

ISCMH
Facultad de Estomatología Raúl González Sánchez
Centro de Investigaciones Biomédicas

EFFECTO DEL VIMANG SOBRE LA ACTIVIDAD SERICA DE ENZIMAS
ANTIOXIDANTES EN LA PERIODONTITIS EXPERIMENTAL

*Dra. Bárbara E. García Triana. Facultad de Estomatología. Salvador Allende esquina Ayestarán. Plaza. Ciudad de La Habana. Teléfono:878-4941
barbara.garcia@infomed.sld.cu

**Lic. Roberto de la Peña Pino. Centro de Investigaciones Biomédicas. Ave. 31 esquina 146 núm. 3102. Cubanacán, Playa, CP 11600, Ciudad de La Habana. Teléfono: 78-3957

***Dr. Víctor Rodríguez Sosa. Centro de Cirugía Experimental. ICBP “Victoria de Girón”. Ave. 31 esquina 146 núm. 3102. Cubanacán, Playa, CP 11600, Ciudad de La Habana. Teléfono: 203-5180 vmrs@giron.sld.cu

****Dr C Alberto Saldaña Bernabeu. ISMM “Dr. Luis Díaz Soto”. Ave. Monumental. Habana del Este. Teléfono: 95-4251

*****Dr. José C. García Piñeiro. jcarlos@infomed.sld.cu

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

**Lic. en Biología. Instructor.

*** Dr. en Medicina Veterinaria. MSc. Investigador Agregado.

**** Profesor Titular.

*****Especialista Segundo Grado en Bioquímica Clínica. Investigador Titular.

RESUMEN

El Vimang es un extracto de la corteza del árbol *Mangifera indica L.* con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Por ello, nos propusimos evaluar su efecto sobre los niveles séricos de enzimas antioxidantes, en un modelo de enfermedad periodontal. Se colocaron ligaduras a diez perros *Beagles*, en el surco gingival de tres dientes de las hemiarcadas superiores derechas. A cinco de ellos, seleccionados al azar, se les aplicó localmente una solución de Vimang a 1%, dos veces al día; a los otros, se les aplicó el vehículo. Se determinaron los niveles séricos de actividad superóxido dismutasa y catalasa al inicio del experimento y a los 21 días. La aplicación del extracto disminuyó significativamente la actividad superóxido dismutasa, pero no afectó la de catalasa. Se concluye que el Vimang disminuye la actividad sérica de superóxido dismutasa en la periodontitis por ligadura, posiblemente por atenuación de la generación de especies reactivas del oxígeno.

Palabras clave: Periodontitis, Vimang, antioxidantes, superóxido dismutasa, catalasa, ligadura.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Dr. Alberto Núñez Sellés y al Dr. René Delgado del Centro de Química Farmacéutica, por suministrar el producto Vimang, así como la información científica relevante sobre éste. El estudio formó parte de un proyecto financiado por el Programa Ramal de Medicamentos del MINSAP.

INTRODUCCIÓN

EL Vimang se obtiene a partir de la corteza del árbol *Mangifera indica L.* Su composición química, caracterizada por la presencia de polifenoles, terpenoides, polialcoholes, ácidos grasos y microelementos, le confiere un elevado efecto protector antioxidante.¹⁻³ También se ha descrito su poder inmunomodulador.^{4,5}

Extractos de las hojas y tallo de esta planta han mostrado efecto antiinflamatorio, así como actividad antibacteriana contra la microbiota oral aneróbica, frecuentemente, vinculada con la enfermedad periodontal (EP).^{6,7}

El término enfermedad periodontal engloba un conjunto de afecciones de los tejidos que sostienen al diente. Constituye la segunda causa de la pérdida de dientes en el humano y su prevalencia es elevada, tanto en Cuba como en el resto del mundo.^{8,9,10}

Aunque estas enfermedades se consideran procesos infecciosos, inducidos por determinadas bacterias, su desarrollo y progresión dependen de la defensa del hospedero.^{11,12} Esta se produce en forma de una respuesta inmunoinflamatoria, conducente a la liberación de numerosos mediadores, dentro de los cuales se encuentran las especies reactivas del oxígeno (ERO).¹³⁻¹⁹ Si sucede que la liberación de estos metabolitos potencialmente tóxicos supera los mecanismos de defensa antioxidante encargados de contrarrestarlos, entonces puede producirse el daño oxidativo de los tejidos periodontales.

Teniendo en cuenta las propiedades antioxidantes del extracto natural Vimang, nos propusimos evaluar el efecto de su aplicación local sobre los niveles séricos de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa y catalasa, en el modelo de enfermedad periodontal por ligadura en perros.

