



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza
Biología Experimental

**EFFECTIVIDAD DE *Tagetes lucida* SOBRE
INTERLEUCINAS PROINFLAMATORIAS Y ESTRÉS
OXIDATIVO EN ADULTOS MAYORES CON
PERIODONTITIS**

TESIS

Que para optar para el grado:
Maestra en Ciencias Biológicas

Presenta:
Thalía Ópalo Macías Camacho

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:
DRA. RAQUEL RETANA UGALDE
FES ZARAGOZA, UNAM**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL:
DRA. MARTHA LEGORRETA HERRERA
FES ZARAGOZA, UNAM**

**DRA. CARMEN MEJÍA VÁZQUEZ
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza
Biología Experimental

**EFFECTIVIDAD DE *Tagetes lucida* SOBRE
INTERLEUCINAS PROINFLAMATORIAS Y ESTRÉS
OXIDATIVO EN ADULTOS MAYORES CON
PERIODONTITIS**

TESIS

Que para optar para el grado:
Maestra en Ciencias Biológicas

Presenta:
Thalía Ópalo Macías Camacho

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:
DRA. RAQUEL RETANA UGALDE
FES ZARAGOZA, UNAM**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL:
DRA. MARTHA LEGORRETA HERRERA
FES ZARAGOZA, UNAM**

**DRA. CARMEN MEJÍA VÁZQUEZ
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el subcomité de Biología Evolutiva y Sistemática, del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 06 de noviembre de 2017, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna, **MACÍAS CAMACHO THALÍA ÓPALO** con número de cuenta **94262142** con la tesis titulada "**EFFECTIVIDAD DE *Tagetes lucida* SOBRE INTERLEUCINAS PROINFLAMATORIAS Y ESTRÉS OXIDATIVO EN ADULTOS MAYORES CON PERIODONTITIS**", realizada bajo la dirección de la **DRA. RAQUEL RETANA UGALDE**:

Presidente: DRA. RENATA PATRICIA SAUCEDO GARCÍA
Vocal: DR. ADOLFO ANDRADE CETTO
Secretario: DRA. MARTHA LEGORRETA HERRERA
Suplente: DR. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO
Suplente: DRA. MARÍA DEL CARMEN MEJÍA VÁZQUEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 01 de febrero de 2018.

DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por el apoyo recibido para la realización de la presente investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) quien me otorgó una beca para cursar los estudios de maestría, en el Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM. Número de becario/CVU: 70011.

A la Unidad de Investigación en gerontología por el financiamiento para la presente investigación.

A mi Tutora y al miembros del Comité tutorial.

Agradecimientos

Al Dr. Víctor Manuel Mendoza Núñez por el apoyo y financiamiento otorgado para la realización de mi investigación.

A la Dra. Estela Camacho Pantoja por su apoyo durante toda la realización de la presente investigación pero en particular por el apoyo otorgado en la fase clínica.

A Dr. Adolfo Andrade Cetto por haberme hecho el honor de ser mi sinodal, por sus asesorías, apoyo, financiamiento y realización del análisis cromatográfico del extracto vegetal en HPLC-DAD.

A la Dra. Renata Patricia Saucedo García y al Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano les reitero mi agradecimiento al honrarme en formar parte de mi jurado y por su apoyo.

A la Dra. Martha Sánchez Rodríguez por su apoyo y asesoría metodológica.

A la Dra. Sonia M. Escandón Rivera por el apoyo otorgado en la realización del análisis cromatográfico del extracto vegetal en HPLC-DAD.

Al Dr. Edelmiro Santiago Osorio por sus diversos consejos y su invaluable amistad así como a su excelente equipo de trabajo en especial a la Dra. Itzen Aguiñiga Sánchez, al M. en C. Biológicas Luis A. Martínez Juárez y a la Biól. Guadalupe Gómez García por todo el apoyo otorgado para el análisis de las muestras en el citómetro de flujo, fue una distinción el trabajar con ustedes.

A la Dra. Lourdes Castillo por su apoyo y asesoría para la realización del análisis de las muestras en el FITR.

Al Dr. Eloy Solano y su equipo de colaboradores del herbario de la FES-Zaragoza por su apoyo para la certificación botánica de *Tagetes lucida*.

A la Mtra. Francis Robles López por su asesoría en el área farmacéutica.

A la Dra. Isabel Soto por sus incontables asesorías para la realización de mi posgrado e investigación.

Al Dr. Juan José Rodríguez Mercado por las incontables asesorías, apoyo incondicional, amistad y por su entrañable compromiso académico.

Al Dr. Armando Rodríguez por su apoyo, innumerables asesorías y su calidad humana.

A mis profesores del Posgrado en ciencias biológicas por haberme compartido sus conocimientos y engrandecer mi formación.

Reiteró mi agradecimiento al Dr. Arcadio Monroy Ata, al Dr. Germán Calva, al Mtro. Armando Cervantes, al Dr. Alfredo Bueno, al Dr. Isaías H. Salgado Ugarte por sus incontables asesorías, apoyos, consejos y sobre todo por nunca dejar de animarme para que ingresara a la maestría y durante la misma.

A Dr. José Francisco Murrieta Pruneda por su asesoría epidemiológica.

A la M. en C. Biológicas Taide L. Arista Ugalde por su asesoría en los procesos del laboratorio y por su amistad que me hizo más ligero el trabajo de laboratorio.

Al C. D. Alejandro Arregui Calderón por su apoyo.

A la comunidad universitaria de la FES Zaragoza que en sus diversos funcionarios, personal de confianza, académicos y administrativos siempre he tenido un voto de confianza y apoyo.

A los pacientes que participaron en esta investigación, la cual sin su participación entusiasta no habría tenido fruto.

GRACIAS

Dedicatoria:

Dedico este trabajo a mi familia:

A la Madre Tierra por llevarme por el sendero del conocimiento.

A mi mamá que siempre estuvo apoyándome en todos y cada uno de los aspectos de este proyecto.

A mis niños peludos (Apolo, Thor, Mapache, Benito, Panther, Atila, Ticha, Hermes, Maurice, Tigger, Nena Flor, Andrómeda y Cronos), a mis niñas verdes (Hécate, Bellota y Lucky) que siempre están esperándome a que llegue a casa, y a aquellos que durante este tiempo se fueron, que hoy son uno solo con la Madre Tierra. Gracias por las enseñanzas de vida: Nene Pooh, Pequeña, Ra, Toscana, Lenguardo, Bandido, Gigio y Hades.

A mis compañeros verdes de este hogar, porque sus espíritus me dan la paz y serenidad en tiempos de tormenta y desazón.

A mi casa FES-Zaragoza, que me conoció desde el vientre de mi madre, gracias.

Este manuscrito está dedicado en especial a *Hypatía* (πατρία) (***In memoriam***); Científica griega.

INDICE

	Pág.
RESUMEN	
ABSTRACT	1
I.INTRODUCCIÓN	3
II. OBJETIVOS	4
III. ANTECEDENTES	5
III.1 Periodontitis crónica	5
III.1.1 Manifestaciones clínicas	6
III.1.2 Fisiopatología	7
III.1.3 Degradación de la matriz extracelular (MEC) y el proceso de resorción ósea periodontal.	9
III.2- PROCESO INFLAMATORIO	10
III.2.1 Características del proceso inflamatorio	10
III.2.2.Citocinas	12
Propiedades generales de las citocinas	13
Clasificación funcional	13
Interleucinas	13
III.3- ESTRÉS OXIDATIVO	15
III.3.1 Lípidos	16
III.3.1.1Peroxidación lipídica	17
III.3.2 Proteínas y carbohidratos	18
III.3.3 ADN	18
III.3.4 Antioxidantes	19

III.3.5 Daño por estrés oxidativo y enfermedades crónicas no transmisibles	20
III.3.6 Estrés oxidativo asociado a enfermedad periodontal	21
III.4.- <i>Tagetes lucida</i> Cav.	22
III.4.1 Composición química	23
III.4.2 Antecedentes etnofarmacológicos	24
III.4.3 Antecedentes de la investigación farmacológica	24
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
V. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	30
VI. HIPOTESIS	31
VII. MATERIAL Y MÉTODOS	
VII.1 Población y Diseño	32
VII.2 Variables	33
VII.3 Técnicas e Intervención	34
VII.4 Evaluación Clínica	35
VII.5 Evaluación de Marcadores de Estrés Oxidativo	36
VII.6 Evaluación de Marcadores de Inflamación	38
VII.7 Análisis estadístico	39
VIII.RESULTADOS	40
IX DISCUSIÓN	46
X. CONCLUSIONES	52
XI.REFERENCIAS	53

RESUMEN

En México la periodontitis crónica tiene una incidencia en el 70% de los adultos mayores, se presenta como formación de bolsas parodontales, pérdida ósea, migración patológica de la encía, movilidad de órganos dentarios, y por último, pérdida de éstos. La inflamación crónica, se inicia en la encía hacia los tejidos periodontales de soporte; depende de la resistencia del huésped a la inflamación y de los factores que modifican la respuesta inmunológica; por lo que, las interleucinas (IL)1, 6, 8, 10, 12 y el factor de necrosis tumoral alpha (TNF- α), se consideran los principales mediadores de la periodontitis crónica. La secreción de estas citocinas es dada por la translocación del NF- κ B al núcleo, la producción de prostaglandinas E2 (PGE2) y la peroxidación lipídica la cual produce daño al tejido periodontal por medio de la degradación directa e indirecta de la colágena y resorción de hueso en el periodonto. Con base en lo anterior, se presenta la necesidad de atender estos procesos etiopatogénicos en la periodontitis en este sentido, *Tagetes lucida* Cav. es una especie vegetal herbácea de la familia *Asteracea*, utilizada en la medicina tradicional mexicana para patologías del aparato genitourinario, digestivo y sistema nervioso; la composición química de esta especie es muy variada; por lo que se realizó un análisis fitoquímico cromatográfico para identificar los componentes químicos presentes en el extracto alcohólico de *Tagetes lucida* Cav., en forma de colutorio se evaluó su eficacia; sobre los parámetros clínicos de periodontitis crónica, marcadores de inflamación (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 y TNF- α) y los marcadores de estrés oxidante [lipoperoxidación (LPO), capacidad antioxidante total (CAT) y actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD)] en pacientes adultos mayores con periodontitis crónica, después de 3 meses de tratamiento. Para tal efecto, se realizó un cuasi-experimento en 90 adultos mayores con diagnóstico de periodontitis crónica, conformando dos grupos de forma aleatoria, uno: control (n=30) y otro con tratamiento (n=60), a los cuales se les administró por tres meses un extracto de *Tagetes lucida* Cav. en forma de colutorio (10%). A todos los pacientes se les evaluó el estado clínico parodontal pre y post- tratamiento, se tomaron muestras de saliva a la cuales se les cuantificaron lipoperoxidos,

capacidad antioxidante total y la actividad de SOD, con técnicas espectrofotométricas y las interleucinas se cuantificaron por citometría de flujo. Los datos se analizaron con el programa SPSS V. 22.0 a través de medidas descriptivas valores promedio \pm DE, frecuencias, porcentajes y como pruebas de comparación X^2 , t de student y ANOVA de medidas repetidas con un 95% de confianza. Los resultados obtenidos mostraron una disminución significativa en los valores de los parámetros clínicos de la periodontitis crónica, concentración de MDA, IL-1 β , IL-8 e IL-12 ($p \leq 0.05$) en el grupo tratamiento, probablemente los resultados obtenidos se deben a los compuestos fenólicos presentes en el extracto de *T. lucida* Cav. Por lo que se sugiere el uso de *Tagetes lucida* Cav. en forma de colutorio, como complemento en el tratamiento de la periodontitis crónica debido a su acción antioxidante y antiinflamatoria.

ABSTRACT

In Mexico, chronic periodontitis has an incidence of 70% of older adults, it is characterized by: parodontal pocket formation, bone loss, pathological migration of the gum, mobility of dental organs, and loss of chronic inflammation begins in the gingiva towards supporting periodontal tissues; depends on the host's resistance to inflammation and the factors that modify the immune response; therefore, interleukins (IL) 1, 6, 8, 10, 12 and tumor necrosis factor α (TNF- α) are considered the main mediators of chronic periodontitis. The secretion of these cytokines is given by the translocation of NF- κ B in the nucleus, the production of prostaglandins E2 (PGE2) and lipid peroxidation which produces damage to the periodontal tissue through the direct and indirect collagen degradation of resulting in the oxidation of protease and bone resorption in the periodontium. Based on the above, there is a need to address these etiopathogenic processes in periodontitis. In this regard, *Tagetes lucida* Cav. is an herbaceous plant species of the *Asteraceae* Family, used in traditional mexican medicine for genitourinary, digestive and nervous system pathologies; the chemical composition of this species is diverse; therefore, a chromatographic phytochemical analysis was performed to identify the chemical components present in the *Tagetes lucida* Cav. alcohol extract, wich was evaluated in the form of a mouthwash on the clinical parameters of chronic periodontitis, inflammation markers (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 and TNF- α) and oxidative stress markers [lipoperoxidation (LPO), antioxidant capacity total (CAT) and superoxide dismutase activity (SOD)] in elderly patients with chronic periodontitis, after 3 months of treatment. For this purpose, a quasi-experiment was performed in 90 older adults diagnosed with chronic periodontitis, two groups were allocated in a random manner, one: control (n = 30) and another with treatment (n = 60), which was administered with an extract of *T. lucida* Cav. in the form of a (10%) mouthwash for three months. The patients were evaluated pre and post-treatment periodontal clinical status, in the same way saliva samples were collected to evaluate lipoperoxides concentration, total antioxidant capacity and SOD activity, with spectrophotometric techniques and the interleukins were

quantified by flow cytometry. The data were analyzed with the SPSS program V. 22.0 through descriptive measures average values \pm SD, frequencies, percentages and as comparison tests X^2 , student t and repeated measures ANOVA with 95% confidence. The results obtained showed a significant decrease in the values of the clinical parameters of chronic periodontitis, concentration of MDA, IL-1 β , IL-8 and IL-12 ($p \leq 0.05$) in the treatment group, results given by the phenolic compounds present in *T. lucida* Cav. extract. Therefore, the use of *Tagetes lucida* Cav. in the form of mouthwash is suggested as a complement in the treatment of chronic periodontitis due to its antioxidant and anti-inflammatory action.

INTRODUCCIÓN

En la cavidad bucal se presentan diversas patologías de carácter infeccioso crónico tal es el caso de la periodontitis crónica; la cual afecta de manera psicosocial y sistémica al adulto mayor. Esta patología se considera una enfermedad de alta prevalencia en la población adulta mayor, y de gran importancia epidemiológica ya que la extravasación de este proceso infeccioso cursa con inflamación crónica donde existe una interacción inmunológica entre el huésped y la placa dentobacteriana. De manera importante la respuesta inmune del huésped, afecta los tejidos de sostén del diente. Está relacionado con otros procesos inflamatorios, de la misma manera se asocia al estrés oxidativo (EOx) y al aumento en la síntesis de radicales libres (RL), como elementos fundamentales en la fisiopatogénesis del proceso inflamatorio característico de la periodontitis crónica, el estrés oxidativo causa daño a diferentes tipos de biomoléculas como el ADN, ya que los sistemas amortiguadores y de defensa disminuyen.

Se han analizado los efectos de diversas especies vegetales, entre las cuales están: *Quercus sp.*, *Bursa pastoris*, *Ruta graveolens* y *Tagetes lucida* Cav, al respecto esta última, es una especie vegetal ruderal, endémica de México y perenne que presenta una serie de metabolitos, como: cumarinas, estragol y quercertina compuestos estudiados desde el siglo pasado por diversos grupos de trabajo. *T. lucida* Cav., tiene efectos antiinflamatorios, antioxidantes y antimicrobianos, entre otras propiedades terapéuticas. Las cuales muestran la importancia etnofarmacológica que esta especie vegetal presenta, sin embargo, hasta el momento no se ha investigado el efecto de *Tagetes lucida* Cav. en el tratamiento de la periodontitis crónica.

Es por ello que la presente investigación tuvo por objetivo evaluar la efectividad de los extractos de *Tagetes lucida* Cav. en forma de colutorio, sobre los parámetros clínicos de periodontitis crónica, marcadores de inflamación,

marcadores de estrés oxidativo, en pacientes adultos mayores después de 3 meses de tratamiento.

II. OBJETIVO

Evaluar la efectividad del extracto de *Tagetes lucida* Cav. en forma de colutorio, sobre los parámetros clínicos de periodontitis crónica, marcadores de inflamación, los marcadores de estrés oxidativo en pacientes adultos mayores con diagnóstico de periodontitis crónica, después de 3 meses de tratamiento.

Objetivos específicos:

1. Evaluar la efectividad del extracto de *Tagetes lucida* Cav., en forma de colutorio, sobre los parámetros clínicos de periodontitis crónica (bolsa paradontal, inserción clínica, migración gingival, halitosis, movilidad, sangrado al cepillado, sangrado al sondaje) en adultos mayores con periodontitis crónica.
2. Evaluar la efectividad del extracto de *Tagetes lucida* Cav., en forma de colutorio, sobre los marcadores de inflamación (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 y TNF- α) en adultos mayores con periodontitis crónica.
3. Evaluar la efectividad del extracto de *Tagetes lucida* Cav., en forma de colutorio, sobre los marcadores de estrés oxidante (LPO, ATT y SOD) en adultos mayores con periodontitis crónica.

III. ANTECEDENTES

III.1. PERIODONTITIS CRÓNICA

De las enfermedades del tejido óseo en el humano las enfermedades periodontales son las más prevalentes, lo que lleva a la pérdida dental en 10% al 15% en adultos¹⁻³. El 70% de la población adulta mayor presenta periodontitis crónica, en el proceso normal de envejecimiento del periodonto—causado por el envejecimiento celular⁴⁻⁶. En general, el envejecimiento celular es la base de los cambios intrínsecos que se observan en los tejidos bucales dados por el tiempo. El proceso de envejecimiento no afecta a todos los tejidos de la misma manera⁷⁻⁹. Sin embargo, otras teorías infieren que la enfermedad periodontal avanzada se debe a la pérdida de dientes durante la etapa de adultez del paciente, lo cual sugiere que la edad avanzada no es un factor de riesgo para la enfermedad periodontal¹⁰⁻¹⁵ (Fig. 1).

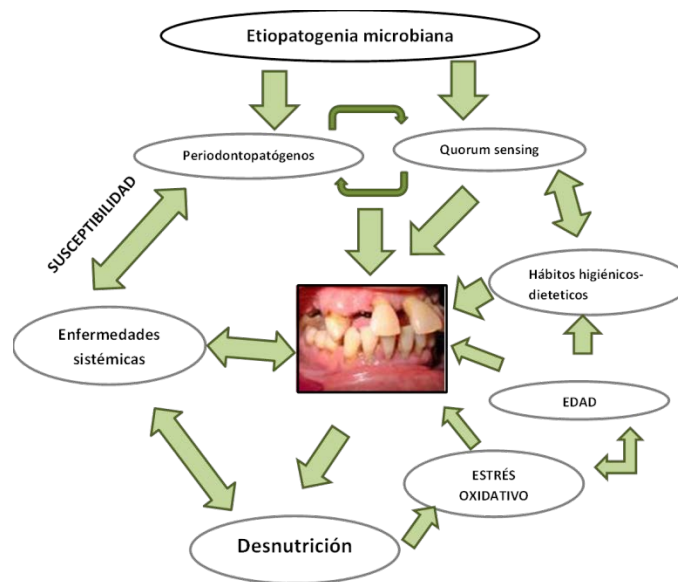


Figura 1. Factores biológicos, ambientales y sociales relacionados con la etiopatogénesis de la periodontitis crónica (PC). Los diversos factores indicados convergen sobre la historia natural de la PC y se asocian entre ellos, estas asociaciones inducen a una aparición temprana de la misma y condicionan su severidad.

La periodontitis crónica es una enfermedad infecciosa que causa inflamación los tejidos de soporte dental, pérdida progresiva ósea, de la inserción y por último, pérdida de los órganos dentarios. Se puede localizar en un solo órgano dentario y/o en un grupo de dientes o generalizada, según sea la distribución de los factores etiológicos⁴.

Los síntomas que se presentan son: sensibilidad a la masticación y al tacto como consecuencia de la denudación de las raíces, sangrado, dolor irradiado profundo y sordo durante y después de la masticación¹⁶. Los síntomas agudos son dolor punzante y sensibilidad a la percusión. En tanto que los síntomas pulpares incluyen sensibilidad a dulces, cambios térmicos y dolores punzantes, como consecuencia de pulpitis o hiperemias⁴.

II.1.2 Manifestaciones clínicas

Las características clínicas son:

a) Presencia de bolsas infraóseas, pérdida angular más que horizontal ósea; ensanchamiento del ligamento periodontal. La movilidad dentaria es intensa y frecuentemente con inflamación gingival comparativamente pequeña.

La característica clínica más importante es la bolsa periodontal con exudado, se encuentra limitada por un lado por la superficie del diente, con el cemento expuesto cubierto por depósitos calcáreos y biofilm y por otro lado, en la encía con su biofilm específico con diferentes grados de inflamación. En el fondo de la bolsa se localiza tejido necrótico. El epitelio de la bolsa, en su pared blanda frecuentemente se encuentra ulcerado y sus productos penetran en el tejido conectivo subyacente por esas ulceraciones. Las papilas del tejido conectivo son largas y se extienden a la superficie. La superficie bucal del epitelio gingival se caracteriza por la presencia de una capa superficial queratinizada que delimita el margen libre de la encía^{4,16}.

b) Resorción de la cresta alveolar, este proceso de resorción osteoclástica de la cresta alveolar, se intensifica a través de factores intrínsecos que favorecen la destrucción de sustancias fundamentales de la matriz ósea⁵.

