Chávez-Soto MA, Tortoriello J. et al. standardized extract from Hibiscus Sabdariffa in patients with mild to moderate hypertension: A controlled and randomized clinical trial. Phytomedicine. 2004; 11(5):375-82.

55. Kuriyan R, Kumar DR, R R, Kurpad AV. An evaluation of the hypolipidemic effect of an extract of *Hibiscus Sabdariffa* L. leaves in hyperlipidemic Indians: a double blind, placebo controlled trial. Randomized Controlled Trial. 2010; (10):27.

56. Mozaffari-Khosravi H, Jalali-Khanabadi BA, Afkhami-Ardekani M, Fatehi F. Effects of sour tea (Hibiscus sabdariffa) on lipid profile and lipoproteins in patients with type II diabetes. Journal of Alternative and Complementary Medicine (New York, NY). 2009; 15(8):899-903.

57. Da-Costa-Rocha I, Bonnlaender B, Sievers H, Pischel I, Heinrich M. Hibiscus sabdariffa L. A phytochemical and pharmacological review. Food Chem. 2014; 165:424-43.

58. Abdallah EM. Antibacterial activity of *Hibiscus sabdariffa* L. calyces against hospital isolates of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. Journal of Acute Disease. 2016; 5(6):512-6.

59. Gonelimali FD, Lin J, Miao W, Xuan J, Charles F, Chen M, et al. Antimicrobial Properties and Mechanism of Action of Some Plant Extracts Against Food Pathogens and Spoilage Microorganisms. Journal Frontiers in Microbiology. 2018; 9:1639.

60. Sulistyani H, Fujita M, Miyakawa H, Nakazawa F. Effect of roselle calyx extract on *in vitro* viability and biofilm formation ability of oral pathogenic bacteria. Asian Pac J Trop Med. 2016; 9(2):119-24.

61. Baena Santillán, E.S Piloni Martini, J Santos López, E.M Gómez Aldapa, C.A. Rangel Vargas, E Castro Rosas, Comparación antimicrobiana de extractos de *Hibiscus sabdariffa* contra seis enjuagues bucales comerciales sobre bacterias patógenas orales. avances de Investigación en Inocuidad de alimentos. 2019; 2:1-5.

62. Badanian Andrea, Bueno Luis, Papone Virigina. Análisis bacteriano comparativo de cuadros de Periodontitis Crónica y Agresiva en una población muestra de Uruguay. Odontoestomatología. 2019; 21(33):5-13.

63. Trijani Suwandi1, Dewi Fatma Suniarti, Siti Wuryan Prayitn. Effect of ethanol extract of *Hibiscus sabdariffa* L. calyx on *Streptococcus sanguinis* viability in vitro biofilm based on crystal violet. Journal of Medicinal Plants Research. 2013; 7(33):2476-3482.

64. Nakazawa Herastuti Sulistyani, Mari Fujita, Hiroshi Miyakawa, Futoshi. Effect of roselle calyx extract on in vitro viability and biofilm formation ability of oral pathogenic bacteria. Asian Pac J Trop Med. 2016; 9(2):119-24.

65. Thangavelu A, Kaspar SS, Kathirvelu RP, Srinivasan B, Srinivasan S, Sundram R. J Pharm Bioallied Sci. Chlorhexidine: An Elixir for Periodontics. J Pharm Bioallied Sci. 2020; 12(1):S57-S59

66. Lenni Indriani, Mochamad Dharmautama. Antimicrobial test of roselle (*hibiscus sabdariffa L.*) ethanol extract againts *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus sanguis* using agar method (*in vitro* study). Journal of Dentomaxillofacial Science. 2016; 1(2):134-8.

67. Portillo-Torres LA, Bernardino-Nicanor A, Gómez-Aldapa CA, González-Montiel S, Rangel-Vargas E, Villagómez-Ibarra JR, González-Cruz L, Cortés-López H, Castro-Rosas J. Hibiscus Acid and Chromatographic Fractions from *Hibiscus Sabdariffa* Calyces: Antimicrobial Activity against Multidrug-Resistant Pathogenic Bacteria. Antibiotics (Basel). 2019; 8(4):218.

68. Benza-Bedoya1 Ricardo, Pareja-Vásquez Maria. Diagnóstico y tratamiento de la periodontitis agresiva. odontoestomatologia. 2017; 19:29-39.

69. Martínez-Martínez Alicia C, María E. Llerena, Maria S. Peñaherrera-Manosalva. Prevalencia de enfermedad periodontal y factores de riesgo asociados. Dominio de las Ciencias 2017; 3(1):99-108.

70. Murillo G, Vargas MA, Castillo J, et al. Prevalencia y severidad de gingivitis inducida por placa en tres ciudades de Latinoamérica: Ciudad de México-México, Gran Área Metropolitana-Costa Rica y Bogotá- Colombia. Odovtos-Int J Dent Sc. 2018; 20(2):91-102.

71. María de los Ángeles Lameda Albornoz, María E. Llerena, María Fernanda Paredes, Rivas, Julianne Thaidi Sánchez Díaz, María José Sayago Lameda, Pablo Alexander Yáñez Guerrero. Uso de las plantas Medicinales para el tratamiento de la enfermedad Periodontal: una revisión sistemática. Revista Venezolana de Investigación Odontologíca de la IADR. 2019; 7(2):101-20.

72. Rojo, A. (2014). Cálculo del tamaño muestral en procedimientos de experimentación con animales. Valoración de las incidencias. *Animales de Laboratorio*, 31-33.