METODOS

Diseño experimental

Se utilizó el modelo de enfermedad periodontal por ligadura, reportado en la literatura.²⁰ Diez perros *Beagles* machos, de ocho a diez meses de edad (*Cenp:Beag*), fueron anestesiados con pentobarbital sódico intravenoso (30 mg/kg de peso), con extracción previa de sangre periférica para la evaluación bioquímica. Se estudiaron los dientes cuartos premolares y primeros molares superiores, así como los cuartos premolares inferiores, de las hemiarquadas derechas e izquierdas. A los dientes de las hemiarquadas derechas se les colocó una ligadura de hilo de algodón en el interior del surco gingival. Los dientes contralaterales constituyeron

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

Al inicio y al final del experimento, se extrajeron 10 mL de sangre por punción de la vena safena de la extremidad anterior derecha. La sangre fue centrifugada a 1 000 gravedades, y se extrajo el suero para las siguientes determinaciones:

Niveles séricos de actividad de superóxido dismutasa (SOD)

Se realizó por la técnica de Marklund.²¹ Esta se basa en la inhibición de la formación de pirogalina, pigmento que absorbe la luz a 420 nm y se forma por autooxidación del pirogalol (Merck). Los resultados se expresaron en U/mL.

Niveles séricos de actividad de catalasa (CAT)

Se utilizó la técnica de Breis.²² La actividad de catalasa se cuantificó en 100 μ L de suero, por lectura continua del descenso de la absorbancia a 240 nm del peróxido de hidrógeno 0,06 M (SIGMA), en buffer fosfato de sodio a pH 7,0. Los resultados se expresaron en kU/L.

En los ensayos se emplearon reactivos puros para los análisis, y las técnicas se validaron en el laboratorio con anterioridad a la ejecución de este trabajo. En todos los casos, las determinaciones se hicieron por triplicado y se seleccionaron los valores promedio para el procesamiento de los resultados.

Análisis estadístico

Se realizaron comparaciones entre grupos para variables cuantitativas (Análisis de la Varianza para observaciones repetidas), a través del empleo del programa estadístico *STATISTICA* en su versión 2000. Se fijó un nivel de significación de 0,05.

Normas Éticas

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

RESULTADOS

Niveles séricos de actividad de SOD

Al inicio del experimento no se encontró diferencia significativa entre ambos grupos de tratamiento ($p > 0,05$), lo cual demuestra la homogeneidad de la muestra. (Figura 1).

Al final del experimento, a pesar de que se observa una disminución de la variable en el grupo vehículo ($4,24 \pm 4,02$ U/mL al inicio y $1,91 \pm 2,91$ U/mL al final), la diferencia no fue estadísticamente significativa ($p = 0,22$). Es decir, la inducción de la periodontitis no afectó de modo significativo los niveles de actividad de esta enzima antioxidante en el suero sanguíneo.

En el grupo Vimang, sin embargo, se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa entre los niveles iniciales y finales ($5,77 \pm 2,62$ U/mL y $0,70 \pm 1,13$ U/mL respectivamente) ($p = 0,013$).

Niveles séricos de actividad de CAT

La inducción de la enfermedad periodontal experimental no influyó sobre los niveles de actividad de CAT en el suero sanguíneo, pues no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los niveles de actividad enzimática al inicio y al final del experimento, en el grupo vehículo ($37,92 \pm 6,82$ kU/L y $38,92 \pm 5,74$ kU/L respectivamente). (Figura 2). Tampoco con la aplicación del Vimang se provocaron cambios estadísticamente significativos en esta variable ($38,30 \pm 20,92$ kU/L al inicio y $40,42 \pm 19,50$ kU/L al final).

DISCUSION

Niveles séricos de actividad de SOD

Las SODs son un grupo de enzimas que forman parte de los mecanismos de defensa antioxidante, con los cuales cuenta el organismo para contrarrestar los posibles efectos dañinos de las ERO. En particular, catalizan la conversión de dos moles de radical superóxido en un mol de peróxido de hidrógeno.²³ El hecho de que la inducción de la periodontitis provocó una tendencia a la disminución de los niveles séricos de actividad de esta enzima antioxidante (Figura 1), coincide con lo reportado para la periodontitis por ligadura en ratas, donde los cambios observados tendentes a la disminución a los 21 días no fueron significativos.²⁴

La disminución obtenida debida a la aplicación del Vimang podría explicarse por el efecto antioxidante de éste, el cual debe provocar la disminución de los niveles de ERO y, por lo tanto, de daño oxidativo. De este modo, se produce una menor estimulación de la síntesis de estas enzimas, cuyos niveles son regulados precisamente de acuerdo con la generación de ERO.²⁵

Niveles séricos de actividad de Catalasa

La Catalasa actúa coordinadamente con la SOD y cataliza la eliminación del peróxido de hidrógeno originado por esta última.^{23,26} Por consiguiente, también forma parte de los mecanismos de defensa antioxidante enzimáticos. El hecho de que sus niveles no variaron por la inducción de la enfermedad periodontal (Figura 2), puede deberse, al igual que en el caso de la SOD, a que el grado de afectación es más importante a nivel local, y no logra influir en tan corto tiempo a nivel sistémico de manera apreciable. A diferencia de lo observado para los niveles de actividad de SOD, el Vimang no logró influir sobre esta variable, lo cual evidencia la complejidad de los mecanismos de regulación de las defensas antioxidantes.