La gravedad de la destrucción del periodonto que se presenta como resultado de la periodontitis crónica tiene varios factores asociados entre los que se encuentra la edad. La pérdida ósea y de la inserción se vuelve más prevalente y más grave con la edad debido a la acumulación de destrucción^{9,12}.

La gravedad o severidad de la enfermedad se clasifica según Carranza (2014) en:

- Periodontitis leve: cuando se pierde de 1 a 2 mm de la inserción clínica.
- Periodontitis moderada: cuando se pierde de 3 a 5 mm de inserción clínica.
- Periodontitis severa o avanzada: cuando se pierden 6 mm o más de inserción clínica¹⁶.”

II.1.3 Fisiopatología de la periodontitis crónica

Asociado a la periodontitis, se han aislado numerosas especies bacterianas de la placa subgingival y algunas de ellas se asocian directamente con la enfermedad y su progresión¹⁷. La mayoría de estas bacterias residen en la bolsa periodontal y no invaden tejidos periodontales. Sin embargo, el sistema inmune no logra eliminar eficientemente a todos los microorganismos y esto ocasiona la inflamación crónica llevando a la destrucción tisular debido al reclutamiento de leucocitos, con la subsecuente liberación de mediadores y citocinas que juegan un papel crucial en la patogénesis de la enfermedad periodontal (Fig. 2). Aunque la presencia de patógenos periodontales se requiere para la aparición de la enfermedad periodontal, la progresión depende de la respuesta del huésped hacia la bacteria patogénica que coloniza la superficie del diente^{4,9,17} (Figs.1, 2 y 3).

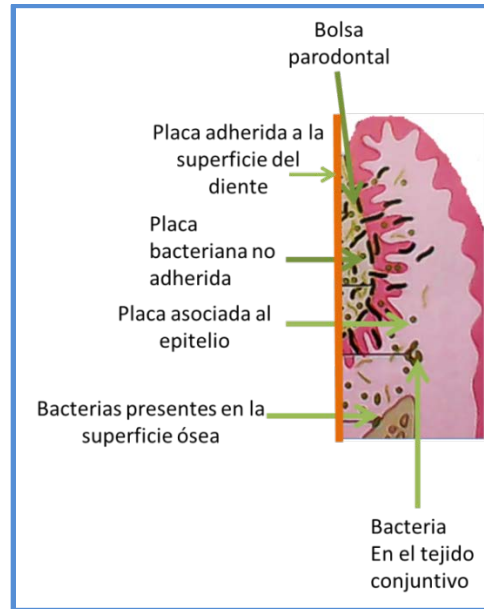


Figura 2. Asociación entre la placa bacteriana (PB) en la superficie del diente y los tejidos periodontales. Modificado de Newman et al 2014¹⁶. La PB que se adhiere a la superficie del órgano dentario inicia la formación y profundización de la bolsa parodontal (BP); iniciando la invasión de bacterias a los tejidos parodontales (periodontopatógenos).

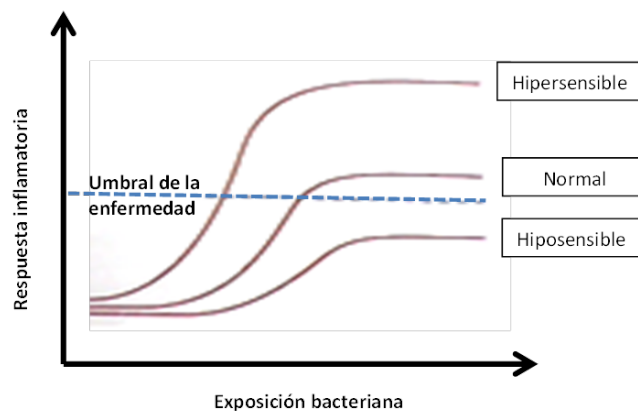


Figura 3. Asociación entre la exposición bacteriana y la respuesta inflamatoria periodontal. Modificado de Newman et al 2014¹⁶. La respuesta inflamatoria periodontal a la exposición bacteriana está determinada por la respuesta del huésped y particularmente por la sensibilidad a la periodontitis crónica.

El proceso inflamatorio crónico debido a la persistencia de estos patógenos rompe los mecanismos homeostáticos y causa la liberación de mediadores como las citocinas proinflamatorias, proteasas y prostanoïdes, los cuales promueven la destrucción de la matriz extracelular en la encía y estimulan la resorción ósea^{4, 6, 9, 17, 18}.

El patógeno *Porphyromas gingivalis* agente etiológico de la periodontitis crónica, produce la enzima bacteriana peptidil arginasa desaminasa (PAD), en se encuentra en los procesos bucales infecciosos exacerbados aun cuando *P. gingivalis* ya no se localice en el sitio de infección^{19- 21}, se ha observado que en condiciones de inflamación crónica, las PADs, citrulizan a las proteínas de adhesión celular como PAD-4 expresada por los neutrófilos. La citrulización tiene el potencial de modificar las propiedades de la adhesión celular contenida en la secuencia RGD (fibronectina, fibrinógeno) y en las secuencias de unión GFOGER (colágena)^{22,26}. De manera sumativa existen otros factores asociados a la periodontitis crónica, como la asociación de la periodontitis crónica con factores genéticos²³⁻²⁶, los cuales son factores predisponentes para el grado de agresividad y cronicidad, así mismo es un factor para la aparición temprana de la patología.

Por lo anterior, las enfermedades periodontales son enfermedades inflamatorias crónicas que llevan eventualmente a la pérdida de estructuras de sostén del diente, incluyen la resorción de hueso alveolar de la mandíbula. La respuesta del huésped es la principal causa del deterioro parodontal. La resorción ósea mediada por la respuesta inmune ocurre en pacientes con enfermedad periodontal, ya que las citocinas resorptivas (IL-1 e IL-8) y las fuentes celulares de éstas se encuentran presentes en la encía inflamada^{4,16, 18, 28,29}.

III.1.4 Degradación de la matriz extracelular (MEC) y el proceso de resorción ósea periodontal.

La IL-1 β (interleucina -1) y el factor de necrosis tumoral *alpha* (TNF- α), son mediadores importantes de la inflamación y degradación de tejidos en la periodontitis. Ambas citocinas favorecen las manifestaciones locales y sistémicas de la enfermedad^{27,30 -34}. La asociación de la actividad de la IL-1 con la actividad de osteoclastos y el incremento de la resorción ósea se basa en que la IL-1 actúa sobre los osteoblastos induciendo la expresión del factor activador de la

diferenciación de osteoclastos (RANKL). RANKL estimula la diferenciación de los precursores de osteoclastos maduros responsables de la resorción del hueso. Además RANKL e IL-1 estimulan directamente a los osteoclastos maduros para que ejerzan su acción. La matriz ósea puede reabsorberse únicamente por los osteoclastos, y la estimulación local de la actividad de esta célula o la generación de osteoclastos, da como consecuencia la pérdida de hueso alveolar en los pacientes con periodontitis crónica.³⁵⁻⁴⁸ (Fig. 4)

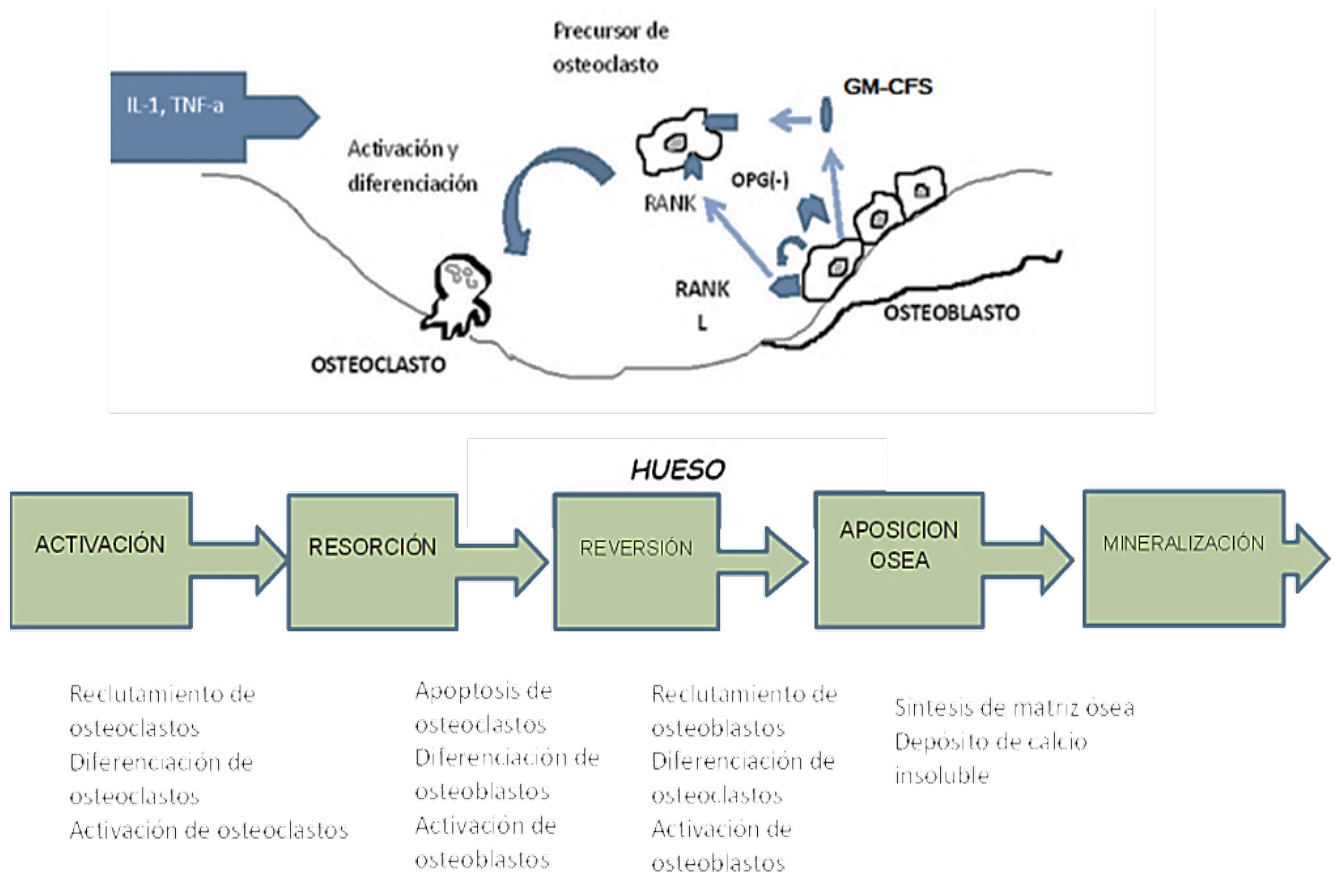


Figura 4. Acción de IL-1 y TNF- α en el ciclo de remodelación de hueso. *Modificada de Castrillón LE, 2007*³·GM-CFS: Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos .La IL-1 y el TNF- α participan en la síntesis del ligando RANK (RANKL) el cual actúa en la diferenciación del osteoclasto al favorecer la resorción ósea, este mecanismo depende de la osteoprotegerina (OPG)

III.2 PROCESO INFLAMATORIO

III.2.1 Características del proceso inflamatorio

La reacción inflamatoria es un mecanismo vital de defensa que provee el medio por el cual los anticuerpos, el sistema del complemento y las células fagocíticas penetran en los tejidos. Por lo tanto, la inflamación es un medio destinado a focalizar los mecanismos inmunológicos protectores en una región localizada dentro del tejido^{4,16}.

Es un proceso que ocurre después de la lesión a un tejido, es una respuesta al daño que se caracteriza por presentar reclutamiento de fluidos, proteínas plasmáticas y leucocitos a los tejidos en respuesta al daño, invasión microbiana o antigénica y los desechos que resultaron de la respuesta inflamatoria⁹.

La inflamación se caracteriza por la presencia de calor, rubor, edema, dolor y pérdida de la función celular, estos signos ocurren como consecuencia directa de cambios en la permeabilidad vascular lo que permite el escape de electrolitos, macromoléculas y células, desde los vasos sanguíneos hacia el espacio extravascular^{5,6} (Fig.5).

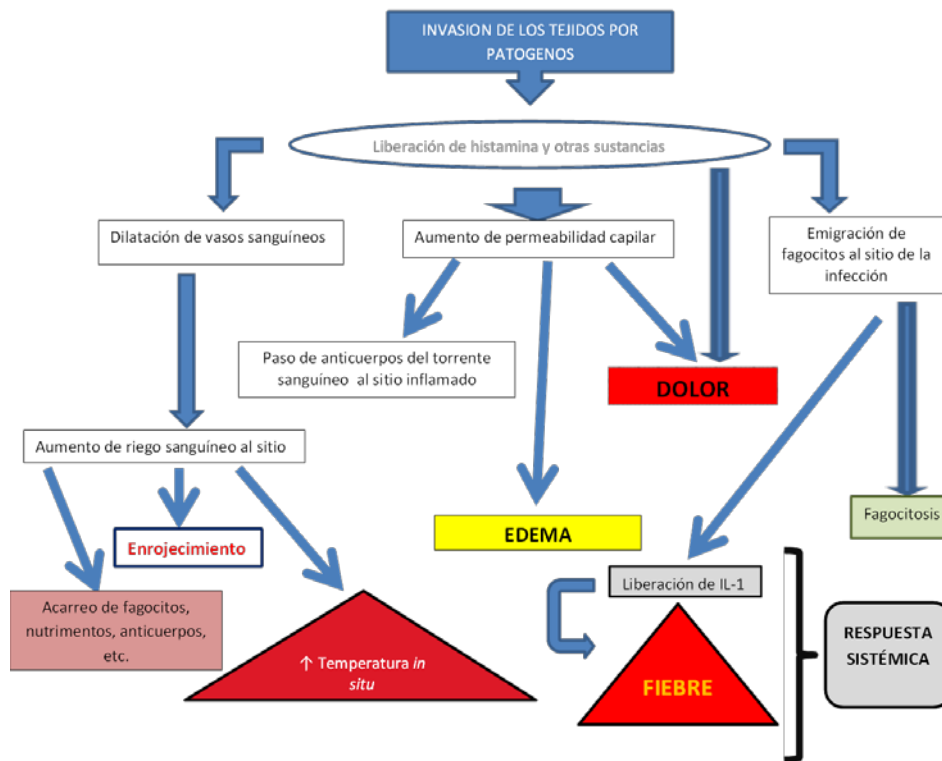


Figura 5. Mecanismos de la reacción inflamatoria. Modificado de Solomón EP, 1999⁴⁹. La reacción inflamatoria en respuesta a la invasión de los tejidos por los periodontopatógenos provoca una serie de reacciones relacionadas que producen síntomas entre los que se encuentran la presencia del dolor, edema, aumento de temperatura local y rubor

Las fases de la inflamación se han definido como aguda, crónicas y de resolución. En la inflamación aguda, los vasos sanguíneos se dilatan, razón por la cual se presenta calor y rubor en el área. El edema se produce por el escape de fluidos y células al tejido extravascular, el dolor y la pérdida de función que acompañan a la inflamación, se deben a la presión ejercida en las terminales nerviosas por la acumulación de líquido extravascular y a la liberación de mediadores químicos. En las inmediaciones del sitio de la lesión, los neutrófilos se acumulan en los capilares y en las vénulas postcapilares, cruzan la capa endotelial y se mueven hacia la fuente de los mediadores inflamatorios. En el sitio de inflamación, los neutrófilos fagocitan el material extraño, liberan enzimas digestivas, proteínas bactericidas y oxidantes potentes^{3, 4, 9, 16}.

Se produce el reclutamiento de monocitos, macrófagos y linfocitos en el sitio de la lesión. Los monocitos y macrófagos ingieren y destruyen a los agentes infecciosos o al material extraño que fue resistente a la acción de los neutrófilos. Además, estas células digieren y retiran el tejido dañado, que no ha sobrevivido a la respuesta inflamatoria⁴⁻⁶.

Finalmente se produce la etapa de resolución. Las células del sitio de inflamación o cercanas al mismo, proliferan para restaurar la arquitectura y función normal del tejido. Hay formación de cicatriz y de absceso o bien persistencia del proceso inflamatorio crónico^{4, 6, 9, 16}.

Las citocinas coordinan a respuesta inflamatoria, son moléculas señales intercelulares no específicas, que activan a otras células⁶.

III.2.2 Citocinas

-Propiedades generales de las citocinas

Las citocinas son glucoproteínas de entre 8 y 75 Kd, las cuales son codificadas por el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) Clase II y secretadas por leucocitos principalmente y son pleitrópicas. La síntesis de las citocinas está caracterizada por breve y autolimitada. Su acción se produce por unión a receptores específicos presentes en la superficie celular⁹.

Las citocinas son péptidos de entre 70 a 190 aa. La mayoría se sintetizan en varios tipos celulares⁶. De acuerdo a su función se clasifican en pro-inflamatorias y anti-inflamatorias: (IL- 1, IL-6, IL-8 y TNF- α), son las principales mediadoras de la acción destructiva en el periodonto en niveles elevados durante los procesos patológicos⁴⁰⁻⁴².

-Propiedades generales de las citocinas

Las citocinas son glucoproteínas de entre 8 y 75 Kd, las cuales son codificadas por el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) Clase II y secretadas por leucocitos principalmente y son pleotrópicas. La síntesis de las citocinas está caracterizada por breve y autolimitada. Su acción se produce por unión a receptores específicos presentes en la superficie celular⁹.

-Clasificación funcional

Las citocinas se han clasificado dependiendo la funcionalidad biológica en:

- Citocinas mediadoras de la respuesta inmune innata: secretadas en respuesta a agentes infecciosos capaces de activar fagocitos mononucleares y se activan por procesos inflamatorios.

- Citocinas reguladoras de la activación, crecimiento y diferenciación linfocitaria, producidas por la respuesta inmune específica: ejercen acción reguladora sobre el crecimiento y diferenciación de los linfocitos mediadores de las fases de activación de la respuesta específica, tanto inmune celular como humoral.

- Citocinas reguladoras de la respuesta efectora e inflamatoria producida como consecuencia de una respuesta inmune específica: derivan fundamentalmente de los linfocitos T (LT) CD4⁺ y CD8⁺ y activan mecanismos efectores no específicos. Juegan un rol importante en la fase efectora mediada por células.

- Citocinas que actúan como factores estimuladores de la hematopoyesis y del crecimiento y diferenciación de los leucocitos inmaduros⁶

Diversas citocinas (interleucinas) son mediadores de la periodontitis crónica y su participación en este proceso es importante debido a su acción estimuladora en diversos grupos celulares, lo cual da como resultado la degeneración del tejido

parodontal, algunas citocinas regulan este proceso ejerciendo dado que tienen funciones anti-inflamatorias.

Citocinas pro-inflamatorias.

La interleucina uno (IL-1) es la principal interleucina inflamatoria en la periodontitis crónica, desencadena la fase aguda del proceso inflamatorio y aumenta la permeabilidad vascular⁶. El receptor de IL-1 (IL-1R) pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas (Igs) y se presenta en 2 tipos:

Tipo I.- Se expresa en LT, fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales, condrocitos y hepatocitos.

Tipo II.- Se expresa en linfocitos B (LB) y en células polimorfonucleares (PMN)^{26,32, 40,44}.

La interleucina seis (IL-6) se produce en las células endoteliales, vasculares, los fibroblastos, los linfocitos T activados en respuesta de IL-1 y al factor de necrosis tumoral alpha (TNF- α) un factor de diferenciación y crecimiento para los linfocitos B. La IL-6 es una proteína monómerica, inhibida por IL-4 e IL-13. El receptor de IL-6 (IL-6R) está formado por 2 cadenas de glicoproteínas de la familia de las inmunoglobulinas. Este receptor se asocia a la familia de cinasas JAK-STAT y activa las vías de señalización de RAS y MAPK^{3, 9, 16, 26}.

La interleucina ocho (IL-8) es una citocina pro-inflamatoria, de bajo peso molecular, Producida por fagocitos mononucleares, linfocitos T activados, neutrófilos, eosinófilos, fibroblastos, células endoteliales, queratinocitos, condrocitos, y células natural killer (NK).

Induce la expresión de las ICAM (Moléculas de adhesión intercelular)⁵⁰, actúa como factor quimiotáctico para los neutrófilos, disminuye la actividad de los basófilos y de los linfocitos^{5,6, 36-40}.

El factor de necrosis tumoral alpha (TNF- α) es una citocina pro-inflamatoria y pleiotrópica. Se produce como respuesta a infecciones bacterianas gram-negativas, en los macrófagos activados, células NK, linfocitos, y células endoteliales

Estimula a los fagocitos mononucleares para producir IL-1, IL-6 y al propio TNF- α . Activa el proceso de coagulación^{6, 47-49}.

Citocinas anti-inflamatorias.

La interleucina diez (IL10). Inhibe la síntesis de citocinas producidas por los linfocitos T cooperadores de tipo 2, macrófagos y queratinocitos⁶.

Inhibe la actividad de los macrófagos, la producción de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6, IL-12 interferón gama (IFN- γ)), moléculas de adhesión⁴¹⁻⁴⁵. Aumenta la actividad de citotoxicidad dependiente de anticuerpos por macrófagos, modula la síntesis de óxido nítrico (NO)^{16,32-35}.

Las citocinas IL-1, IL-6, IL8 y TNF- α son moléculas importantes en la periodontitis crónica, actúan de manera coordinada para llevar a cabo el proceso inflamatorio en el periodonto. Además de las citocinas pro-inflamatorias, el estrés oxidativo también genera daño a la integridad celular del tejido^{9, 16, 32, 38}.

III.3 ESTRÉS OXIDATIVO

Los radicales libres se forman en el organismo en condiciones normales son especies moleculares muy reactivas con un electrón desapareado. Poseen un tiempo de vida media muy corto (del orden de 10^{-9} – 10^{-12} s). El único modo en el cual se puede desactivar un radical libre y así poner fin a esta reacción en cadena, es si dos radicales reaccionan juntos, para que dos electrones no apareados puedan formar un par en una u otra de las moléculas originales⁵¹⁻⁵⁴.