La actividad de las enzimas SOD y CAT está determinada principalmente por su concentración y, ésta a su vez, por la regulación de su síntesis, ejercida fundamentalmente a nivel de la expresión de la información genética que las codifica. Se sabe que las ERO son potentes inductores de su expresión.²⁵ Por ejemplo, hoy se conoce que la oxidación del factor de transcripción OxyR, provocada por un incremento de las concentraciones de peróxido de hidrógeno en el medio, es capaz de inducir la expresión de CAT en *Escherichia coli*. La proteína OxyR es el sensor y activador transcripcional directo del regulón OxyR, el cual controla la expresión de varios genes relacionados con la defensa antioxidante, como el KatG de la CAT. Algunas evidencias sugieren que también existe un control genético a nivel de las enzimas antioxidantes eucarióticas, en respuesta a cambios en el nivel de ERO, aunque no se conocen todavía los mecanismos bioquímicos subyacentes a estas regulaciones, ni la participación de respuestas genéticas específicas. Por ejemplo, la expresión de enzimas antioxidantes en el pulmón se modifica durante el desarrollo, seguida de cambios en la tensión de O₂. Los niveles de ARNm para Mn-SOD, CuZn-SOD y CAT se incrementan durante el desarrollo fetal y después del nacimiento, hacia la adultez. La regulación de las enzimas antioxidantes por los oxidantes también ha sido reportada en células epiteliales *in vitro* e *in vivo*, células Hela expuestas a la luz UV-B y los hepatocitos tratados con TNF α . Sin embargo, en muchos modelos experimentales, el incremento en los niveles de ARNm para enzimas antioxidantes no se refleja en la actividad de las enzimas, lo cual indica que, la regulación postranscripcional y postraducciona tiene un papel importante.²⁵

Según estos elementos, es lógico esperar que, al disminuir el daño oxidativo por la aplicación del Vimang, se produzca concomitantemente una disminución de los niveles de actividad de SOD. Por otra parte, la tendencia a la disminución de la actividad sérica de esta enzima, inducida por la ligadura, aunque no significativa, pudiera explicarse por un incremento del daño oxidativo que puede llegar a inactivarla.^{25,27,28}

Sobre la base de estos resultados, podemos concluir que la aplicación local del antioxidante natural Vimang disminuye los niveles séricos de actividad de superóxido dismutasa, en el modelo de enfermedad periodontal por ligadura, probablemente a través de la atenuación de la generación de especies reactivas del oxígeno.

ABSTRACT

Vimang is a *Mangifera indica L.* extract with antioxidant and anti-inflammatory properties. Based on this, we evaluated its effect on serum levels of superoxide dismutase and catalase using a model of experimental periodontitis. Ten Beagle dogs were subjected to ligature-induced periodontitis in three right upper teeth. A 1% solution of Vimang was topically applied to five randomly selected test animals twice daily; the remaining animals received vehicle. The serum superoxide dismutase and catalase activities were measured at the beginning and at 21 days. The extract diminished serum superoxide dismutase activity but did not affect catalase. It is concluded, that Vimang decreased serum superoxide dismutase activity in the ligature-induced periodontitis model, possibly by attenuation of oxygen reactive species generation.

Key words: periodontitis, Vimang, antioxidants, superoxide dismutase, catalase, ligature.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Sánchez GM, Rodríguez MA, Giuliani A, Núñez-Sellés AJ, Rodríguez NP, León OS, *et al.* Protective effect of *Mangifera indica L.* extract (Vimang) on the injury associated with hepatic ischaemia reperfusion. *Phytother Res.* 2003;17:197-201.

2. Martínez G, Delgado R, Pérez GD, Garrido G, Núñez-Sellés AJ, León OS. Evaluation of the in vitro antioxidant activity of *Mangifera indica* L. extract (Vimang). *Phytother. Res* 2000;14:424-7.
3. Sánchez GM, Giuliani A, León OS, Pérez-Davison GD, Núñez-Sellés AJ. Effect of *Mangifera indica* L. extract (Vimang) on protein and hepatic microsomes peroxidation. *Phytother Res*. 2001;15:581-5.
4. Sánchez GM, Re L, Giuliani A, Núñez-Sellés AJ, Pérez-Davison G, León OS. Protective effect of *Mangifera indica* L. extract, mangiferin and selected antioxidants against TPA-induced biomolecules oxidation and peritoneal macrophage activation in mice. *Pharmacol Res*. 2000;.42:565-73.
5. Guha S, Ghosal S, Chattopadhyay U. Antitumor, immunomodulatory and anti-HIV effect of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone. *Chemother Basel*. 1996;42:443-9.
6. Garrido G, González D, Delporte C, Backhouse N, Quintero G, Núñez-Sellés AJ, *et al*. Analgesic and anti-inflammatory effects of *Mangifera indica* L. extract (Vimang). *Phytother Res*. 2001;15:18-21.
7. Bairy I, Reeya S, Siddharth I, Rao PS, Bhat M, Shivananda PG. Evaluation of antibacterial activity of *Mangifera indica* on anaerobic dental microphlora based on in vivo studies. *Indian J Pathol Microbiol*. 2002; 45:307-10.
8. Carranza SA, Sznajder NG. *Compendio de Periodoncia*. 5ta. ed. Buenos Aires Panamericana; 1996, p. 22-9.
9. Zacca G, Sosa M, Mojáiber A. Situación de salud bucal de la población cubana. Estudio comparativo según provincias, 1998. *Rev Cubana Estomatol*. 2001;38:90-110.

10. González ME, Toledo B, Nazco C. Enfermedad periodontal y factores locales y sistémicos asociados. *Rev Cubana Estomatol.* 2002;39:193-202.
11. Novak MJ, Donley TG. Using host response modifiers in the treatment of periodontal disease. *Pract Proced Aesthet Dent.* 2002;14:suppl 3-10.
12. Gemmell E, Yamazaki K, Seymour GJ. Destructive periodontitis lesions are determined by the nature of the lymphocytic response. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;13:17-34.
13. Okuda K, Kato T, Ishihara K. Involvement of periodontopathic biofilm in vascular diseases. *Oral Dis.* 2004;10:5-12.
14. Garlet GP, Martins W Jr, Ferreira BR, Milanezi CM, Silva JS. Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. *J Periodontal Res.* 2003;38:210-7.
15. Novak MJ, Johns LP, Miller RC, Bradshaw MH. Adjunctive benefits of subantimicrobial dose doxycycline in the management of severe, generalized, chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2002;73:762-9.
16. Lindberg P, Kinnby B, Lecander I, Lang NP, Matsson L. Increasing expression of tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 2 in dog gingival tissues with progressive inflammation. *Arch Oral Biol.* 2001;46:23-31.
17. Grayson R, Douglas CW, Heath J, Rawlinson A, Evans GS. Activation of human matrix metalloproteinase 2 by gingival crevicular fluid and *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Periodontol.* 2003;30:542-50.

18. Kinane DF, Darby IB, Said S, Luoto H, Sorsa T, Tikanoja S, et al. Changes in gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8 levels during periodontal treatment and maintenance. *J Periodontal Res.* 2003;38:400-4.
19. Liu RK, Cao CF, Meng HX, Gao Y. Polymorphonuclear neutrophils and their mediators in gingival tissues from generalized aggressive periodontitis. *J Periodontol.* 2001;72:1545-53.
20. Shibutani T, Imai K, Kanazawa A, Iwayama U. Use of hyaluronic acid binding protein for detection of hyaluronan in ligature-induced periodontitis tissue. *J Periodont Res.* 1998;33:265-73.
21. Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in autoxidation of pirogallol as a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem.* 1980;47:469-74.
22. Breis R, Fand Sizer IW. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem.* 1952;195:137-40.
23. Ozturk O, Gumuslu S. Changes in glucose-6-phosphate dehydrogenase, copper, zinc-superoxide dismutase and catalase activities, glutathione and its metabolizing enzymes, and lipid peroxidation in rat erythrocytes with age. *Exp Gerontol.* 2004;39:211-6.
24. Sobaniec H, Sobaniec-ütowska ME. Morphological examinations of hard tissues of paradontium and evaluation of selected processes of lipid peroxidation in blood serum of rats in the course of experimental periodontitis. *Med Sci Monit.* 2000; 6: 875-81.
25. González-Flecha B, Demple B. Genetic responses to free radicals. Homeostasis and gene control. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;899:69-87.

26. Mates JM, Sánchez-Jiménez F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front Biosci.* 1999; 4:D339-45.

27. Stadtman ER, Levine RL. Protein oxidation. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;899:191-208.

28. Morel Y, Barouki R. Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J.* 1999;342:481-96.