Los radicales más perjudiciales en sistemas biológicos son los radicales de oxígeno a veces denominados especies reactivas del oxígeno (ERO), en especial

el anión superóxido, hidroxilo, y perhidroxilo^{47,54}. El daño de tejido causado por radicales de oxígeno suele llamarse daño oxidativo⁵²

El estrés oxidativo es la disrupción en la señalización redox y su control^{52, 54}. Las diferentes ERO's producidas en el cuerpo, son productos del metabolismo aeróbico celular, subsecuente estrés y exposición a luz UV o Rayos X. La interacción de los oxidantes con fosfolípidos, proteínas y ácidos nucleicos, causan disfunciones celulares y consecuentemente la muerte celular^{55- 58}

Este daño irreversible se acumula con el tiempo resultando en una pérdida gradual de la capacidad funcional de la célula^{55- 59} (Fig. II.6)

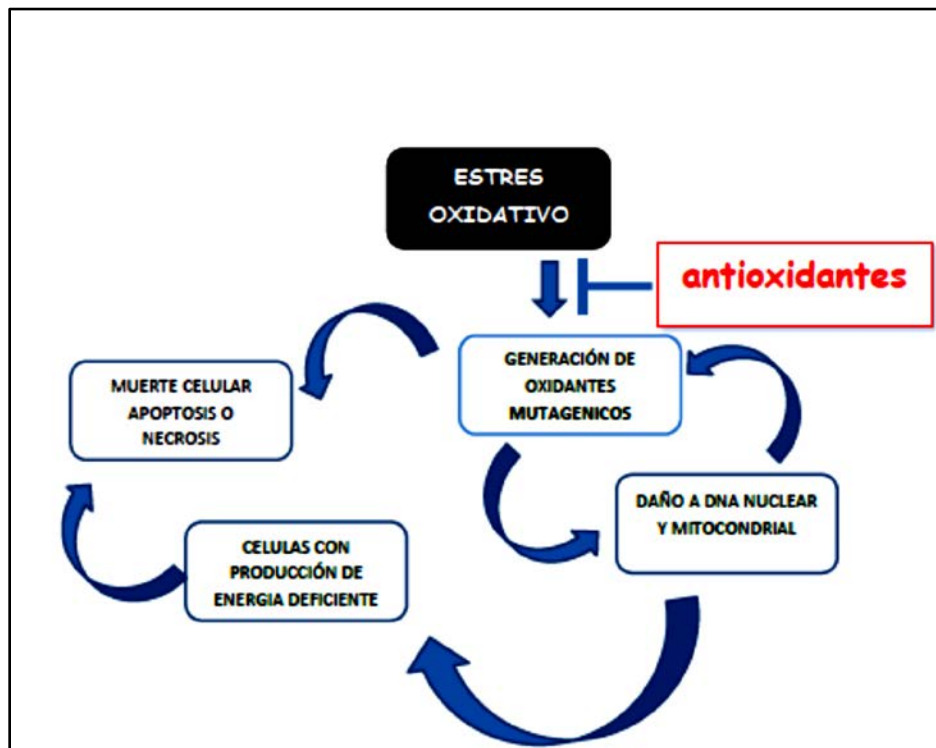


Figura 6. Ciclo de daño por ERO. Modificado de Koningsberg FM,2008.⁵⁹ El estrés oxidativo en presencia de antioxidantes las especies reactivas(ER) son estabilizadas, sin embargo si esto no ocurre, se da la generación de ER que causan mutaciones al dañar el DNA nuclear y mitocondria (DNAn, DNAm), esto provoca a su vez que más generación de ER, el daño a DNAn y DNAm podría generar celular con deficiencia metabólica ineficiente o provocar la apoptosis o necrosis celular

El cuerpo humano tiene mecanismos para regular el estrés oxidativo por producción de antioxidantes. Las especies reactivas intervienen en el proceso de transducción de señales en la célula^{59,60}; como la regulación de citocinas, proliferación y supervivencia, homeostasis y regulación de los genes antioxidantes (Ref-1 y Nrf-2)⁵⁶⁻⁶³.

III.3.1 Lípidos

III.3.1.1 Peroxidación lipídica

El daño a lípidos genera peroxidación lipídica, este proceso se da cuando los radicales libres capturan electrones de los lípidos en las membranas celulares. En la mayoría de los casos afecta los ácidos grasos poliinsaturados, debido a que contienen múltiples dobles enlaces entre los cuales se encuentran los grupos metileno (-CH₂-)⁵¹⁻⁵⁴.

a) Mecanismo de la peroxidación lipídica.

El mecanismo de peroxidación lipídica, consiste de tres pasos fundamentales la iniciación, la propagación y la terminación (Fig.7).

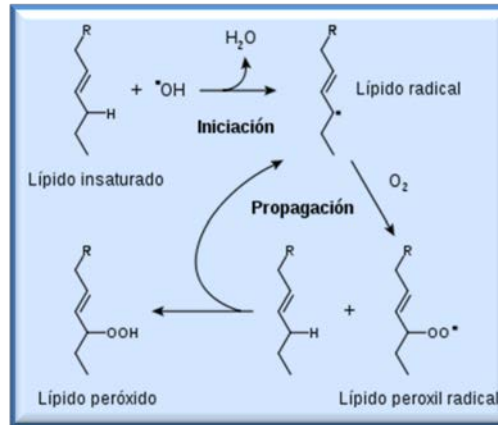


Figura 7. Reacción de peroxidación lipídica. Modificado de Marnet LJ 1999⁵¹

En la iniciación se produce el radical de ácido graso. Los iniciadores en las células vivas más notables son las especies reactivas del oxígeno, hidroxilo (OH), el cual se combina con un hidrógeno para formar una molécula de agua y un ácido graso radical^{51,59}.

En la propagación el ácido graso radical reacciona rápidamente con oxígeno molecular y genera un ácido graso peroxil radical, es una especie muy inestable-que reacciona con otro ácido graso dando lugar a un ácido graso radical diferente y a un peróxido lípido o un peróxido cíclico si ha reaccionado consigo mismo. Este ciclo continúa ya que el nuevo ácido graso radical se comporta de la misma manera lo que genera una reacción en cadena^{51,59}.

En la terminación la reacción radical se detiene cuando dos radicales reaccionan y producen una especie no radical. Esto ocurre solamente cuando la concentración de especies radicales es lo suficientemente alta como para que exista la probabilidad de que se encuentren dos radicales. Sin embargo, los seres vivos han desarrollado diferentes moléculas que aceleran el proceso de terminación, atrapan a los radicales libres y protegen la membrana celular. Estos antioxidantes incluyen a la vitamina E y las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa y peroxidasa^{51, 52, 63}.

Cuando la reacción no termina rápido, se produce daño en los lípidos de la membrana celular y se forman los peróxidos de lípidos y dialdehídos muy

reactivos que pueden modificar químicamente a las proteínas y a las bases de ácidos nucleicos. Por ejemplo el producto final malondialdehído (MDA) reacciona con ácidos nucleicos del ADN, formando aductos de ADN durante el ciclo celular^{61,64}. Para evaluar la peroxidación de lípidos se cuantifica el malondialdehído (MDA), el ensayo más comúnmente utilizado es llamado TBARS^{9, 53,64}.

II.3.2 Proteínas y carbohidratos

Las proteínas también se oxidan por interacción con los radicales libres. El daño oxidativo de residuos de tirosina en proteínas puede generar radicales de oxígeno^{53, 65, 66}.

La modificación química de los aminoácidos, sea por acción directa de radical o como resultado de la reacción con los productos de peroxidación de lípidos inducida por radical, genera que el sistema inmune reconozca a esas proteínas como extrañas y sintetice anticuerpos que tienen reacción cruzada con proteínas hísticas normales, de manera que inicia enfermedad autoinmune^{.54,55}.

II.3.3 DNA

La interacción de radicales libres con bases en el DNA generan cambios químicos que, si no se reparan de manera eficiente, se heredan a las células hijas. El daño al DNA en las células de la línea germinal en los ovarios y los testículos origina mutaciones que se heredan, en las células somáticas el resultado puede ser el inicio de cáncer. Los dialdehídos que se forman como resultado de peroxidación lipídica también pueden modificar bases en el DNA^{53, 61}.

II.3.4 Antioxidantes

Los antioxidantes (Aox) son moléculas que retardan o evitan la oxidación de las biomoléculas, actúan al reaccionar con los radicales libres al inhibir las cadenas de oxidación, por lo que se considera que los Aox son agentes reductores.

Los Aox se clasifican en endógenos y exógenos, los antioxidantes exógenos provienen de la dieta e incluyen a las vitaminas E, C y los carotenoides. La vitamina C constituye el antioxidante hidrosoluble más abundante en la sangre y en la saliva, mientras que la vitamina E es el antioxidante lipofílico mayoritario. El selenio, actúa junto con la vitamina E como antioxidante. Los carotenoides son compuestos como los betacarotenos, los alfacarotenos, los licopenos, las luteínas y xantinas⁶⁵⁻⁶⁸ (Fig.8).



Figura No 8. Clasificación de antioxidantes.

La forma de suplir los antioxidantes para proteger al organismo del efecto oxidativo de los radicales libres es el consumo de alimentos ricos en vitamina E, vitamina C, carotenoide, cumarinas⁶⁷⁻⁷² y otras sustancias que tienen función antioxidante, tales como los compuestos fenólicos⁵⁹.

II.3.5 Daño por estrés oxidativo y enfermedades crónicas no transmisibles

Los radicales libres están implicados en patologías severas humanas incluyendo el cáncer, aterosclerosis, artritis reumatoide y enfermedades neurodegenerativas. El estrés oxidativo mitocondrial está implicado en el envejecimiento⁷², en la neurodegeneración que se presenta en la enfermedad de Alzheimer con la producción del péptido de 42 aa β -amiloide, en la enfermedad de Parkinson con los depósitos de α - nucleína componente de los cuerpos de Levy, con los desórdenes de las poliglutaminas en la Enfermedad de Huntington; dentro de las patologías endócrinas se ha encontrado asociación en la Diabetes mellitus⁹; en enfermedades cardiovasculares como son hipertensión arterial⁷³, Cardiopatía isquémica⁷⁴, Infarto agudo al miocardio así como la lesión isquémica/ reperfusión; cáncer^{57,58}, en distintos órganos como en el ojo la degeneración macular⁶⁰; relacionadas con la edad⁶² y el daño por radicales libres⁷⁵.

La oxidación contribuye a los procesos patológicos del envejecimiento como las enfermedades bucales, cardiovasculares, pulmonares, endócrina, neurodegenerativas y el cáncer^{75,76}.

En la cavidad bucal el estrés oxidativo se presenta en diversas patologías bucales como pulpitis, estomatitis aftosa recurrente, mucositis, leucoplasia bucal, síndrome de ardor bucal así como enfermedad periodontal específicamente periodontitis crónica⁷⁶.

II.3.6 Estrés oxidativo asociado a enfermedad periodontal

Existe una relación mayor entre el daño oxidativo y las fases más avanzadas de la enfermedad periodontal, ya que aumentan las especies reactivas del oxígeno. Las

ERO's generan un daño oxidativo al tejido gingival, al ligamento periodontal y al hueso alveolar en pacientes con enfermedad periodontal⁷⁶⁻⁷⁹ La periodontitis crónica es una enfermedad infecciosa resultado de la interacción del proceso infeccioso y la respuesta inmune del huésped. Los neutrófilos diversos productos tóxicos en el sitio de la infección como ERO's.

Las concentraciones bajas de ERO's estimulan el crecimiento de los fibroblastos gingivales y de las células epiteliales, pero en altas concentraciones inducen daño tisular. El desbalance entre ERO's y antioxidantes inicia la enfermedad periodontal, y al continuar la producción de ERO's de manera progresiva, se induce la destrucción de la estructura periodontal, hueso alveolar y tejido conectivo⁷⁷⁻⁸⁰.

La destrucción a los tejidos periodontales es progresiva y crónica, diversos tratamientos sistémicos y locales se utilizan en la práctica odontológica con distintos tiempos de tratamiento desde un mes hasta seis meses en base a la evolución del estado periodontal¹⁶, entre los cuales se aplican diversas sustancias de origen vegetación^{81,82}. De tal manera que a continuación se presenta la revisión sobre la especie vegetal *Tagetes lucida* Cav., la cual modifica diferentes marcadores de estrés oxidativo e inflamación⁸³⁻⁸⁶

III.4 *Tagetes lucida* Cav.

Tagetes lucida Cav., es una especie vegetal que contiene diversos compuestos con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas⁸⁷⁻¹⁰¹.

Es una planta herbácea de la Familia *Asteracea*, endémica y nativa de México. Se localiza en la mayoría del territorio nacional hasta Centroamérica. Su hábitat es ruderal y de pastizal, aproximadamente



Figura 9. Floración de *Tagetes lucida* Cav. Tomado de monografía botánica de *Tagetes lucida*. CONABIO

mide 80 cm, su ciclo de vida es perenne, se propaga y dispersa por semilla.⁸⁷⁻⁹¹
(Fig. 9)

II.4.1 Composición química de *Tagetes lucida* Cav.

Contiene: grasa, 3 resinas ácidas, clorofila, caucho, ácido gálico, tanino, glucosa, dextrina, materias pécticas, alcaloide, leñosa, sales minerales (Fe, Cu, Zn, Ca, and Mg).⁹¹⁻⁹⁷ En los extractos metanólicos de *Tagetes lucida* se han identificados diferentes metabolitos secundarios como flavonoides, glucósidos y ácidos fenólicos, tales como ácido ferulico, ácido rosmarinico, naringina⁹⁴, pauletin, isorhamnetin, quercetagenini 3-O-arabisonil galactósido y isorhamnetin 7-O-glucósido, quercetagenini (3,4-dimetil éter 7-O-β-D-glucopiranosido) (efectos antioxidantes), el ácido 3-(2-O-β-D-glucopiranosido-4-metoxifenil) propanoico y su metiléster. En hojas y tallos se ha reportado la presencia de: estragol (97.1 %) (efecto antiinflamatorio)⁸⁸, mirceno⁸⁹ (1.8 %), (E)-β-ocimeno (0.2 %), linalol^{69,87,90} (0.2 %), germacreno D (0.2 %). En las flores: estragol (95.4 %), mirceno (1.2 %), (E)-β-ocimeno (0.2 %), linalool (0.2%), germacreno D (0.5 %), 5-metil-5-(3-buten-1-inil)-2,2-bitienil (0.1 %), 5-(3-penten-1-inil)-2,2-bitienil (0.8 %), 7,8-dihidroxi-6-metoxicumarina, el 7,8- dihidroxycumarina y el esculetina, i.e. 6,7-dihidroxycumarina (efectos antimicrobianos).⁹⁸⁻¹⁰⁵

II.4.2 Antecedentes etnofarmacológicos de *Tagetes lucida* Cav.

T. lucida ha sido utilizada desde el horizonte clásico por la medicina tradicional mexicana en té para dolores pélvicos, infecciones genito –urinarias, hematomas, dermatitis por contacto, diarrea, disentería, controlar el vómito, el reumatismo, el asma, la tifoidea, las varices y el resfriado, así como para numerosas enfermedades gastrointestinales, como tónico, antiespasmódico, antiinflamatorio y antihelmíntico^{87,94,98,102,103}, incluyendo algunas enfermedades culturales¹⁰⁶.

II.4.3 Antecedentes de la investigación farmacológica de *Tagetes lucida* Cav.

Esta especie vegetal ha sido de interés científico por lo que investigadores han realizado estudios en diferentes ámbitos como a continuación se describe.

Tagetes lucida Cav. es una especie vegetal sus usos tradicionales, provocaron el interés por el estudio de su composición química por lo que ha sido investigada por varios autores. En esta especie vegetal se reportó un significativo comportamiento antioxidante, así como la acción anti-inflamatoria por inhibir la síntesis de óxido nítrico y la producción de prostaglandina E₂⁹⁴. Bonilla, et al., (2015), reportan que al realizar pruebas por HPLC en el extracto acuoso de *Tagetes lucida* (4 mg/ml) se encontró que esta contenía una concentración de quercetina de 7.72 mg/g.⁹⁵; Cespedes, et al., (2006), reportaron la presencia de 7 cumarinas: concluyendo en base a su composición química esta planta tenía actividad antifúngica y antibacteriana⁹⁹; Aquino, et al., (2002), encontraron que el extracto metanólico de *Tagetes lucida* y sus constituyentes fenólicos tenían efectos antioxidantes¹⁰⁰. Laferriere, et al. (1991), determinó entre otros datos que *Tagetes lucida* Cav. contiene minerales¹⁰¹. Los extractos de *T. lucida* Cav. presentan un significativo estabilizante de radicales libres comparado con el tocoferol¹⁷. De igual manera diversos estudios reportaron efectos antidepresivos⁸⁻¹⁰, actividad anti-inflamatoria, dada por inhibición del óxido nítrico y producción de prostanglandinas E₂¹⁵. Y finalmente, Héthelyi E, et al., (1987), identificaron diferentes compuestos en el aceite esencial de *Tagetes lucida* Cav.⁹³.

Sin embargo, hasta el momento no sea reportado su efecto en patologías bucales como la periodontitis crónica, la cual es una enfermedad de carácter infeccioso e inflamatorio asociada al estrés oxidativo

El utilizar *Tagetes lucida* Cav. en periodontitis crónica se basa en que en su etiopatogenia intervienen procesos infecciosos que provocan inflamación, el proceso infeccioso es combatido por los oxidantes. Sin embargo, la edad del individuo no permite que los sistemas antioxidantes tengan la misma eficacia. *Tagetes lucida* Cav. contiene compuestos con efecto antiinflamatorio⁹⁴ que podrían inhibir la inflamación de la periodontitis crónica. Los antioxidantes reportados^{93, 94, 100} de *T. lucida* podrían disminuir daño causado por las ERO's y el de la respuesta inflamatoria en la periodontitis crónica.

Diversas especies vegetales han sido estudiadas en su efecto en la periodontitis crónica en sus diversos marcadores clínicos y marcadores biológicos por lo que se realizó una revisión sistemática de los estudios reportados

A continuación se presenta una revisión sistemática de las investigaciones en diferentes especies vegetales utilizadas en el tratamiento de la periodontitis (Cuadro 1).

Cuadro 1. Revisión sistemática de investigaciones de especies vegetales utilizadas en el tratamiento de la periodontitis crónica

Autor	Tipo de estudio	Modelo experimental/muestra/ método de inducción	Variables	Tratamiento / Especie vegetal	Técnica	Hallazgos
Oliveira et al. 2016 ⁷⁷	Longitudinal	Ratas Sprague-Dawley Hueso Ligadura	Expresión de proteínas (RAP. RANKL, fosfatasa alcalina), mRNA(IL-1 β , TNF- α , IL-6, RANKL, fosfatasa alcalina)	Aguacate/ frijol de soya (ASU) durante 7 días	Histomorfometría,/ inmunohistoquímica, qPCR, Micro-CT	Se presentó un alto porcentaje de llenado óseo en el área de furcación y una alta expresión de fosfatasa alcalina, con niveles bajos de expresión de mRNA de RANKL; después del tratamiento de 7 días de raspado y alisado radicular coadyuvado con el tratamiento de ASU vs el grupo de raspado y alisado radicular.
Sulistyani et al. 2016 ¹⁰	Longitudinal	Cel. KB / <i>P. gingivalis</i>	Análisis de IL-6 e IL-8, morfología bacteriana	Extracto de <i>Roselle calyx</i>	ELISA, Microscopía electrónica de barrido	Inhibición de expresión de IL-6 e IL-8, se presentaron alteraciones morfológicas en cel. KB. De igual manera se presentaron cambios morfológicos en <i>S. mutans</i> y <i>P. gingivalis</i> ($p < 0.05$)
Hrishi et al. 2016 ¹¹⁰	Longitudinal Aleatorizado	Humanos (n= 30) Dx. Periodontitis crónica moderada	Parámetros clínicos de periodontitis crónica moderada, marcadores de estrés oxidativo	<i>Cammelia sinensis</i> (dentífrico con extracto herbal) 4 semanas de uso con modificación de técnica de cepillado y tratamiento periodontal no quirúrgico	IG, IPDB, NCI, ABTS	El grupo que utilizó el dentífrico disminuyó de manera significativa ($p < 0.05$) en IG, IPDB, CAT; aumentó la AFGC
Hosadurga	Longitudinal	Ratas Wistar	Análisis de IG,	Tulsi V. T. 9(Análisis	El gel de tulsi al 2% presentó

EFFECTIVIDAD DE *Tagetes lucida* SOBRE INTERLEUCINAS PROINFLAMATORIAS Y ESTRÉS OXIDATIVO EN ADULTOS MAYORES CON PERIODONTITIS

et al. 2015 ¹¹²		Ligadura seda /9 días	profundidad de bolsa parodontal, edema, inflamación gingival, Cambios morfométricos evaluando 6 sitios (mesiobucal, mediobucal, mediopalatino, disto bucal, mesiopalatino, distopalatino)	extracto de <i>Ocimum sanctum</i>)	morfométrico por esteromicroscopía y software de imagen.	inhibición de edema después de 24 h, cambios significativos en el IG bolsa parodontal. El análisis morfométrico no presentó diferencias significativas; El extracto no presentó efectos tóxicos hasta 2000mg/ kg V.O.
Yang et al. 2014 ¹¹³	Longitudinal	Ratas Wistar Infección por <i>P. gingivalis</i> Ligadura/28 días	Pérdida de cresta alveolar	Bu-Shen- Gu- Chi- Wan (Jiu ZhiTang Pharmaceutical, mezcla herbal de <i>Rhizoma drynariae</i> y <i>Rehmannia glutinosa</i>)	Tomografía microcomputarizada	Mejora en la densidad mineral de hueso, reducción de los niveles de IL-1 β , TNF- α ; así como del infiltrado celular inflamatorio en los tejidos periodontales.
Hosadurga et al. 2014 ¹¹⁴	Longitudinal	Ratas Wistar Ligadura de seda/ 28 días V.T.	Pérdida de cresta alveolar	<i>Curcuma longa</i> (Gel de Curcumina) V.T.	Estereomicroscopía y software de imagen	No se encontró reducción de cresta alveolar, sin embargo si se observó actividad antiinflamatoria al disminuir el 48.98% del edema y el pico de actividad fue a las 24 h de aplicar el tratamiento, así mismo se redujo el IG y la profundidad de la bolsa (p<0.05). No presentaron efectos tóxicos al tratamiento en la administración V.O. de 2000 mg/kg de curcumina.
Moradi et al. 2014 ¹¹⁶	Longitudinal	Ratas Wistar Infección por <i>E. coli</i> (LPS) 10	Niveles de IL-1 β y TNF- α	Trans -anethole(Compuesto activo de <i>Pimpinella anisum</i> , <i>Illicium verum</i> , <i>Anethum</i>	ELISA	Redujeron los niveles séricos de IL-1 β e TNF- α

EFFECTIVIDAD DE *Tagetes lucida* SOBRE INTERLEUCINAS PROINFLAMATORIAS Y ESTRÉS OXIDATIVO EN ADULTOS MAYORES CON PERIODONTITIS

		días V. IP Tejido gingival palatino		<i>foeniculum</i>) (10 a 50 mg/kg)		
Elburki et al. 2014 ¹¹⁷	Longitudinal	Ratas Wistar Infección por <i>E. coli</i> (LPS) 14 días V.IG Tejido gingival, sangre, maxila.	Pérdida de cresta alveolar y niveles de citocinas inflamatorias	<i>Curcuma spp.</i> (Curcumina modificada)	ELISA, Western Blot, Estereomicroscopia y software de imagen, tomografía microcomputarizada	Reducción de niveles séricos de IL-1 β de cresta alveolar
Naiktari et al. 2014 ¹¹⁸	Clínico, doble ciego, multicentrico	Humanos V.T.	Parámetros clínicos de periodontitis crónica	Triphala (Enjuague bucal mezcla herbal del extracto al 10% <i>Terminalia chebula</i> , <i>Terminalia bellirica</i> , <i>Euphrasia officinalis</i>) durante 15 días.	Índice de PDB e Índice gingival	La eficacia entre Triphala y la clorexhidina al 2% no mostraron diferencias significativas (p>0.5), sin embargo en el IG e IPDB mostraron diferencias significativas (p<0.05)
Yaghini et al, 2014 ¹¹⁹	Clínico, doble ciego, aleatorizado	Humanos V.T	Parámetros de periodontitis crónica	<i>Quercus brantii</i> y <i>Coriantum sativum</i> (Gel) Aplicación subgingival después de tratamiento no quirúrgico/ 1 y 3 meses	IP, IG, NCI, Medición de bolsa parodontal.	El grupo que utilizó el gel disminuyó significativamente (p<0.05), sin embargo no hubo diferencias significativas entre grupos (p>0.05)
Aslani et al. 2013 ¹²¹	Longitudinal	<i>P. gingivalis</i>	Actividad antibacterial	Extracto semisólido de <i>Q. brantii</i> (Gel mucoadhesivo)	Método de disco de difusión en agar suplementado brucella,	Inhibición significativa (p<0.05) de crecimiento de <i>P. gingivalis</i> .
Prasetyo et al. 2013 ¹²²	Longitudinal	Ratas Wistar	Análisis de IL-6,	Extracto etanólico de la cascara de <i>Citrus aurantifolia</i>	Inmunohistoquímica	La diferentes dosis del tratamiento con <i>C. aurantifolia</i> , no presentaron diferencias

EFFECTIVIDAD DE *Tagetes lucida* SOBRE INTERLEUCINAS PROINFLAMATORIAS Y ESTRÉS OXIDATIVO EN ADULTOS MAYORES CON PERIODONTITIS

		Tejido gingival Por infección de <i>A. actynomicetecómitans</i>		(1.26mg/100g, 2.51mg/100g, 5.04g/100g), V.IP		estadísticas entre grupos, la disminución de la expresión de IL-6 se presentó en estos grupos de manera significativa (p<0.05) vs el grupo control
Tu et al. 2013 ¹²³	Longitudinal	Ratas Wistar <i>Ligadura nylon /8 días</i> <i>Tejido periodontal</i>	Pérdida de cresta alveolar	Berberine (<i>Rhizoma coptidis</i> , <i>Hydrastis canadenses</i> and <i>Cortex phellodendri</i>)	Tomografía microcomputarizada	Reducción en la pérdida alveolar de la cresta ósea.
Zhou et al. 2013 ¹²⁴	Longitudinal	Ratas Wistar <i>Ligadura nylon /30 días</i> <i>Tejido periodontal</i>	Citocinas inflamatorias, pérdida de cresta alveolar	<i>Curcuma longa</i> (Curcumin Sigma – Aldrich Co.) V. IG	Inmunohistoquímica, histología, morfología	Reducción de la expresión de TNF-α en tejido gingival. Reducción de la pérdida alveolar de cresta ósea.
Polak et al. 2013 ¹²⁷	Longitudinal	Ratones BALB/c Infección por <i>P. gingivalis</i> and <i>F. nucleatum</i> /42 días V.O.	Concentración <i>in vivo</i> de citocinas proinflamatorias	Extracto acuoso constituido por <i>Vaccinium macrocarpon</i> alto peso molecular (material no-dializable (NDM))	Ensayo de coagregación, Macrófagos RAW	Reducción en los niveles de TNF-α <i>in vivo</i> , eliminó la expresión de TNF-α por los macrófagos, además el tratamiento con NDM, incrementó la fagocitosis de <i>P. gingivalis in vitro</i> .
Cho et al. 2013 ¹²⁸	Longitudinal	Ratas Wistar <i>Ligadura nylon/ 7,14 y 28 días</i>	Concentración de citocinas inflamatorias, actividad osteoclástica	Catequina (Extracto de <i>Cammelia sinensis</i>)	Análisis histomorfométrico e Histología, fosfatasa ácida resultante a tartrate	Después de 4 semanas, se redujeron los niveles de IL-6, TNF-α y disminuyó la actividad y el número de osteoclastos.

					inmunohistoquímica	
Pimentel et al. 2012 ¹³¹	Longitudinal	Ratas Wistar Ligadura algodón/ 11 días V. T.	Niveles de IL-1 β e IL-10, Frecuencia de <i>P. gingivalis</i> y <i>A. actinomycetemcomitans</i> , Pérdida de cresta alveolar	Aceite esencial de <i>Cordia verbenácea</i> (5mg/Kg)	Análisis morfológico y pérdida de hueso, ELISA, PCR	Redujo la frecuencia de <i>P. gingivalis</i> y <i>A. actinomycetemcomitans</i> , redujo la pérdida de cresta alveolar, así mismo incrementó los niveles de IL-10

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La periodontitis crónica es una patología infecciosa inflamatoria degenerativa bucal que lesiona al tejido periodontal produciendo bolsas parodontales, migración gingival, pérdida de inserción y de hueso alveolar; esta patología bucal afecta al 70% de la población mexicana, lo que provoca detrimento de la autoestima, mala nutrición y por ende afectación sistémica por lo que aumenta la morti-morbilidad del adulto mayor que ya de por sí, se ve afectado por los cambios del proceso de envejecimiento. Con base en las premisas anteriores la periodontitis crónica es un problema de salud pública, que debe atenderse de ahí que *Tagetes lucida Cav.* se presenta como una alternativa para coadyuvar al tratamiento de la periodontitis crónica a nivel clínico y en el equilibrio óxido reducción, debido a que contiene antecedentes antiinflamatorios y antioxidantes, los cuales que podrían mejorar los valores de los parámetros clínicos, las concentraciones de citocinas IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 y TNF- α , así como modificar los niveles del estrés oxidante a través de la lipoperoxidación, antioxidantes totales y actividad de la superóxido dismutasa, en la periodontitis crónica

De ahí que nos planteamos la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuál será la efectividad del extracto de *Tagetes lucida Cav.* en forma de colutorio, sobre los parámetros clínicos de periodontitis crónica, marcadores de inflamación, y los marcadores de estrés oxidativo en pacientes adultos mayores con diagnóstico de periodontitis crónica después de tres meses de tratamiento?

V. HIPOTESIS

La periodontitis crónica es un proceso infeccioso inflamatorio crónico, asociado al estrés oxidativo, considerada una enfermedad con alta prevalencia en la población adulta mayor y de gran importancia epidemiológica. Por otro lado, se han estudiado algunos tratamientos de origen vegetal que pueden por su composición química tener acción antiinflamatoria y antioxidante, como es el caso de la especie vegetal de *Tagetes lucida* Cav.

Por lo que suponemos que el tratamiento de ésta especie en forma de un colutorio mejorará significativamente los parámetros clínicos de la periodontitis crónica, marcadores de inflamación y marcadores de estrés oxidativo en adultos mayores con periodontitis crónica, después de tres meses de tratamiento.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

VI.1 Población y Diseño

Se realizó un estudio cuasi experimental, longitudinal, prolectivo, comparado, doble ciego aleatorizado; previo consentimiento informado (Anexo 1), con 90 adultos mayores, de la zona oriente de la Ciudad de México (Delegación Iztapalapa), con enfermedades crónico no transmisibles controladas, sin consumo de suplementos antioxidantes en los últimos 6 meses, todos con diagnóstico de periodontitis crónica de acuerdo a los Criterios de Carranza, FA¹⁶, que no estuviesen bajo tratamiento parodontal y que no utilizarán algún auxiliar complementario para la limpieza bucal. Se conformaron dos grupos por aleatorización simple con calculadora; la relación 2:1 de la muestra fue aplicada para tratar de diluir el efecto placebo (somático y mecánico):

- A) Grupo placebo con 30 adultos mayores, de ambos sexos, con un promedio de edad de 66.2 ± 6.1 años.
- B) Grupo Tratamiento con 60 adultos mayores, de ambos sexos, con un promedio de edad de 68.0 ± 6.5 años.

La intervención realizada en dos grupos (placebo y tratamiento), fue con base a la metodología reportada por Hrish, et al; 2016; Hosadurga, et al. 2015; Yang, et al. 2014; Hosadurga, et al. 2014; Chavez, 2010; en los cuales se utilizaron placebo o control negativo y no se utilizó un control positivo¹¹⁰⁻¹¹⁴.

Al grupo tratamiento se le proporcionó el enjuague bucal con el extracto de *Tagetes lucida Cav.* y el grupo control recibió un placebo de enjuague bucal; los cuales utilizaron por 3 meses, para posteriormente realizar nuevamente la evaluación clínica y de los marcadores El tiempo de tres meses de tratamiento fue determinado en base a los tiempos de tratamiento periodontal convencional no quirúrgico aplicados (de un mes a seis meses) en periodontitis crónica¹⁶.

A todos los pacientes se les practicó una evaluación clínica odontológica bajo la norma NOM-004 de expediente clínico de la Ley general de Salud (Anexo 2 y 3) pre y post- intervención, se realizó un diagnóstico parodontal, además de la evaluación de los marcadores de estrés oxidativo y marcadores de inflamación en muestras de saliva.

VI.2 Variables

Variable independiente

- Tratamiento:
 - Grupo Control: Uso de agua purificada con alcohol absoluto (10%), 3 veces al día por 3 meses (5 mL cada 8 h)
 - Grupo Tratamiento: Uso de enjuague bucal a base del extracto de *Tagetes lucida* Cav. (10%), 3 veces al día por 3 meses (5 mL cada 8 h)

Variables dependientes

- Marcadores de estrés oxidativo: lipoperóxidos (LPO), Antioxidantes totales (ATT) y superóxido dismutasa (SOD)
- Marcadores de inflamación: IL-1, IL-6, IL8, IL-10, IL-12 y TNF- α .

VI.3 Técnicas e Intervención

Para elaborar el colutorio a base de *Tagetes lucida* Cav. se extrajo e identificó la planta, para lo cual se utilizó la técnica de prensado y etiquetado¹³² y técnica de extracción¹³³. El ejemplar de *Tagetes lucida* Cav- montado fue ingresado a la colección botánica del herbario de la FES ZARAGOZA – UNAM con el número de colección 156999 bajo la supervisión y certificación del Dr. Eloy Solano responsable del herbario (Anexo 4 y 5), además se aplicaron al extracto técnicas analíticas instrumentales de cromatografía líquida por HPLC-DAD⁹⁴, realizada en el laboratorio de etnofarmacología de la Facultad de Ciencias/UNAM. (Anexo 6)

Para realizar los procedimientos clínicos, se limpió cuidadosamente con algodón la cavidad bucal de todo material como restos alimenticios o pus. Se tomaron consideraciones de bioseguridad para trabajar con material de origen humano susceptible de estar infectado.¹³⁵⁻¹³⁶ Se procedió a realizar el diagnóstico clínico parodontal antes y después del tratamiento^{16,137-139}.

Se recolectaron muestras de saliva de ambos grupos en tubos de polipropileno de 15 mL, se centrifugaron a 3000 rpm por 10 min y se guardaron en alícuotas de 400µL en tubos de 1.5 mL congeladas a -80°C hasta su análisis.

Una vez obtenida la muestra basal, se le dio al paciente un frasco de 250 mL con el colutorio o la presentación sin activo según su programa de intervención; el cual se administró vía oral 3 veces al día (5 mL cada 8 h) por 15 días, al término se sustituyó el frasco ya terminado por uno nuevo con la solución, según el programa de intervención al que estuvieran adscritos por 3 meses.

VI.4 Evaluación Clínica

Para determinar los parámetros clínicos de la periodontitis crónica se llevó a cabo la evaluación clínica en 2 momentos: pre intervención y post-intervención (después de 3 meses de tratamiento con el colutorio de *T. lucida*)

VI.4.1 Evaluación de la profundidad de sondaje:

Técnica de sondaje periodontal

Se evaluó la profundidad de sondaje de todas los órganos dentarios presentes en el individuo, utilizando una sonda parodontal. El instrumento se insertó en el surco con una fuerza de 0.75 N, paralelo al eje longitudinal de la pieza dentaria; para obtener la medida desde el margen gingival hasta la base del saco de la bolsa periodontal. Esta medición se realizó en las 3 regiones vestibulares, palatina y

lingual: medio, mesial, distal; se detectó la presencia de cráteres interdetales y de lesiones de furcación^{4,16}.

VI.4.2 Evaluación del nivel de inserción clínica.

El nivel de inserción clínica se determinó entre la distancia de la base de la bolsa y la unión ameloementaria (CEJ)^{4,16}.

VI.4.3 Evaluación de presencia de hemorragia al sondaje

Se introdujo la sonda realizando lateralmente en el fondo de la bolsa, y se repitió este procedimiento después de 30 a 60 seg^{4,16}.

VI.4.4 Evaluación de presencia de movilidad dentaria

Se realizaron pruebas de movilidad dentaria con movimientos vestibulo-palatino, vestibulo-lingual, mesiodistal; considerando la presencia de movilidad fisiológica^{4,16}.

VI.4.5 Evaluación de presencia de halitosis

El operador evaluó si al momento de la anamnesis y de las citas consecutivas del seguimiento, del programa de intervención; el paciente presentaba halitosis o no^{4,16}.

VI.5 Evaluación de Marcadores de Estrés Oxidativo

-Técnicas bioquímicas

A. Métodos de cuantificación de estrés oxidativo

Cuantificación de estrés oxidativo y actividad antioxidante total.

El estrés oxidativo se cuantificó través de las técnicas de peroxidación lipídica (método de TBARS) y antioxidantes totales (Método de ABTS®) ¹⁴⁰⁻¹⁴².

1. Método TBARS

Fundamento de la técnica

Esta técnica utiliza el malondihaldehído (MDA) como marcador de lipoperoxidación mediante la reacción con ácido tiobarbitúrico (TBA), el cual forma un complejo de color rosa que se mide a 532-535 nm. La formación del complejo TBA-MDA por eliminación de oxígeno, se favorece por la adición de butiril-hidroxitolueno (BHT). El malonaldehído es el producto final de la oxidación de ácidos grasos poli-insaturados y la concentración de MDA en el medio, indica el nivel de peroxidación lipídica.

Técnica:

- A. Se marcaron tubos de vidrio, ocho para la curva estándar y 90 muestras a medir.
- B. Las muestras se descongelaron a temperatura ambiente y se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min antes de procesarlas.
- C. Se adicionaron 400 µL de muestra, se agregaron 50 µL de BHT 12.6 mM y 400 µL de ácido ortofosfórico 0.2 mol/L consecutivamente, se mezclaron y se agitaron en vórtex por 10 seg.
- D. Se adicionaron 50 µL de TBA 0.11mol/L, se mezclaron y agitaron en vórtex por 10 seg.
- E. Los tubos se taparon y se colocaron en un baño de agua a 90°C por 45 min.
- F. Los tubos se sacaron del baño y se colocaron en hielo, a cada tubo se le agregaron 1.2 mL de butanol y 100 µL de solución saturada de cloruro de sodio.
- G. Los tubos se agitaron en vórtex por 10 seg. Posteriormente se centrifugaron a 3000 rpm por 5 min.

- H. El sobrenadante se leyó contra un blanco de butanol a 535 nm y a 572 nm para hacer corrección de lectura y se calculó la delta de absorción por la diferencia de la lectura obtenida a 572 nm de lectura de 535 nm.
- I. La concentración de lipoperóxidos se calculó al interpolar con la curva
- J. estándar de patrón 1, 1, 3, 3-tetrametoxipropeno (TMP).

CURVA DE CALIBRACION: Se prepararon las siguientes soluciones:

- I. TMP 1 mM: se diluyeron 17 μ L de TMP en 100 mL de agua destilada (solución madre preparada en función del peso molecular del TMP)
- II. TMP 0.2 mM: se adicionó 1 mL de TMP 1 mM y se añadió a 4 mL de agua bidestilada (se preparó cada vez que se usó).
- III. Se prepararon ocho tubos de concentraciones crecientes (Cuadro 2)

TUBO	(TMP μ L)	H ₂ O (ml)	MDA (μ mol/L)
1	0	1.000	0
2	5	0.995	0.2
3	10	0.990	0,4
4	20	0.980	0.8
5	30	0.970	1.2
6	50	0.950	2.0
7	70	0.930	2.8
8	100	0.900	4.0

2. Método ácido 2,2'-azinobis (3etilbenzotiazolín)-6-sulfónico (ABTS)

Fundamento de la técnica:

El radical ABTS se genera a partir de su precursor el ácido 2,2'-azinobis (3etilbenzotiazolín)-6-sulfónico (ABTS). El radical catiónico obtenido es un compuesto de color verde-azulado, estable y con un espectro de absorción en el UV-visible. El punto final de la reacción lo marca la sustancia antioxidante empleada. Los radicales peróxilo y otros radicales oxidan al El ABTS oxidado por los radicales peróxilo u otros oxidantes a su forma de radical catión ABTS el cual es de color verde – azulado intenso y la capacidad antioxidante de los compuestos de prueba, se mide como

inhibición óptica complementaria a de la absorbancia (disminución del color) al reaccionar directamente con el radical ABTS. Los resultados de los compuestos a analizar se expresan en relación con equivalentes de trolox (medida de referencia para la capacidad antioxidante) utilizado como reactivo de calibración.

Determinación de la actividad antioxidante total (AAT) por el método de ABTS¹⁴¹⁻¹⁴⁴

Técnica:

Para la determinación de la actividad antioxidante total (AAT) se empleó un kit comercial (Total antioxidant status, Randox Laboratories Ltd, UK).

Procedimiento:

- 1) Se adicionaron 400 µL de muestra de saliva a cubetas especiales para el equipo automatizado Selectra Jr.

3. Método Superóxido dismutasa

Fundamento de la técnica:

Para la determinación de la actividad de SOD se empleó el kit comercial Ransod superóxido dismutasa (Randox Laboratories Ltd, UK) que se basa en el empleo de xantina y xantina oxidasa (XOD) para formar radicales superóxido. Los radicales superóxido formados reaccionan con cloruro de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolio (I.N.T.) para formar un colorante formazán rojo. Se mide la actividad de la SOD por el grado de inhibición de la reacción.

El INT en la presencia de SOD en la muestra produce una supresión de esta coloración, proporcional a la actividad de la enzima.

Método de determinación de actividad de SOD.

Técnica:

1. Se adicionaron 400 μ L de muestra de saliva en cubetas especiales para el equipo automatizado Selectra Jr.

VI.6 Evaluación de Marcadores de Inflamación

-Técnicas inmunológicas

Cuantificación de interleucinas

La concentración de las interleucinas pro-inflamatorias se determinó mediante citometría de flujo.

- A. Preparación de los estándares
- B. Se realizaron diluciones seriadas en el siguiente orden 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 y 1:256.
- C. Se transfirieron 300 μ L de la solución madre a los siguientes tubos.
- D. Preparación de diluciones a partir del estándar de Human Inflammatory Cytokine (BD). Adicionar 300 μ L del estándar al tubo etiquetado 1:2 mezclar y transferir 300 μ L al tubo etiquetado 1:4 y así sucesivamente hasta el tubo etiquetado 1:256 (Anexo 7)
- E. Se adicionaron 25 μ L de muestra de saliva en tubos de ensayo.
- F. Mezclar las perlas de captura vigorosamente.
- G. Adicionar 25 μ L de las perlas a cada una de las muestras.
- H. Incubar durante 1.5 h a temperatura ambiente y protegido de la luz.
- I. Adicionar 500 μ L de amortiguador de lavado –a cada tubo de ensayo y centrifugar a 200 rpm durante 5 min. Aspirar cuidadosamente el sobrenadante de cada tubo y desecharlo.

- J. Agregar 150 μ L de amortiguador de lavado a cada tubo de ensayo para resuspender el botón.
- K. Adquisición de las muestras en citómetro de flujo.
- L. Análisis de datos mediante el uso del programa FCAP Array.

VI. 7 ANALÍISIS ESTADÍSTICO

Los datos se analizaron utilizando medidas descriptivas frecuencias y porcentajes, valores promedio y desviación estándar (DE) y como pruebas de comparación X^2 , t de student y ANOVA de medidas repetidas. Para todas las pruebas se consideró un valor de $p \leq 0.05$ como significancia estadística. Para tal efecto se utilizó el paquete estadístico SPSS V.22.0.

VII. RESULTADOS

Se realizó un estudio cuasi experimental con 90 adultos mayores, 29 del sexo masculino (32%) y 61 del sexo femenino (68%). De la muestra inicial a la final no se presentaron pérdidas. EL total de los individuos participantes presentaban hipertensión y *Diabetes mellitus*, el 30% del total de los pacientes son fumadores, y todos fueron diagnosticados con periodontitis cónica. El grupo placebo se conformó con 30 adultos mayores con un promedio de edad de 66.17±6.09 años, y el grupo de tratamiento con 60 adultos mayores con una edad promedio de 68±6.52 años. (Cuadro 1).

Cuadro 1. Características de la población de estudio

Variable	Grupo Control (n=30)	Grupo Tratamiento (n=60)	Valor de <i>p</i>
Sexo f (%)			
Femenino	23(77)	38(63)	0.202*
Masculino	7(23)	22(37)	
Edad (años)	66.2±6.1	68±6.5	0.105 [†]
Tabaquismo f (%)			
Si	8(27)	18(30)	0.742*
No	22(73)	42(70)	
Hipertensión f (%)			
Femenino	23(77)	38(63)	0.202*
Masculino	7(23)	22(37)	
DM f (%)			
Femenino	23(77)	38(63)	0.202*
Masculino	7(23)	22(37)	

* Prueba χ^2 † Prueba t de student f=frecuencia, $p < 0.05$. DM, *Diabetes mellitus*

Todos los pacientes se examinaron clínicamente antes y después del tratamiento, después de tres meses de tratamiento se observó que los síntomas parodontales disminuyeron de manera significativa en el grupo tratamiento; la halitosis disminuyó un 67%, la movilidad un 28%, el sangrado al sondeo un 37% y el sangrado al cepillado, un 57% con respecto al grupo control después de tres meses de tratamiento (Cuadro 2).

Cuadro 2. Síntomas clínicos parodontales pre-tratamiento y después de tres meses de tratamiento, por grupo de intervención.

Variable	Grupo Control (n=30)		Grupo Tratamiento (n=60)	
	Basal	Intervención (3 meses)	Basal	Intervención (3 meses)
Halitosis f (%)				
Si	27 (90)	24(80)	46(77)	8 (13)
No	3 (10)	6 (20)	14 (23)	52 (87) *
Movilidad f (%)				
Si	8 (27)	9(30)	14 (23)	1 (2)
No	22 (73)	21(70)	46 (77)	59(98) *
Sangrado al sondeo f (%)				
Si	16(53)	12(40)	31 (52)	2(3)
No	14(47)	18(60)	29(48)	58(97) *
Sangrado al cepillado f (%)				
Si	18(60)	18(60)	36(60)	2(3)
No	12(40)	12(40)	24(40)	58(97) *

*Prueba X^2 Control intervención vs. Tratamiento intervención $p < 0.0001$; f=frecuencia)

Con respecto a la profundidad de la bolsa, la pérdida de inserción clínica y la migración gingival, se observó una disminución significativa en el grupo de tratamiento después de tres meses de intervención y aumento en el grupo placebo después de tres meses de intervención (Cuadro 3).

Cuadro 3. Modificación en pérdida de inserción clínica, bolsa parodontal y migración gingival después de tres meses de tratamiento por grupo de intervención.

Variable	Grupo Control (n=30)		Grupo Tratamiento (n=60)	
	Basal	Intervención (3 meses)	Basal	Intervención (3 meses)
Profundidad de bolsa (mm)	1.9±0.79	2.6±1.0	2.2±1.1	0.37±0.6*
Pérdida de inserción clínica (mm)	6.6±1.1	7.4±1.3	6.6±1.9	2.1±1.5*
Migración gingival (mm)	4.6±1.35	4.8±1.5	4.4±1.1.5	1.7±1.3*

Los datos representan el valor promedio ± DE. *Prueba ANOVA de medidas repetidas $p < 0.05$

Con respecto a la profundidad de la bolsa, la pérdida de inserción clínica y la migración gingival, se observó una disminución significativa en el grupo de tratamiento después de tres meses de intervención y aumento en el grupo placebo después de tres meses de intervención. (Cuadro 4)

Cuadro 4. Marcadores de estrés oxidativo después de tres meses de tratamiento por grupo de intervención

Variable	Grupo Control (n=30)		Grupo Tratamiento (n=60)	
	Basal	Intervención (3 meses)	Basal	Intervención (3 meses)
LPO ($\mu\text{mol/L}$)	0.049 \pm 0.02	0.054 \pm 0.06	0.056 \pm 0.03	0.034 \pm 0.02*
ATT (mmol/L)	0.55 \pm 0.39	0.66 \pm 0.42	0.58 \pm 0.36	0.71 \pm 0.47
SOD (UI)	1.60 \pm 0.52	1.50 \pm 0.54	1.56 \pm 0.52	1.64 \pm 0.49

Los datos representan el valor promedio \pm DE. *Prueba ANOVA de medidas repetidas $p \leq 0.05$. LPO Lipoperóxidos, ATT capacidad antioxidante total, SOD superóxido dismutasa.

En las Figs. 10- 15 se representa la concentración de las citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, después del programa de intervención; En el grupo tratado con *T. lucida* Cav. disminuyeron las concentraciones de: IL-1 β , IL-8 e IL-12 ($p < 0.05$).

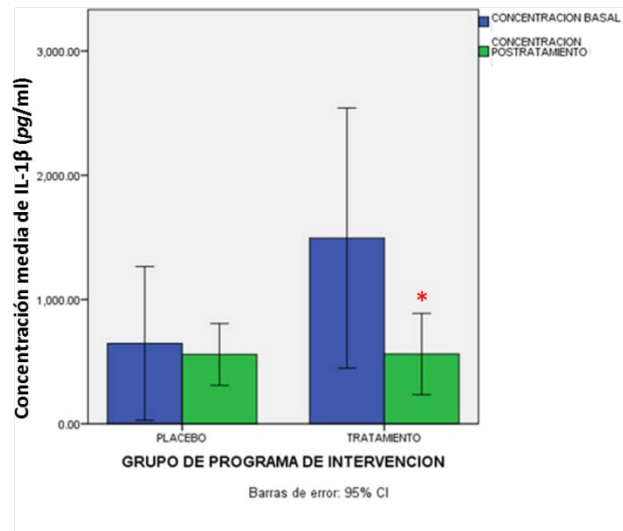


Figura 10. Concentraciones de IL-1 β pre y post-tratamiento de los grupos placebo y tratamiento. Los datos representan el valor promedio \pm DE. *Prueba ANOVA de medidas repetidas $p \leq 0.05$.

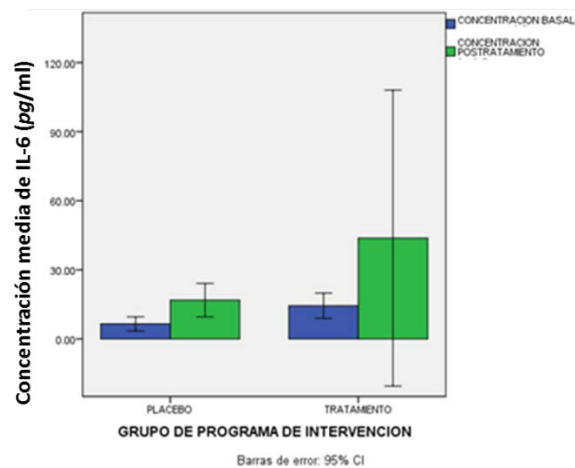


Figura 11. Concentraciones de IL-6 pre y post-tratamiento de los grupos placebo y tratamiento. Los datos representan el valor promedio \pm DE. *Prueba ANOVA de medidas repetidas $p \leq 0.05$.

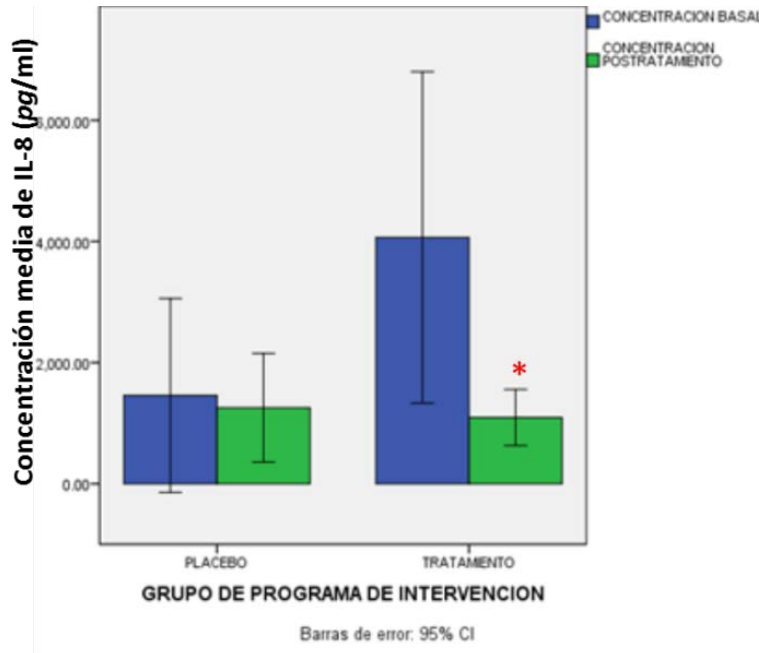


Figura 12. Concentraciones de IL-8 pre y post-tratamiento de los grupos placebo y tratamiento. Los datos representan valor promedio \pm DE. *Prueba ANOVA de medidas repetidas $p \leq 0.05$.

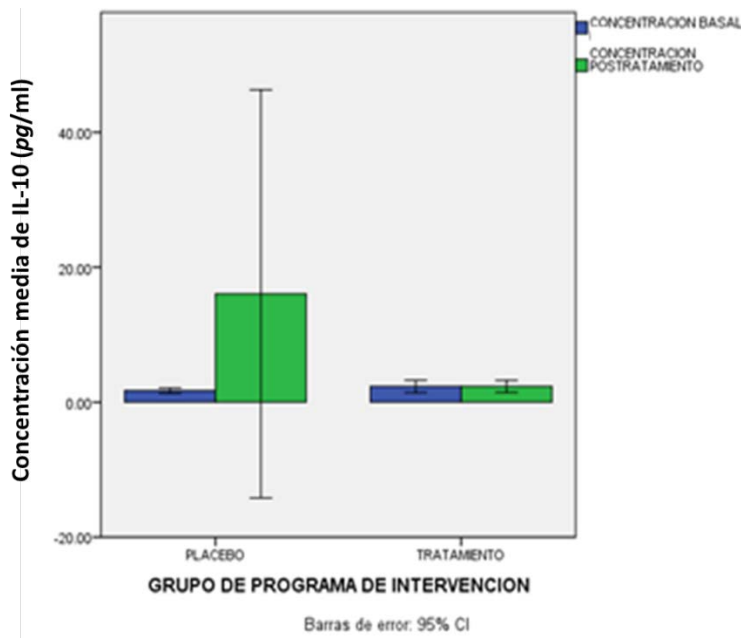


Figura 13. Concentraciones de IL-10 pre y post-tratamiento de los grupos placebo y tratamiento. Los datos representan el valor promedio \pm DE. *Prueba ANOVA de medidas repetidas $p \leq 0.05$.

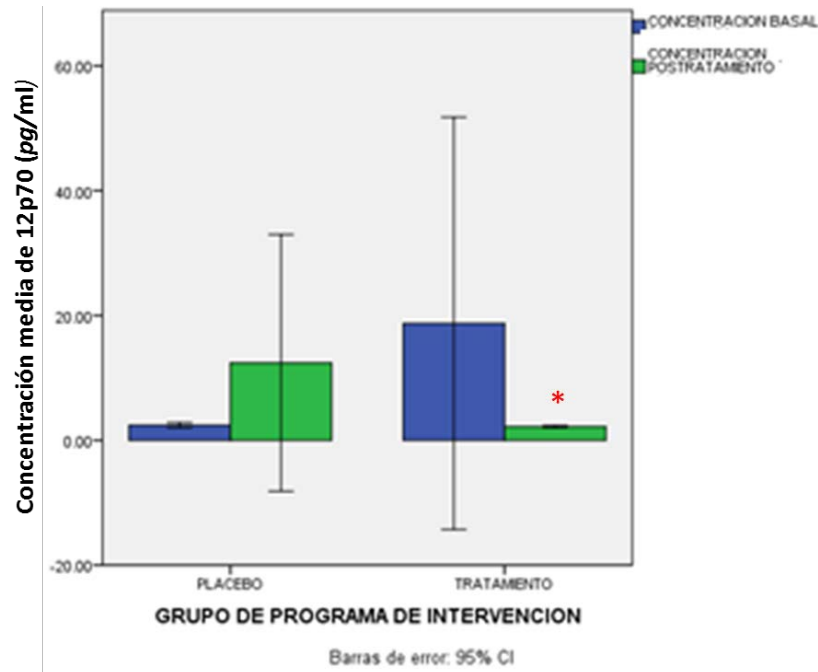


Figura 14. Concentraciones de IL-12p70 pre y post-tratamiento de los grupos placebo y tratamiento. Los datos representan el valor promedio \pm DE. *Prueba ANOVA de medidas repetidas $p \leq 0.05$.

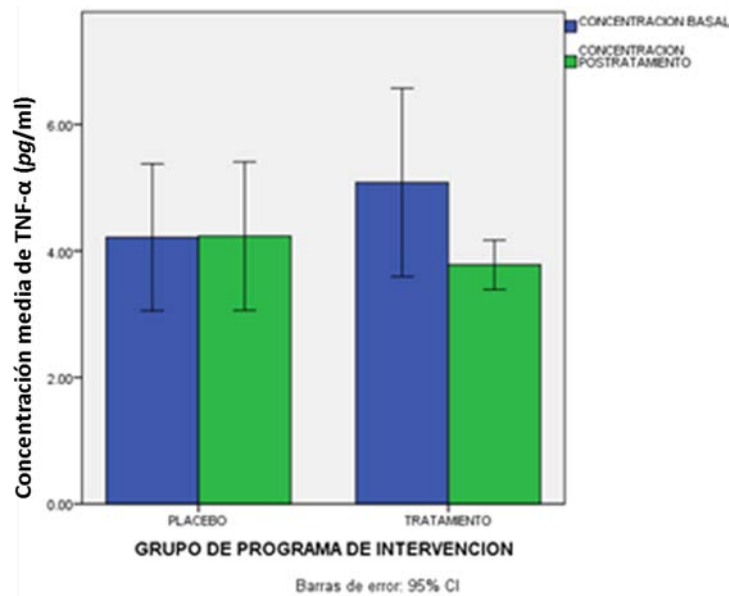


Figura 15. Concentraciones de TNF- α pre y post-tratamiento de los grupos placebo y tratamiento. Los datos representan el valor promedio \pm DE. *Prueba ANOVA de medidas repetidas $p \leq 0.05$.

VIII. DISCUSIÓN

La patogénesis de la periodontitis crónica se caracteriza por diversos factores etiológicos asociados, con necesidades terapéuticas diversas^{1,2}. La herbolaría medicinal es una alternativa terapéutica para esta patología. La Organización Mundial de la Salud (OMS), estima que hasta un 75% de la población mundial atiende sus necesidades terapéuticas con herbolaría. En el área odontológica se han realizado investigaciones para sustentar el uso de diversas especies vegetales; sin embargo, el uso de *T. lucida* en periodontitis crónica u otra patología de cavidad oral, no se ha descrito hasta este momento⁸⁷.

Tagetes lucida Cav. se ha utilizado para tratar enfermedades gastrointestinales, del sistema genito-urinario, procesos psicopatológicos, etc.^{90,93, 95-98}. El presente trabajo es el primero en presentar el efecto de *T. lucida* en la periodontitis crónica en humanos., esto debido a los antecedentes farmacológicos con efectos antiinflamatorios y antioxidantes que esta especie vegetal presenta^{93-96,98}.

Se administró un tratamiento de colutorio aplicado durante 3 meses con *Tagetes lucida* Cav. , en la evaluación post- tratamiento se observaron los siguientes resultados:

VIII.1 Parámetros clínicos

Clínicamente se observó evolución clínica favorable de la periodontitis crónica del grupo tratado con *T. lucida* Cav.

- a) En la pérdida de inserción clínica, profundidad de bolsa parodontal y migración gingival, se han reportado en diversos estudios la disminución de estos parámetros clínicos donde se utilizaron extractos herbales de *Cammelia sinensis*¹¹⁰ , *Ocinum sanctum*¹¹², *Curcuma longa*¹¹⁴, *Terminalia chebula*, *Terminalia bellirica*, *Euphrasia officinalis*¹¹⁸, *Quercus brantii* y *Coriantrum sativum*¹¹⁹, los valores de estos parámetros clínicos descendieron en el grupo tratamiento ($p < 0.05$) de la presente investigación, esta disminución significativa en la pérdida de inserción clínica, profundidad de bolsa parodontal y migración

gingival probablemente fue por el descenso en la presencia de periodontopatógenos, y en respuesta a este descenso las concentraciones de citocinas pro- inflamatorias disminuyeron, en especial IL-1, IL-8 e IL-12p70 y por tanto la destrucción del tejido parodontal no solo disminuyó sino que hubo reparación del mismo. Probablemente la disminución de las bolsas parodontales consecuencia de la acción osteoclástica no continuó al disminuir la secreción de IL-1 β y TNF- α .

b) La presencia de la halitosis en los individuos tratados con *T. lucida* Cav., bajo significativamente ($p<0.05$), este resultado probablemente fue derivado de la disminución de periodontopatógenos y en general en la presencia de patógenos de cavidad bucal; c) La movilidad disminuyó significativamente en el grupo tratamiento ($p<0.05$) el descenso probablemente se debió a que el proceso inflamatorio y la restauración de la integridad del tejido parodontal fue resultado de la acción protectora fibroblástica en el tejido parodontal, presentada por los compuestos fenólicos presentes en el extracto; en la presente investigación encontramos que el tratamiento de *T. lucida* Cav. disminuyo el sangrado gingival, movilidad e inflamación($p<0.05$); *Quercus ssp.*, es una de las especies vegetales que han sido más investigadas y utilizadas en la periodontitis crónica, investigadores evaluaron el efecto de *Q. brantii* L. y *C. sativum*, encontrando significancia estadística en el índice parodontal (IP) ($p<0.05$)^{121,119,161,121}.

Varios investigadores (Samah, et al. 2017, Bonilla, et al. 2015, Gabriela, et al. 2012, Marotti, et al. 2010, Guadarrama-Cruz, et al.2008) reportaron diversos compuestos químicos en *T. lucida* Cav., en el análisis fitoquímico realizado al extracto utilizado en la presente investigación se encontraron cuatro componentes fenólicos los cuales actuaron sobre el proceso inflamatorio, y por tanto disminuyo la movilidad dental y sangrado gingival; se ha reportado que el empleo de polifenoles en el tratamiento de la periodontitis crónica induce mejorías en los parámetro clínicos y la inflamación ($p<0.05$)^{145,161}; en la presente investigación los resultados encontrados muestran mejoría en la periodontitis crónica, con el uso del extracto de *T. lucida* Cav. en forma de colutorio, sin utilizar ningún tratamiento

parodontal; de manera similar a esta intervención se realizó un estudio utilizando triphala (*Terminalia chebula*, *Terminalia bellirica*, *Euphrasia officinalis*) encontrando disminución significativa del IG ($p < 0.05$) sin realizar abordajes terapéuticos no quirúrgicos¹¹⁸, en el presente estudio la disminución de los parámetros clínicos fue mayor; que en los tratamientos periodontales donde se eliminó el cálculo presente, tejido de granulación; lo cual permite la evolución positiva de la periodontitis crónica. Sin embargo en nuestra investigación solo se aplicó el colutorio de *T. lucida* Cav., que disminuyó los síntomas de la periodontitis crónica y su grado de severidad. Debido presumiblemente por la presencia de fenoles en el extracto de *T. lucida* Cav. con acción antioxidante y antiinflamatoria al neutralizar las especies reactivas y por ende la señalización para la síntesis de IL-1 β los cuales tienen efectos antioxidantes que disminuyeron el estrés oxidativo y actuaron como antiinflamatorios en la periodontitis crónica, el sangrado presente al sondeo y al cepillado en nuestro estudio se redujo probablemente debido a la disminución de la concentración de las citocinas proinflamatorias, y por ende al proceso inflamatorio.

VIII.2 Marcadores de estrés oxidativo

VIII.2.1 Lipoperoxidación

La concentración de lipoperoxidos disminuyó ($p < 0.05$) en el grupo tratamiento y aumentaron la capacidad antioxidante total en el grupo placebo. En estudios realizados con diferentes tratamientos a base de especies vegetales, como son *Commyphora myrrha*, *Mentha piperita*, *Bursa Pastoris*, *Clematis ternifolia*, *Timus vulgaris*, y *Aquillea millefolium*, en diferentes tiempos de intervención y con cambio en los hábitos higiénico- dietéticos de los pacientes, se observó que la concentración post- tratamiento de MDA disminuyó significativamente ($p > 0.05$)^{77,145-150}. De manera similar obtuvimos resultados significativos en el presente estudio, lo cual puede deberse a la acción antioxidante de los compuestos fenólicos presentes en el extracto de *T. lucida* Cav. y su acción en la cavidad oral. En el presente estudio, se observó que la ~~disminución de~~

lipoperoxidación fue en un periodo menor y con una mayor acentuación en la disminución de la concentración de MDA.

VIII.2.2 Antioxidantes totales

En la concentración de antioxidantes totales, diversos estudios reportan el aumento significativo ($p < 0.05$) en la ATT después del tratamiento periodontal no quirúrgico con diferente duración de tratamiento^{145 -147}. En un estudio clínico aleatorizado controlado piloto realizado a 30 pacientes, en el cual se les capacitó a ambos grupos con una técnica de cepillado adecuada, un grupo utilizó un dentífrico a base de *C. sinensis* y el grupo control utilizó un dentífrico comercial a base de fluoruro y triclosan, se reportó que después de 4 semanas de uso, la concentración de ATT mejoró significativamente en el grupo tratamiento ($p < 0.05$)¹¹⁰, pero en nuestra investigación luego de 3 meses, de tratamiento con *T. lucida*, se observaron cambios de mejoría no significativos ($p > 0.05$) en la concentración de ATT (cuadro 1-A).

De igual manera al evaluar la ATT del grupo con tratamiento de *T. lucida* Cav. sin estratificar por tabaquismo no se obtuvieron diferencias significativas ($p > 0.05$) frente al grupo control después del tratamiento, esta correlación se llevó a cabo para determinar si el estrés oxidativo generado por el tabaquismo afectaba los resultados de manera significativa entre los fumadores y los no fumadores.

Los cambios de que aunque sin ser significativos inter- grupos probablemente se debieron a compuestos fenólicos presentes en el extracto de *T. lucida* Cav., los cuales estabilizan al oxígeno reactivo del superóxido, hidroperóxidos, etc., al bloquear la acción de las EROs. La no significancia fue probablemente resultado de que la intervención no fue sistémica y el tiempo de intervención.

VIII.2.3 Actividad de la superóxido dismutasa

Al analizar la actividad de SOD no se encontraron diferencias significativas entre los grupos ($p > 0.05$) sin embargo, en distintos estudios se reportó que en pacientes

a los que se les realizó tratamiento no quirúrgico periodontal, la actividad de SOD disminuyó significativamente ($p < 0.05$)^{110, 152, 146}; de manera contraria en otras investigaciones reportan un aumento en la actividad de la enzima superóxido dismutasa^{29, 154}, como en el estudio reportado por Chávez, 2010⁸⁰; donde se utiliza cascara de nuez alta en polifenoles. En el presente estudio no se modificó la actividad de SOD entre los grupos ($p > 0.05$), probablemente porque la SOD procede de la microbiota bucal, la cual se encuentra en dos distintos tipos de biofilm (en el cemento y en el epitelio de la bolsa parodontal)¹⁶. Los resultados obtenidos por el grupo tratamiento en la cuantificación de los marcadores de estrés oxidativo analizados, presentaron mejoría global del estrés oxidativo, al disminuir la lipoperoxidación y aumento en la actividad antioxidante total, este resultado fue dado probablemente dado por que los compuestos fenólicos presentes en el extracto de *T. lucida* Cav. tienen un efecto neutralizador en las ROS, dando como resultado la disminución el marcador de lipoperoxidación (MDA).

VIII.3 Marcadores de inflamación

En investigaciones en modelos murinos donde se estudiaron el efecto de distintas especies vegetales en periodontitis crónica inducida, se reportó que *Rhizoma dynariae* y *Rehmania glutinosa*⁶⁸, *Pimpinella anisum*, *Illicium verum* y *Anethum foeniculum*¹¹⁶, *Curcuma longa*¹¹⁷, disminuyeron las concentraciones de IL-1 significativamente ($p < 0.05$)^{149, 113, 116}. El grupo tratado con *T. lucida* Cav. disminuyó en IL-1 β ($p < 0.05$) este resultado posiblemente se debió al descenso en proceso infeccioso parodontal y por tanto, una disminución en la secreción de LPS bacteriano, lo cual provocó una disminución en la secreción de estas interleucinas por parte de los macrófagos; por lo que la disminución presentada en estas citocinas dio como resultado el descenso en la actividad osteoclástica y de expresión de las moléculas de adhesión al endotelio vascular. En tanto que en investigaciones con humanos, se reportó que el uso de simvastatina (1.2 mg) redujo los niveles de IL-6 e IL-8 y que de manera inversa los niveles de IL-10

aumentaron después del tratamiento, utilizándose paralelamente con el tratamiento parodontal ($p < 0.05$)¹⁵⁵.

Respecto a la concentración de IL-6 estudios diversos reportaron que el uso de *Persea americana* y el frijol de *Glycine max*⁷⁷, *Roselle calix*¹⁰, *Cammelia sinensis*¹²⁸, produjeron disminución de las concentraciones de IL-6; sin embargo en el presente estudio se detectó la tendencia a aumentar las concentraciones de IL-6 en el grupo tratamiento sin que este resultado fuese estadísticamente significativo; comportamiento similar se presentó en el estudio en el cual se aplicó como agente terapéutico a *Citrus aurentifolia*¹²², inferimos que este comportamiento pudiese presentarse porque *C. aurentifolia* y *T. lucida Cav.* comparten dentro la composición química de su extracto la presencia de compuestos fenólicos (Praseyto, et al. 2013, Samah, et al 2017) los cuales podrían estimular a los fibroblastos.

En tanto que, las concentraciones de IL-8 se reportó que disminuyeron con el tratamiento de *Roselle calyx*¹⁰, este resultado fue similar al del presente estudio; resultando en una disminución de infiltrado leucocitario en la zona lo que produjo que IL-8 disminuyera, causado por la degradación de la matriz extracelular Y ya que IL-8 recluta y activa a los PMN, los resultados clínicos observados en el presente estudio son coherentes con la disminución de estas citocinas.

La valoración del efecto del tratamiento de *T. lucida Cav.* en las concentraciones de IL-10 fueron similares a las reportadas en estudios con *Persea americana* y el frijol de *Glycine max*, donde las concentraciones disminuyeron significativamente ($p < 0.05$); contrario a lo reportado en el efecto de *Cordia vernacea*¹³¹, en el tratamiento con diferentes especies vegetales en donde se observó un incremento significativo en las concentraciones de esta citocina ($p < 0.05$)¹⁵⁶; en el presente estudio IL-10 no disminuyó significativamente ($p < 0.05$), sin embargo si aumento en el grupo control. Este resultado probablemente se debió a que la patología presento un descenso en su proceso, y descender las concentraciones de IL-1 e

IL-6 y la proliferación de macrófagos en la zona disminuyeron. Sin embargo, también suponemos que el efecto antioxidante del extracto de *T. lucida* Cav. modificó las concentraciones del anión superóxido, que modificaron las concentraciones de esta citocina.

En un estudio realizado en pacientes con periodontitis crónica, se analizó la concentración de IL-12p70, sin embargo, después del tratamiento parodontal, estos niveles no presentaron cambios significativos ($p < 0.05$)¹⁵⁷. En la presente investigación se encontró que los niveles de IL-12p70 disminuyeron de manera significativa en el grupo tratado con *T. lucida* Cav. y este resultado probablemente fue por la disminución en los productos bacterianos y la disminución en la actividad de macrófagos y monocitos; así mismo probablemente esto se deba a una reducción en los linfocitos B ante la disminución de IL-10 en nuestro grupo de tratamiento.

Distintos estudios han reportado que disminuyó la concentración de TNF- α al utilizar como tratamiento *Persea americana* y *Fríjol de Glycine max*⁷⁷, *Rhizoma dynariae* y *Rehmannia glutinosa*⁶⁸, *Pimpinella anisum*, *Illicum verum* y *Anethum foeniculum*¹¹⁶, *Curcuma longa*¹¹⁷, *Vaccinium macrocarpon*¹²⁷, *Panax notoginseng*¹⁵⁸⁻¹⁵⁹, mientras que en el presente estudio TNF- α no presentó modificaciones entre los grupos, pero sí en el grupo que recibió *T. lucida* Cav. lo cual probablemente se debió a la disminución en la secreción de IL-1 β , o al descenso en la población de gram negativos, y la disminución de la secreción de IL-12p70 que ayudó a disminuir la secreción de p55 y 75 solubles por las células NK.

IX. Conclusiones

- El tratamiento con *Tagetes lucida* Cav. mejora la periodontitis crónica en el adulto mayor, al disminuir el estrés oxidativo y el proceso inflamatorio.
- *Tagetes lucida* Cav. ayuda a disminuir el daño por ERO's ya que disminuye las concentraciones de lipoperoxidación.
- *Tagetes lucida* Cav. tiene efectos antiinflamatorios, disminuye las concentraciones de las citocinas IL-1, IL-8 e IL-12.

X. REFERENCIAS

1. Incidencia y prevalencia de periodontitis en mexicanos. URL: http://epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/publicaciones/2011/monografias/P_EPI_DE_LA_SALUD_BUCAL_EN_MEXICO_2010.pdf
2. Jiménez CM, Sanders EA, Maurello MS, Kaste ML and Beck JD. Prevalence of periodontitis according to hispanic or latino background among study participants of the hispanic community health study /study latinos. JADA 2014; 145(8): 805-816. doi:10.14219/jada.2014.34
3. Castrillón RLE, Macín C AS y Palma RA. Participación de La interleucina 1 β (IL-1 β) en periodontitis. Revista odontológica mexicana, México; UNAM: 11 (4) Diciembre 2007 P. 185-200
4. Glickman I. Periodontología clínica. México: 5ta Ed Editorial Interamericana; 1980. P. 170-190
5. Lazzari P E. Bioquímica dental. 2da Ed Interamericana 1978 México P.299-320
6. Margini AR. Inmunología e inmunología química. Buenos Aires: Ed Medica Panamericana; 1996. P. 435-436, 471-72
7. Wai YP, Kuo PC. Intersecting pathways in inflammation and cancer hepatocellular carcinoma as a paradigm. Worl J Clin Oncol; 2012;10:3(2):5-23
8. Divyashree P, Ravi K. *Punica granatum*: A review on its potential role in treating periodontal disease. J Ind Soc Periodont; Jul-Aug 2014; 18(4). Doi: 10.4103/0972-124X.138678
9. Hernández MB. Efecto del ejercicio moderado sobre marcadores de estrés oxidativo, inflamación crónica y su relación con enfermedad periodontal crónica y su relación con enfermedad periodontal en adultos mayores. (TESIS) Maestría: UNAM 2013.

10. Sulistyani H, Fujita M, Nakazawa F. Effect of C57BL/6N Roselle calix extract in gingipain activity, production of inflammatory cytokines, and oral bacterial morphology. *J microbiol, biotechnol food scien*; 2016: 6(3): 961-965
11. Gutierrez R. Implicaciones para la salud del envejecimiento de la población y la transición epidemiológica en México en D'Hyver DLD, Gutierrez RLM. *Geriatría 2ed*, Ed. Manual Moderno México:2009 3-14 pp
12. D'Hyver DLD Proceso de envejecimiento. en D'Hyver DLD, Gutierrez RLM. *Geriatría 2ed*, Ed. Manual Moderno México:2009 281-315, 183-195, 221-228
13. Rajarajacholan UM and Riabound K. Anging with ING: a comparative study of different forms of stress induced premature senescence. *Oncotarget* 2016, 6(33):34118-34128
14. D'Hyver DLD C. Desnutrición en D'Hyver DLD, Gutierrez RLM. *Geriatría 2ed*, Ed. Manual Moderno México:2009 127pp
15. Matías LP. Salud oral. en D'Hyver DLD, Gutierrez RLM. *Geriatría 2ed*, Ed. Manual Moderno México:2009 97pp
16. Newman MG, HM Takei, PR Klokkevold y FA Carranza. *Periodontología clínica*. 11ed Manual Moderno. USA; 2014 182-194 pp
17. Salminen A, Kopra KAE, Hyvärinen K, Paja S, Mäntylä P, Buhlin K, Nieminen MS, Sinisalo J and Pussien PJ. Quantitative PCR analysis of salivary pathogen burden in periodontitis. *Front. Cells.Infect. Microbiol* (2015)5:69. Doi10.3389/fcimb.2015.00069
18. Banjar W and Muteb HA. Genetic factor in pathogenesis of chronic periodontitis. *J Taibah Univ med sci* 2014: 9(3): 245-247
19. Hernandez SV, Martinez GB, Sánchez MC, Sainz M, Estrugo A, Viviesca TT, López LJ and Viña M. Oral microbiota periodontal status periodontal in postmenopausal woman.. doi:10.1902/jop.2015.150365
20. Cheng HT, C A Seers, S G Dashper, H L Mitchell, J S Pyke, V Meuric, N Slakeski, S M Cleal, J L Chambers, MJ McConville and C. Reynolds. *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* Exhibit Metabolic Symbioses *PLoS Pathog*. 2014 Mar; 10(3): e1003955.

21. Fisher CL, Dawson DV, Blanchette DR, Drake DR, Wertz PW, Brogden KA, Porphyromonas gingivalis and Treponema denticola J Bacteriol 2015, Oct 19. Doi:jb.00665-5
22. Zeltz C, D Gullberg. Post-translational modifications of integrin ligands as pathogenic mechanisms in disease. Macbio; 2014:40:5-9.
23. Guedes RA, Planello AC, Andia DC, De Oliveira NFP and Paula de Souza A. Asociacion of SOCS1⁻⁸²⁰ (rs 33977706) gene polymorphism with chronic periodontitis: a case-control study in brazilians. Meta gene.2015 5:(124-128)
24. Bedi T, Mahendra J and Ambalavanan N. Defensis in periodontal Health. Indian J Dent Res. 2015 Jul-Aug: 26(4):340-4 doi: 10.4103/0970-9290.167627
25. Mouna M El J, Abdenaser AM, Hamza BZ, Inas MA, Ahmad MR, Salch SS, Mohamed e, Ibrahim BA, Nureddin A and Nabil SE. Association between vitamin D receptor gene polymorphins and chronic periodontitis among libyans. Libyan J Med 2015 (10):2677. doi:10.3402/jm.v10.26771
26. Zhang d, Li S Hu L, Sheng L and Lili C. Modulation of proteasa- activated in human gingival epitelial cells. BMC Oral health 2015, 15:128 doi: 10.1186/512903-015-0105-8
27. Irina IR, Anda AC, Acatrieni DD, Bogza EG, Răducano OC, Cioloca DP Vasincu P and Costuleanu M. Genetic polymorphims of TNF- α and IL- 1^a and generalized aggresive periodontitis. Rom J Morphol embryol 2015, 56 (2):459-464
28. Navarrete M, Caro CJ, Prato A y Secchi I. Asociación entre osteoporosis y periodontitis crónica (Revisión). Rev Clin Periodontologia Implantol Rehabil Oral 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.piro.2015.02.014>
29. Macín CS, SANZ AM, Castrillón RL, Palma RA, Noguez MN, Quinimo PC, Rubio MA. Non-surgical periodontal treatment in patients with gingivitis and moderada periodontitis. Biochemical and microbiological response. Rev Odont Mex. 2015, 19(3):155:164

30. Alvaro NT, Noguera SR y Fraiñas GF. La matriz extracelular: morfología, función y biotensegridad. *Rev. Esp. Pat* 2009, 42(4): 249-261
31. Thomas RZ, Loos BG, Feew W, Kunnen A, Van Winkelhoff AD, Abbas F and Tijdsdschr. *Periodontitis and systemic diseases: from science to clinical practice* N.T and heelkd 2015, oct: 122 (10): 542-8 doi:10.5177/ntut.2015.10.15134
32. Pink C, Kocher T, Dörr MO, Marcello R, Markus PLambonowsky L, Grotevendt N, Nauck M and Holtfreter B. Longitudinal effects of sistemic inflammation markers en periodontitis. Doi: 10.1111/jcpe.12473
33. SchulzaS, Immelb DV, Juste L, Schallera HG, Gläserd C and Reichorta S. Epigenetic characterics in inflamator candidate genes in agressive periodontitis. Doi: 10.1016/j.humimm2015.10.0007sv.
34. To TT, Gümus P, Nizam N, Bubuneli N, Draveau RP. Subgingival plaque in periodontal health antagonizes at TLR4 and inhibits E- selectin expresión endotelial cells. *Infec Immu* 2015, Oct 19 Doi: IAI.00693-15
35. Cerutis DR, Weston MD, Ogunlege AO, Mc Vaney TP and Miyamoto T, Lysophosphatidic acid (LPA)18:1 transcripcional regulation of primary human gingival fibroblastos. *Genoma Dat* 2014, Oct 23:2::375-7 doi:10.1016/j.g.data.2014.10.014.ecollection2014
36. Escamilla-Tilch M, G Filio-Rodriguez, R García-Rocha, I Mancilla –Herrera, N Avrion-Mitchison, JA Ruiz P, F. 1J Sánchez-Garcia, D Sandoval-Borrego an E AVázquez- Sánchez. The interplay between pathogen-associated and danger-associated molecular patterns: an inflammatory code in cancer? *Inmunology and cell biology* 2013: 91 (601-610).
37. Quandt D, S Jasinski-Bergner, U Müller, B Schulze and B Selinger. Synergistic effects of IL-4 and TNF- α on the induction of B7-H1 in renal cell carcinoma cells inhibiting allogeneic T cell proliferation. *Journal of translational medicine* 2014, 12:1: 151.
38. Herane A, Chaparro A, Quintero A, Sanz A, Hernández M, Gaedechens D, Carrión F and Inostroza C, Th17 cytoquines expresión and its correlacion with chronic periodontopathogens and periodontal inflammed Surface área

- (PISA) in patients with cronic periodontitis. *Rev Clin. Periodoncia, Implantol, Rehabil, Oral* 2013 6(3):109-113
39. Chu HL, Wei F, Zhi HS, Ming PY and Chen Lu Expression and distribución of TNF- α and PGE₂ of periodontal tissue in rat periodontitis model. *Asian Pacif J Trop. Med* 2014. Doi:10.1016/51995-7645 (14)60067-5
40. Chen Z, Xu Q, Katz J, Michalek MS, Fan M, Feng X and Zhang P. IL – 1 and TLR2 on RANKL- induced osteoclastogenesis signaling. <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M115.663518>
41. Moreno CS and Contreras RA. Molecular mechanisms involved in bone destruction in periodontitis (Review). *Rev Clin Periodoncis Implantol. Rahabil. Oral* 2013, 6(3):142-147
42. Nikhil K, Sharan S, Roy P. A pterostilbene derivative suppresses osteoclastogenesis by regulating rankl-mediated NF- κ B and MAPk signaling in raw264.7 cells. *Pharmacol Rep.* 2015 Dec;67(6):1264-72. doi: 10.1016/j.pharep.2015.05.009.
43. Goto H, Ishikara M, Kikuchi T, Izama A, Ozeki N, Okabe E, et al Interleukin - 1 receptor antagonist has a novel function in the regulation of matrix metalloproteinase-13 expresion. *PLos ONE* 10(10): e 014092 doi:10.1371/journal.pone. 014092
44. Caffesse RG, De La Rosa RM, De La Rosa GM, Weltman R. Effect of interleukin-1 gene polymorphism in a periodontally healthy Hispanic population treated with mucogingival surgery. *J Clin Periodontol.* 2002 Feb; 29(2):177-81.
45. Moutsopoulos NM, Lionakis MS, Hajishengallis G. Inborn errors in immunity: unique natural models to dissect oral immunity. *J Dent Res.* 2015 Jun; 94 (6): 753-8. doi: 10.1177/0022034515583533. Epub 2015 Apr 21.
46. Cavalla F, Osorio C, Paredes R, Valenzuela MA, García-Sesnich J, Sorsa T, Tervahartiala T, Hernández M.. Matrix metalloproteinases regulate extracellular levels of SDF-1/CXCL12, IL-6 AND VEGF in hydrogen peroxide-stimulated human periodontal ligament fibroblasts. *Cytokine.* 2015 May; 73(1):114-21. doi: 10.1016/j.cyto.2015.02.001. Epub 2015 Mar 6

47. Gözl L, Memmert S, Rath-Deschner B, Jäger A, Appel T, Baumgarten G, Götz W, and Frede S. LPS from *P. gingivalis* and Hypoxia Increases Oxidative Stress in Periodontal Ligament Fibroblasts and Contributes to Periodontitis. *Mediators of Inflammation* 2014, URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/986264>
48. Bedran TBL, Mayer MPA, Spolidurio DP, Gremier D. Synergistic anti-inflammatory activity of de microbial peptide human beta-defensin-3 (Hbd-3) and cathelicidin model of gingival epithelial cells and fibroblasts. *PLoS ONE* 9(9): e106766 doi:10.1371/journal.pone0106766
49. Salomon EP, Berg RL and Martin WD. *Biologia*. México: 5ta ed Mc Gram Hill; 2001. 931-955. pp
50. Chen X, Huang L, Zhong L and Ding C. Quantitative Assessment of the Associations between Interleukin-8 Polymorphisms and Periodontitis Susceptibility (REVIEW). February 2015, 86(2): 292-300, pp. doi:10.1902/jop.2014.140450
51. Marnett LJ. Lipid peroxidation – DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res Mar* 1999:8424(1-2)83-95
52. Jones Dean. Redefining Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox signaling*; 2006:8:9(10):1865-1877
53. Murray RK, DA Bender, KM Botham, PJ Kennelly, VW Rodwell y PA Weil. *Harper Bioquímica ilustrada*. China: McGraw Hill; 2010. 482-487, 527-54.pp
54. Sylova K, Bohmova A, Mikoska M, Kuzma M Pelclova D and Kacer P. Multimarker screening of oxidative stress in aging. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2014: 1 14 ID 562860.
55. Shaughnessy DT, McAllister K, Worth L, Haugen AC, Meyer JN, Domann FE, Van Houten Bennet, Motoslavsky R, Bultman SJ, Bacarelli AA, Begley TJ, Sobol RW, Hirschey MD, Ideker T, Santos JH, Copeland WC, Tice R R, Balshaw DM and Tyson FL. Mitochondria, energetics, epigenetics and cellular response to stress. *Environmental Health Perspectives* 2014: 122: 12 (1271-1278) URL: <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1408418>

56. Woolley JF, J Stanicka and TG Cotter. Recent avances in reactive oxygen species measurement in biological systems. Trends in biochemical sciences. 2013: 38: 11. (528-563) URL: [http:// dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2013.08.009](http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2013.08.009).
57. Clerkin JS, R Naughton, C Quiney and TG Coter. Mechanisms of ROS modulated cell survival during carcinogénesis. Cancer letters 2008: 266 (30-36) DOI: 10.1016/j.canlet.2008.02.029
58. Nishikawa M. Reactive oxygen species in tumor metástasis. Cancer letters 2008: 266 (53-59) doi: 10.1016/j.canlet.2008.02.031
59. Koningsberg FM. Radicales libres y estrés oxidativo: Aplicaciones médicas. México: 2008 Ed Manual moderno, 25-69 pp.
60. Sinha D, Valapala m, Shang P, Hose S, Grebe R, Luty GA, Zigler JrS, Kaarniranta K and Handa JT. Lysosomes: Regulators of autophagy in the retinal pigmeneted. Experimental eye research (2015). <http://dx.doi.org/10101/exeer2015.08.018>)
61. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Ünsal-Kacmaz K and Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the Dna damage checkpoints. Annu. Rev. Biochem.2004 73(39-85)
62. Benitez SJD. Valoración del estrés oxidativo producido por el ejercicio físico inducido en 2 grupos de varones prepuberales y puberales. (TESIS) Doctorado. Universidad de Córdoba; 2009, 28-39 pp ISBN-13:978-84-7801-334-0
63. Zhao F, B Wang, X Zhang, H Tian, W Wang and S Ru. Induction of DNA base damage and strand breaks in pheripheral erythrocytes and the underlying mechanism in goldfish (*Carassius auratus*) exposed to monocrotophos. Fish Physiol Biochem 2015: 41:613-624. Doi: 10.1007/s10695-015-0032-2
64. Pérez GLP y Péres D A JL. Métodos para medir el daño oxidativo. Rev Cubana Med Milit 2015: 29(3): 192-8
65. Auroma O I. Free radicals, oxidative stress, and antioxidantes in human helth and disease. JAOCS: 1998 , 75 (2)

66. Huang CJ, Mc Allister MJ, Slusher LA, Webb EH, Mock JT and Acevedo OE, Obesity- related oxidative stress: the impact of physical activity and diet manipulation. Sport medicine- open2015 1(32) Doi:10.1186/540789-015-0031-y
67. Gupta R K, Kumar A P, Shah N A Kumar C, Jha U K, Yadav U C, Pavan K G, Uttam P. Oxidative stress and antioxidants indesease and cáncer: A review. Asian pacific journal of cáncer prevention; 2014:15:11(5): 4405-4410
68. Yang LY, Della –Fera MA, Rayalan S, Ambati S, Hartzell DL, Park HJ and Baile C. Enhanced inhibition of adipogenesis and induction of apoptosis in 3T3-L1 adipocytes with combinations of resveratrol and quercertina. Life Sciencies 82(19-20):1032-9 doi:10.1016/j.ifs.2008.03.003 PMID 18433793
69. MERCK SA. Industrias químicas. Bioflavonoides: Quercertina y rutina. Informe a profesionales (2000).
70. Martínez JB. Evaluación de la actividad antioxidante de extractos orgánicos de semillas de *Helioctopus terebin thinaceus* (TESIS) Universidad , Tecnológica de la Mixteca:2007, 4-11 pp
71. Avello M y Suwalsky M. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismo de protección. Atenea 494, 2006 (II): 61-172 ISSB07161840
72. Bernis C. Envejecimiento, poblaciones envejecidas y personas ancianas y revisión. Antropo2014, 6(1-14) URL:www.didac.ehu.es/antrop
73. Dajas F, Ferrari M, Martínez A, Zeppit M, Ferreiras M, Pintos A. Producción de radicales hidroxilo en sangre en pacientes ancianos hipertensos. Rev Med. Urug 2004, 20(1)
74. Delgado RL, Martínez SG, Díaz BA. Determinación de marcadores de estrés oxidativo en pacientes con enfermedades cardiovasculares. Acta Bioquím. Clin. Latin. 2009, 43(3): 307-13 pp
75. Yapici NB, Mandalapu S, Michael G K and Bi L. Target fluorescent probes for detection of oxidative stress in the mitocondria. Bioorganic & Medicinal Chemistry letters 2015: 25 (3476-3480) URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.07.011>

76. Valdez- Reyes JM, Padrón- Chacón R, Ghannam- Ruisánchez Y. Estrés oxidativo en las enfermedades bucales, revisión de literatura. Rev Odont Latin 2015 7(1):1-7
77. Oliveira GJ, Paula LG, Souza JA, Spin-Neto, Starvropulos A, Marcantonio RA. Effects of avocado/soybean unsaponifiables (ASU) on the treatment of ligadutture_induced periodontitis in rats. Braz Oral Res 2017 april10; 31:e28. Doi: 10.1590/1807-3107BOR-2017. Vol31.0028
78. Atabay VE, Lutfioğlu M, Avci B, Sakallioğlu EE, Aydoğdu A. Obesity and oxidative stress in patients with different periodontal status: a case-control study. J Periodontal Res. 2016 Mar 2. doi: 10.1111/jre.12368.
79. Rivarola de Gutierrez EM. Stress oxidativo en las patologías inflamatorias orales. Actualización. Rev Med Univ UNCuyo 2008, 4(1):1-8
80. Y M Ortiz G, Morales V G. Estrés oxidativo y su papel en la periodontitis. Rev Univ Guad 2010 Mar; 18(3)
81. Wang JY, Yuan Y, Chen XY, Fu SG, Zhang L, Hong YL, You SF and Yang YQ. Extract from *Eucommia ulmoides* Oliv. Ameliorates of inflammation arthritis via regulationsynoviocyte proliferetation osteoclastogenesis in vitro and in vivo. J Ethnopharmacology 2016, 194(609-616)
82. Orihuela R C, C N Tamaki, R Mukai, M Fukui, K Miki, J Terao and H O Ito. Biological impacts of resveratrol, quercetin, and N acetylcysteine on oxidative stress in human gingival fibroblasts. J. Clin. Biochem. Nutr.; 2015: 56 (3): 220–227
83. Gupta R. Anand IN, Kaur N, Yadau P, Ingle, Charania Z. Ayurveda in dentistry: A review. J International oral health 2015, 7(8):141-143
84. Chávez MA. Efectos del tratamiento periodontal coadyuvado con polifenoles en las condiciones clínicas de pacientes obesos con periodontitis crónica. (TESIS) Maestría, IPN:2010
85. Domínguez A. Efecto de la quercertina sobre la transcripción nivel proteico y actividad de enzima de detoxificación celular en el intestino de rata. (TESIS) Maestría IPN: 2009

86. Jiménez MR, Mendieta ZH, Scougal VRJ, Colin FMC y Romero FMS. Estrés oxidativo, antioxidante y enfermedad periodontal (Revisión) Revista ADM2013, 70(6)298-301
87. Macías CTO. La herbolaría medicinal del Parque Nacional Izta- Popo como antimicrobiano de patógenos de La cavidad oral (TESIS). México: UNAM; 2004. ISBN970-32-26-09-4,ISBN 970-32-2291-9
88. Monografía botánica de *Tagetes lucida*. [http://conabio.gob.mx/monografiasbotanicas/Tagetes lucida](http://conabio.gob.mx/monografiasbotanicas/Tagetes_lucida).
89. Fahlbusch KG, Hammerschmidt FJ, Panten J, Pickenhagen W, Schatkowski D, Bauer K, Garbe D, Sur-burg H. Flavors and Fragrances in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH, Wein-heim: 2002. Published online: 15 January 2003; doi 10.1002/14356007.a11_141.
90. Lorenzetti, B B, Souza G R E P, Sarti SL J, San-tos Filho D, Ferreira S R H. Myrcene mimics the peripheral analgesic activity of lemongrass tea. Journal of Ethnopharmacology 34 (1): 43–48. (1991) .doi:10.1016/ 0378-8741(91)90187-I. PMID 1753786.
91. Ragaso RA and Pichersky E. A day in the life of linalool molecule: Chemical communication in a plant- pollinator system. Part 1: linalool biosynthesis in flowering plants. Plants Species Biol 1999, (14):95-120
92. Tafar VC Y espinosa CYK. Biotransformación de estragol mediada por *Escherichia coli* (ATCC25922) (TESIS).Universidad Tecnológica de Pareíra: 2014 25-29 pp
93. Héthelyi E, Tétényi P, Dabi E, Dános B. The role of mass spectrometry in medicinal plant research. Biomed Environ Mass Spectrom. 1987 Nov: 14(11):627-32.
94. Samah A. El-Newary, Rasha F. Ismail, Nermeen M. Shaffie, S. F. Hendawy, E. A. Omer. Hepatoprotective, Therapeutic and *in vivo* anti-oxidant activities of *Tagetes lucida* leaves alcoholic extract against paracetamol-induced hepatotoxicity rats. Int J of PharmTech Research 2016;9 (12): 327-341
95. Bonilla-Jaime H1, Guadarrama-Cruz G, Alarcon-Aguilar FJ, Limón-Morales O, Vazquez-Palacios G. Antidepressant-like activity of tagetes lucida cav. Is

- mediated by 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors. *J Nat Med*. 2015 Oct; 69(4):463-70. doi: 10.1007/s11418-015-0909-5.
96. Gabriela GC, Javier AA, Elisa VA, Gonzalo VP, Herlinda BJ. Antidepressant-like effect of *Tagetes lucida* Cav. Extract in rats: involvement of the serotonergic system. *Am J Chin Med*. 2012;40(4):753-68. doi: 10.1142/S0192415X12500565.
97. Marotti I, Marotti M, Piccaglia R, Nastri A, Grandi S, Dinelli G. Thiophene occurrence in different *tagetes* species: agricultural biomasses as sources of biocidal substances. *J Sci Food Agric*. 2010 May;90(7):1210-7. doi: 10.1002/jsfa.3950.
98. Guadarrama-Cruz G, Alarcón-Aguilar FJ, Lezama-Velasco R, Vázquez-Palacios G, Bonilla-Jaime H. Antidepressant-like effects of *Tagetes lucida* Cav. In the forced swimming test. *J Ethnopharmacol*. 2008 Nov 20; 120(2):277-81. doi: 10.1016/j.jep.2008.08.013.
99. Céspedes-Avila JG, Martínez A, Serrato B, Calderón-Mugica JC, Salgado-Garciglia R. Antifungal and antibacterial activities of Mexican tarragon (*Tagetes lucida*). *J Agric Food Chem*. 2006 May 17; 54(10):3521-7.
100. Aquino R, Cáceres A, Morelli S, Rastrelli L. An extract of *Tagetes lucida* and its phenolic constituents as antioxidants. *J Nat Prod*. 2002 Dec; 65(12):1773-6.
101. Laferriere JE, Weber CW, Kohlhepp EA. Mineral composition of some traditional mexican teas. *Plant Foods Hum Nutr*. 1991 Jul; 41(3):277-82.
102. Linares M. Selección de plantas medicinales. México: 1994. Ed UTEHA/LIMUSA 1-3 pp
103. Flor amarilla con olor a anís, antes ofrenda a Tláloc, hoy centro de una ceremonia agrícola. *Cultura sala de prensa* (serial on line) 2001 (cited 2001 noviembre 26) (3 screens) Available from: URL: <http://www.cnca.gob.mx/cnca/nuevo/2001/diarias/mar230301/pericón.html>
104. Veloza LA, Orozco LM, Sepúlveda-Arias JC. Use of dimethyldioxirane in the epoxidation of the main constituents of the essential oils obtained from

- tagetes lucida*, *cymbopogon citratus*, *lippia alba* and *eucalyptus citriodora*. Nat Prod Commun. 2011 Jul;6(7):925-30
105. Hodgson E and R Randy L. Metabolism of toxicants. in Hodgson E. A textbook of modern toxicology. USA: 2004. John Wiley & Sons. 122,138pp
106. Herrero RR (Editor) Ortiz IR, Durand AJA, Aguirre H E y Lozoya LX. La medicina tradicional en México y su supervivencia. México: UNAM; 1989. 12-41, 63-85, 87-160.pp
107. Po-Jan Kuo, Tsung.Fu H, Chi- Yu L, Hsiang- Yin H, Min- Wei F, Po-Da Hong, Hsein- Chung and Earl F. Carvacrol ameliorates ligation-induced periodontitis in rats. J Periodontology Doi:10.1902/jop.2017.60618
108. Sarvesh D, Sarvesh V, Hema K, Sagar S. Curcumin –A magical medicine: A comprehensive review. Int Ayu Med J; Feb 2017: 5(2)
109. Jie Zhang and Xiao-Ming Shi. Therapeutic effect of Lianbenjuquin (a chinese herbal cocktail) on periodontitis in rat. Trop J Pharm Res; March 2016: 16(3):589-595 Doi:10.4314/tjpr.v16i3.13
110. Hrishi TS, Kundapur PP, Naha A, Thomas BS, Kanath S and Bhat GS. Effect of adjunctive use of Green tea dentrifice in periodontitis patients–A Randomized controlled pilot study. Inter J Dent Hyg:2016;Aug 14:178-183
111. Sugimoto H, Watanabe K, Toyama T. Takahashi SS, Sugiyama S, Lee MC, Hamada N. Inhibitory effects of french pine bark extract, pycnogenol, on alveolar bone resorption and on the osteoclast differentiation. Phytoth Res; 2015:.29 (2) 251–259.
112. Hosadurga RR, Rao SN, Edavanputhalath,Raju S, Jose J, Rompicharala NC, Shakil M and Raju S. Evaluation of the efficacy of 2% *Ocinum sanctum* gel in the treatment of experimental periodontitis. Int. J Pharm Inv; Jan-Mar 2015: 5(1). Doi: 10.4103/2230-973X.147231
113. Yang H, Wen Q, Xue J and Ding Y. Alveolar bone regeneration potential of a tradicional chinese medice, Bu-Shen- Gu-Chi –Wan, in experimental periodontitis. J Period R : 2014, 49(3) 383-389.

114. Hosadura RR, Rao S, Jose J, Rompicharla NC, Shakil M, and Shashidhara R. Evaluation of the efficacy of 2% curcumin gel in the treatment of experimental periodontitis, *Pharmacog Res*; 2014;6(4).326–333.
115. Yoshinaga Y, Ukai T, Nakatsu S, Kuramoto A, Nagano F, Yoshinga M, Montenegro JL, Shirashi C, Hara Y. Green tea extract inhibits the onset of periodontal destruction in rat experimental periodontitis. *J Period Res*; 2014;(9)5:652–659
116. Moradi J, Abbasipur F, Zaringhalam J, Maleki B, Ziae N, Khoidadoustan A and Janahmadir M. Anethole a medicinal plant compound, decreases the production of pro- inflammatory TNF- α and IL-1 β in rat model of LPS-induced periodontitis. *IJPR* 2014, 13(4)1319-1325
117. Elburki MS, Rossa C, Guimaraes M R, Goodnough M, Lee M, Curylofomfa, Zhang Y, Johnson F and Golub ML. A novel chemically modified curcumin reduces severity of experimental periodontal disease in rats: Initial observations. *Mediat Inflamm*; 2014: ID959471.
118. Naiktari RS, Gaonkar P, Gurav AN, Khiste SV. A randomized clinical to evaluate and compare the efficacy of triphala mouthwash with 0.2% chlorhexidine in hospitalized patients with periodontal diseases. *J periodontal & Implant Scie (open access)* Doi:10.5051/jpis.2014.44.3.134
119. Yagnini J, Shahabooui M, Aslani A, Reza ZM, Kiani S and Naghsh N. Efficacy of local drug delivery gel containing extracts of *Quercus brantii* L and *Coriandrum sativum* L. as an adjunct to scaling and root planing in moderate chronic periodontitis patients. *J Res Pharm Pract* 2014, Apr- Jun; 3(2):67-71. Doi: 10.4103/2279-042X137076
120. Sezer, MU, Kara I, Erciyas K. Protective effects of *Ginkgo biloba* extract on ligature-induced periodontitis in rats. *Acta Odontol Scand*; 2013;71(1).38–44.
121. Aslani A, Ghannadi A and Najafi H. Design, formulation and evaluation of a mucoadhesive gel from *Quercus brantii* L. and *Coriandrum sativum* L. as periodontal drug delivery. *Adv Biomed Res* 2013, Mar 6; 2:21. Doi: 10.4103/2277-9175.108007.elCollection2013

122. Praseyto AF, Noviana FS. Pengaruh ekstrak etanol kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap jumlah IL-6 pada gingiva tikus yang diinduksi *Acinobacillus actinomycetemcomitans* Prodentia J; 2013:1(1) 15-23
123. Tu H P, Fu MMJ, Kuo PJ. Berberine's effect on periodontal tissue degradation by matrix metalloproteinases; an in vitro in vivo experiment. *Phytomed*; 2013: 20(13)1203-1210
124. Zhou T, Chen D, Li Q, Sun X, Song Y and Wang C. Curcumin inhibits inflammatory response and bone loss during experimental periodontitis in rats. *A Odontol Scand*; 2013: 71(2) 349-356
125. Lu SH, Huang R-Y and Chou T-C. Magnolol ameliorates ligature-induced periodontitis in rats and osteoclastogenesis: in vivo and in vitro study. *Evidence -Base Complement and Alt Med*; 2013: ID 634095
126. Carmona G B, Teixeira R K C, Brito MVH, Correa PFS, Aguiar AEH, Paiva FF, Miranda BC and Martins FC. Effect of andiroba oil on periodontitis in wistar rats. *Act Cir Bras*; 2013: (28)6:430-434. Doi: 10.1590/S0102-86502013000600005
127. Polak D, Naddaf R, Shapira L, Weiss EI, and Hour-Haddad Y. Protective potential of non-dialyzable material fraction of cranberry juice on the virulence of *P. gingivalis* and *F. nucleatum* mixed infection, *J Period*; 2013:84(7)1019-1025.
128. Cho A-R, Kim JH, Lee De, J S Lee, UW Jung, EJ Bak, Y-J Yoo, Chung WG and S-H Choi. The effect of orally administered epigallocatechin-3-gallate on ligature-induced periodontitis in rats. *J Period Res*; 2013:48(6) 781-789.
129. Toyama T, Todoki K, Takahashi Y, Watanabe K, Takahashi S-s, Lee M-C-I, Hamada N. Inhibitory effects of Jixueteng on *P. gingivalis*-induced bone loss and osteoclast differentiation. *Archiv Oral Biol*; 2012: 57(11)1529-1536.
130. Barrella G E, Suffredini I B, Ribeiro F V, Cirano FR, and Pimentel S P. Evaluation of the effect of an organic extract obtained from *Ipomoea alba* L. on experimental periodontitis in rats. *Brazilia Oral Res*; 2012: 26(2)158-164.
131. Pimentel SP, Barrella GE, Casarineta RCVI. Protective effect of topical *Cordia verbenacea* in a rat periodontitis model: immune-inflammatory,

- antibacterial and morphometric assays. BMC Comple Altern Med; 2012: 12(1) 1–8
132. Gaviño de la Torre G, Juárez LC y Figueroa THH. Técnicas biológicas selectas de laboratorio y campo. México: 1980 Ed LIMUSA 112-198 pp
133. Farmacopea de los Estados Unidos mexicanos. Suplemento para establecimientos dedicados a la venta y suministro de medicamentos y demás insumos para la salud. México: FEUM; 2014.
134. Cheuson A, Zeng X and S K Obendorf. Simultaneous analysis of the coloring compounds in indigo, *Phellodendron* Bark, and madder dye using HPLC-DAD-MS. J Kor Soc clothing and textiles, 2013; 3(6) 827-836 pp
135. Ley General de Salud de los Estados Unidos mexicanos. Reglamento de investigación para la salud. México: Secretaría de Salud.
136. De la Fuente JR, D Alarcón S, A Velázquez A. Fundamentos para la investigación clínica, México: UNAM; 1988, 55-72.pp
137. Canales H. Metodología de La investigación para el área de la salud. México: Ed LIMUSA; 1995. 29-123 pp
138. Murrieta P JF, López R Y, Juárez LLA, Linares VC y Zurita MV. Índices epidemiológicos de morbilidad bucal. México: UNAM; 2006. 155-166 pp
139. Biosafety in microbiological and biomedical labs. NIH Publication 88, 8395, US. Committee on hazardous biological substances in the laboratory board on chemical sciences and technology. Washington (DC): biosafety in the laboratory. National academy press; 1989.
140. Mendoza NVN, Retana UR. Estrés oxidativo e inflamación: medición e interpretación diagnóstica. México: 2009. UNAM. 59 p.
141. Jentsch A, Bachmann H, Fürst P, Bielsalski H. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. Free Radic Biol Med 1996; 20: 251-256.
142. Lima VSM, Fonseca GMO, De Franca MJB, Manfredini V, De Silveira BM, Kubota LT. Especies reactivas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de daño oxidativo en sangre humano: principios métodos analíticos para sua determinação. Quim. Nova 2007, 30(5):1323-1338 pp

143. Estepa V, Ródenas S and Martin MC. A optimal method for the analysis of the lipidic peroxidation in human serum. *Anal. Real. Acad. Farm* 2001, 67(3)
144. Quintanar MAE y Calderón SJV. La capacidad antioxidante total, bases y aplicaciones. *Reb*; 2009: 28(3):89-101.
145. Atabay VE, Lutfioğlu M, Avci B, Sakallioğlu EE, Aydoğdu A. Obesity and oxidative stress in patients with different periodontal status: a case-control study. *J Periodontal Res*: 2016 Mar 2. doi: 10.1111/jre.12368
146. Chávez MA. Efectos del tratamiento periodontal coadyuvado con polifenoles en las condiciones clínicas de pacientes obesos con periodontitis crónica (TESIS) Maestría: IPN 2010.
147. Wei D, Zhang XL, Wang YZ, Yang CX and Chen G. Lipid peroxidation levels, total oxidant status and superoxide dismutase in serum, saliva and crevicular fluid in chronic periodontitis patients before and after periodontal therapy. *Aust Dent.J*: 2010; 55:70-78. Doi:10.1111/j.1834-7819.2009.01123.x
148. Guentsch A, Presnhaw PM, Bremer-Streck S, Klinger G, Glockman E, and Sigusch BW. Lipid peroxidation and antioxidant activity in saliva of periodontitis patients: effect of smoking and periodontal treatment. *Cloin Oral Investig*: 2015:12:345-352. doi:10.1007/s0078-008-0202-z
149. Soares de Oliviera J, Conceição PMS, De Bastos S LA, Bezerra P AS, Di Lenardo D and Pereira V DF. Biological effects of medicinal plants on induced periodontitis: a systematic review. *Int J Dent*: 2016; <http://dx.doi.org/10.1155/2016/3719879>
150. Tsai CC, Chen HS, Chen SL, Ho YP, Ho KY Wu YM. Lipid peroxidation a posible role in the induction and progresion of chronic periodontitis. *J Periodont Res*: 2005; 40: 378-384. Doi:10.1111/j.1600-0765.2005.00818x
151. Shirzaiy M, Ansari SM, Dehhan JH and Ghaeni SH. Total antioxidant capacity of saliva in chronic periodontitis patients before and after periodontal treatment. *J Nepal Health Res Counc* : 2014; 12:172-176

152. Novakovic N, Cakic S, Todorovic T, Raicevic BA, Dozic L, Petrovic V, et al. Antioxidative status of saliva before and after non-surgical periodontal treatment. *Srp*; 141, 163-168. Doi: 10.2298/SAH1304163N
153. Novakovic N, Todorovic T, Rakic M, Milinovic L, Dozic L, Jankovic S, et al. Salivary antioxidants as periodontal biomarkers in evaluation of tissue status and treatment outcome. *J Periodont Res*: 2014; 49:129-136 doi:10.1111/jre.12088
154. Karim S, Pratibha PK, Kamath S. Bhat, GS, Kamath U, Dutta B, et al. Superoxide dismutase enzima and thiol antioxidants in gingival crevicular fluid and saliva. *Dent Res J(Isfahan)*:2012;9:266-272
155. Grover HS, Kapur S, Sing A. Effect of topical simvastatina (1.2 mg) on gingival crevicular fluid interleukin-6, interleukin-8 and interleukin-10 levels chronic periodontitis-A clinicobiochemical study. *J Oral Craniofac Res* 2016 may- aug;6(2)85-92 Doi: 10.1016/j.jobcr.2015.11.003/epub2015Dec.5)
156. Pimentel SP, Barrella GE, Casarinetal RCV. Protective effect of topical *Cordia verbenacea* in a rat periodontitis model: immune-inflammatory, antibacterial and morphomet-ric assays. *BMC Compl Alter Medi*:2012; 12(1)224:1–8
157. Fokkema SJ, Loos BG, de Slegete C, Burguer W, Piscaer M, Nzerman Y, Van derVeden V. Increased released of IL-12 p70 by monocytes after periodontal therapy. *J Clin Periodontol*:2003; dec 30(12):1091-6 doi:10.1045/0303-6979.2003.00435.x
158. Almeida de EE, Bonfietti L H. Adjuvant therapy with sodium alendronate for the treatment of experimental periodontitis in rats. *J Periodontol*: 2015; 86(10) 1166–1175.
159. Zhou T, Chen D, Li Q, Sun X, Song Y and Wang C. Curcumin inhibits inflammatory response and bone loss during experimental periodontitis in rats. *Act Odontol Scandin*: 2013; 71(2) 349–356, 2013.
160. Polak D, Naddaf R, Shapira L, Weiss EI, and Hourii- Haddad Y. Protective potential of non-dialyzable material frac-tion of cranberry juice on the

- virulence of *P. gingivalis* and *F. nucleatum* mixed infection. *J Periodontol*: 2013;84(7)1019–1025, 2013.
161. Kurgan S, Fentoğlu, Önder C, Serdar M, Eser F, Tatakis DN, Gühan M. The effects of periodontal therapy on crevicular fluid matrix metalloproteinasa-8, interleukin-6 and prostanglandin E2 levels in patients with rheumatoid arthritis. *J Periodontol R*: 2016;oct 51(15)586-595

XI. ANEXOS

ANEXO 1

FORMATO CARTA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

TÍTULO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN: EFECTIVIDAD DE *Tagetes lucida* SOBRE INTERLEUCINAS PROINFLAMATORIAS Y ESTRÉS OXIDATIVO EN ADULTOS MAYORES CON PERIODONTITIS.

Responsable: Dra. Raquel Retana Ugalde

Tel: 5510264729

Institución: FES ZARAGOZA

Fecha: 14 de septiembre de 2015

Antes de aceptar la participación en este proyecto de investigación es importante que esté usted enterado en qué consistirá su participación y que ésta es totalmente voluntaria.

Participarán en el proyecto de investigación: Adultos mayores (60 años cumplidos), mujeres y hombres con diagnóstico de periodontitis crónica, con o sin enfermedades crónicas degenerativas sistémicas con controladas.

El propósito de este proyecto de investigación es: Evaluar eficacia del tratamiento con enjuague bucal del extracto de *Tagetes lucida* para modificar IL-1, IL6, IL-8, TNF- α y estrés oxidativo.

La participación de la persona en estudio consistirá en:

1. Se realizarán valoración clínica bucal y general al inicio y final del tratamiento.
2. Se administra un enjuague bucal con extracto de *Tagetes lucida* cada 15 días con dosis propias para usuario 3 veces al día el tratamiento durará 3 meses.
3. Se utilizará como placebo agua purificada con colorante verde grado alimenticio.
4. Se realizará examen médico- odontológico, toma de muestras de saliva y al inicio y final del tratamiento
5. Se utilizará un enjuague a base de agua purificada y alcohol sin ningún efecto para la salud, a los participantes que se les dará dicho placebo serán elegidos al azar.

Los riesgos de su participación en el proyecto de investigación: El tratamiento no presenta riesgos. En caso de presentar algún problema comunicarse con la Dra. Thaila Opalo Macías Camacho al tel. 5510264729 y al correo electrónico: tratamientodientesfijos@gmail.com

Los beneficios que obtendrá por participar en el estudio serán:

1. El paciente disminuirá (dependiendo el grado de afectación paradontal) la inflamación gingival, reabsorción de hueso alveolar, así como la movilidad dentaria y mal olor bucal existente.
2. El estudio contribuirá a tener terapéuticas menos agresivas para la disminución de citocinas proinflamatorias, así como la disminución de estrés oxidativo con ello

presentar una alternativa terapéutica para procesos patológicos en los que estas citocinas y estrés oxidativo estén asociadas.

Confidencialidad de los datos.- Solo se utilizarán datos como edad, sexo, peso talla, etc., su nombre permanecerá en el anonimato y no será utilizado en ninguna publicación o presentación en público. En caso de generarse grabaciones, se destruirán al término del estudio.

Antes de firmar este documento: El participante en el estudio debe estar de acuerdo en participar en el proyecto de investigación, se le deben de haber contestado todas sus preguntas con claridad y debe saber que puede retirarse del estudio en cualquier momento si así lo desea.

Nombre del Investigador: C.D. Thalia
Opalo Macías Camacho
Firma:
No. Cédula profesional: 4389303

Nombre del participante:
Firma:
Identificación No. IFE:

Testigo 1
Nombre:
Identificación No. IFE:

Testigo 2
Nombre:
Identificación No. IFE:

ANEXO 2

FORMATO DE EXPEDIENTE CLINICO

No. De expediente clínico: _____



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Efectividad de *Tagetes lucida* sobre interleucinas proinflamatorias y estrés oxidativo en adultos mayores con periodontitis.

- **Datos generales**

Nombre _____ del
paciente: _____
____ Fecha de nac: _____ Lugar de nac. _____ lugar de
residencia: _____ EDAD: _____ SEXO: _____

- **Somatotropia**

PESO: _____ TEMP.: _____ ESTATURA: _____ T.A.: _____

- **A.P.N.P.**

- **A.H.F.**

- **A.P. P.** (Interrogatorio por aparatos y sistemas)

- Digestivo: _____

- Circulatorio: _____

- Respiratorio: _____

- Linfático: _____

- Reproductor: _____

- Urinario: _____

- Endócrino: _____

- Musculoesquelético: _____

- Sensorial: _____

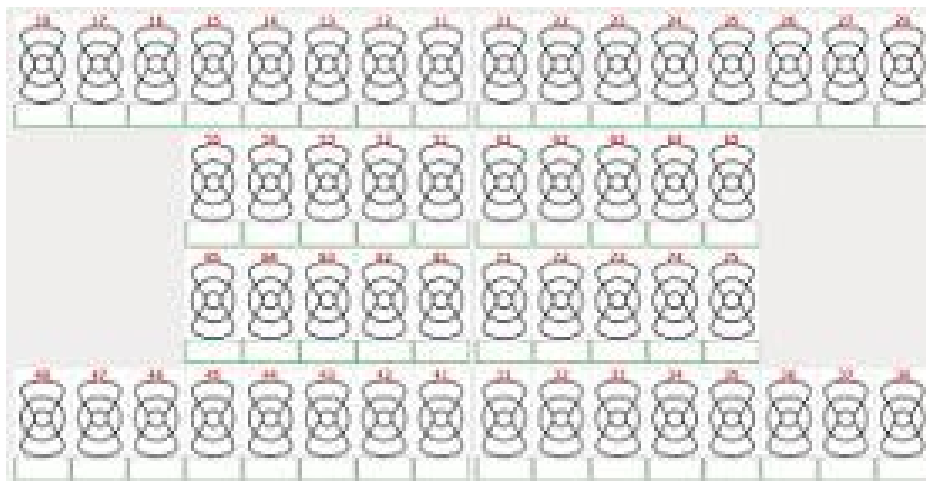
- **ENF. Sistémicas y/o Sx y/o Qx**
: _____

- **MEDICACIÓN: Última visita al medica fecha/causa:**

- **Fármacos utilizados/ dosis**
: _____

- **Vida sexual:** _____
MENARCA: _____ MENOPAUSIA: _____ EMBARAZOS: _____ TERMINO: _____
ABORTOS: _____ NULIPARA: _____
Uso de anticonceptivos: _____
Indique: _____

- **Odontograma pretratamiento**








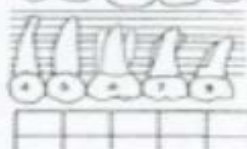

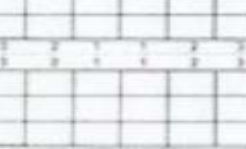
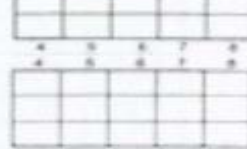
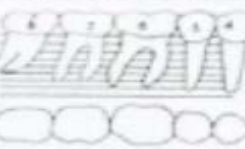

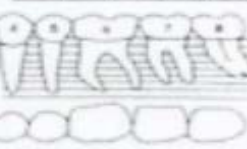
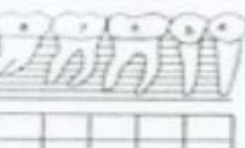
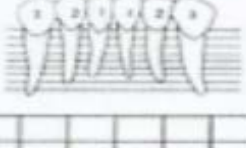
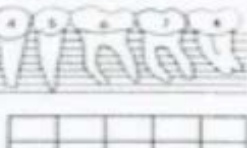
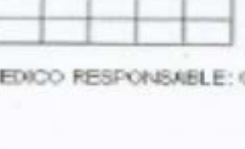
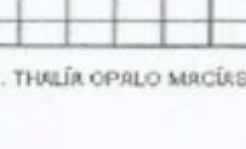

Observaciones: _____

- Parodontograma

1.- Basal fecha: _____

PERIODONTOGRAMA No. expediente: _____

Etapa de Tratamiento: Pretratamiento Posttratamiento Fecha de Examen: _____

MEDICO RESPONSABLE: C. D. THALÍA OPALO MACÍAS CAMRCHO

Dx ODONTOLOGICO:

ESTUDIOS DE GABINETE Y RX COMPLEMENTARIOS

Dx .CLINICO INTEGRAL:

INTERCONSULTA:

ETAPA PRETRATAMIENTO

MUESTRA DE SALIVA

OBSERVACIONES:

TRATAMIENTO:

NO CITA	FECHA	ENTREGA DE TRATAMIENTO	DOSIS	OBSERVACIONES

OBSERVACIONES: _____

PARODONTOGRAMA (AVANCE):

No de cita: _____ **fecha:** _____ **Examino:** _____

PERIODONTOGRAMA No. expediente: _____

Etapa de Tratamiento: Pretratamiento Posttratamiento Fecha de Examen: _____

MEDICO RESPONSABLE: C. D. THALÍA OPALO MACÍAS CAMERCHO

ETAPA POSTRATAMIENTO

MUESTRA DE SALIVA

OBSERVACIONES: _____

EVALUACIÓN CLÍNICA:

NO DE CITA	NO DE MUESTRA	CONDICION CLINICA	SINTOMATOLOGIA PACIENTE

EFFECTIVIDAD DE *Tagetes lucida* SOBRE INTERLEUCINAS PROINFLAMATORIAS Y ESTRÉS OXIDATIVO EN ADULTOS MAYORES CON PERIODONTITIS

FECHA DE ELABORACION: _____

NOMBRE Y FIRMA DE CONSENTIMIENTO
DEL PACIENTE
(LOS DATOS AQUÍ VERTIDOS POR EL PACIENTE SON VERDADEROS)

NOMBRE Y FIRMA DEL TESTIGO

NOMBRE Y FIRMA DEL
MEDICO RESPONSABLE Y TRATANTE

Expediente bajo NOM-004 de expediente clínico de la Ley General de Salud.

ANEXO 3

ASPECTOS ÉTICOS Y LEGALES

CONSIDERACIONES BIOÉTICAS

1. La presente investigación siguió las consideraciones de la Declaración de Helsinki (1945).

2. En base a lo estipulado en la Ley General de Salud de los Estados Unidos Mexicanos vigente en el artículo 100, fracción II del Reglamento de Investigación para la Salud, en el apartado sobre investigaciones para humanos. Se desarrollarán las cartas de consentimiento, cartas de información al paciente y de revocación; así como se aplicaran las consideraciones bioéticas estipuladas en el reglamento antes citado para la presente investigación ⁽¹³⁵⁻¹³⁷⁾.

ANEXO 4

Técnicas botánicas

A) Prensado

El ejemplar vegetal se acomodó de manera fina, para que cada una de sus partes fuerón prensadas debidamente, se colocó en una prensa botánica, durante un mes para su secado y prensado ⁽¹³²⁾.

B) Etiquetado

El ejemplar vegetal se montó y se cosió sobre una cartulina de x cm y se le colocó una etiqueta con sus datos botánicos ⁽¹³³⁾.

ANEXO 5

-Técnica química de extracción:

1. Extracto de *Tagetes lucida*

Técnica:

Obtención de los principios activos por el método de extracción alcohólica (tintura) de *Tagetes lucida* ⁽⁸⁷⁾ bajo la norma NOM- O72 de la Ley General de Salud de suplementos herbolarios ⁽¹³⁵⁾.

A) Preparación de la planta:

La planta de *Tagetes lucida* se trasladó del lugar de compra al lugar de procesamiento en bolsas de papel estraza con el fin de que no se vea alterada la humedad y temperatura.

A la planta se le retiró cualquier elemento ajeno y se pesaron completamente incluyendo flores, hojas y tallos, y se cortó en una proporción aproximada de 10 cm. Se lavó con agua purificada 2 veces y posteriormente se escurrieron ⁽⁸⁷⁾.

Procesamiento de la tintura:

La planta se colocó en frascos de boca ancha (500 mg), se le agregó 1 L de alcohol etílico absoluto (Reproquifin).

B) Filtrado de la tintura

- i. La tintura se colocó en un lugar fresco y seco.
- ii. Después de 15 días, la tintura se filtró en su totalidad.

C) Envasado final de la tintura.

- i. El filtrado final se colocó en frascos de cristal color ámbar ^(87,134).

3. Preparación del colutorio (enjuague).

Técnica:

- i. En frasco de cristal color ámbar de 250 ml, se colocó el 10% de la tintura madre (extracto) de *T. lucida*, con 225 ml de agua purificada embotellada ^(87,135).

ANEXO 6

-Técnicas analíticas instrumentales de cromatografía líquida

Se realizó el perfil cromatográfico del extracto etanólico de *Tagetes lucida* bajo las siguientes condiciones:

HPLC: Los análisis por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE) se realizaron en un Cromatógrafo Agilent Technologies 1260 Infinity, acoplado a un detector de arreglo de diodos DAD G1315C y un horno 1290 Infinity G1316C; se utilizó una Columna Luna Omega 1.6 μ m Polar C18 100 de 2.1 x 50 mm Phenomenex. Los cromatogramas se registraron utilizando las longitudes de onda de 230, 254, 280, 320 y 365 nm, y se procesaron mediante un programa de software OpenLab. Las condiciones cromatográficas se desarrollaron utilizando como fase móvil ácido fórmico al 0.1% (A) y acetonitrilo (B) en gradiente como se indica en la tabla 1. Para la preparación de la muestra se disolvieron 11 mg del extracto seco en 2 mL de una mezcla de metanol: acetonitrilo en relación 1:1. El volumen de inyección fue de 1 microlitro, la temperatura se mantuvo constante a 35°C y el flujo de 0.25 mL/min.

En el perfil cromatográfico (Figura15.) obtenido se observa alrededor de cinco compuestos principales. Una vez obtenido este perfil se emplearon los estándares mencionados en la tabla 2., los cuales se compararon mediante el tiempo de retención arrojado y el espectro de UV observado, algunos se identificaron en el extracto de *T. lucida*.

En conclusión ninguno de los compuestos identificados en el perfil cromatográfico de *T. lucida* forma parte de los mayoritarios en el extracto sin embargo si se detectó la presencia de 4 compuestos fenólicos en concentraciones con acción farmacológica (figura1).

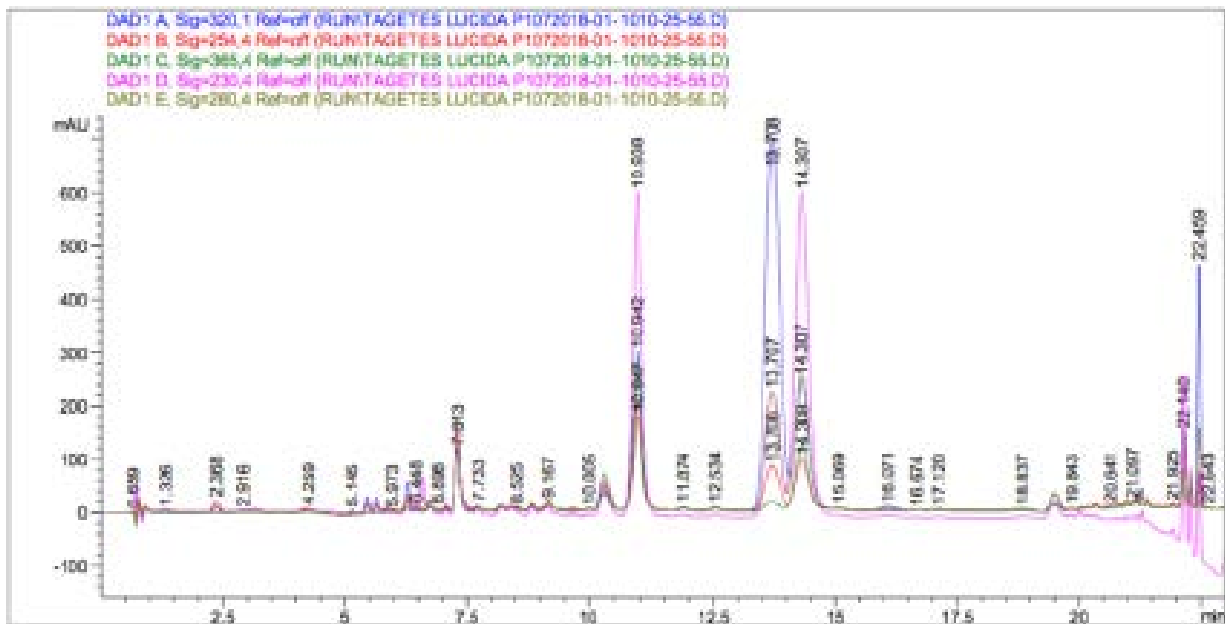


Figura1. Perfil cromatográfico de *Tagetes lucida* Cav en el cual se observa la presencia de 4 compuestos fenólicos en concentraciones con acción farmacológica (figura1), los cuales no corresponden a los estándares analizados (Rutina, hesperidina, quercertina).

ANEXO 7

Curvas de referencia del análisis de cuantificación de citocinas por citometria de flujo.

