



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**EFFECTO DEL ÁCIDO LIPOTEICOICO Y LIPOPOLISACÁRIDO
SOBRE LA EXPRESIÓN DE CICLOOXIGENASA-2 E
INTERLEUCINA-1 β EN CARDIOMIOCITOS DE RATÓN NEONATAL
(H9C2)**

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS**

**PRESENTA:
CARLOS GIROSHI BANDO CAMPOS**

**TUTORA:
DRA. GLORIA GUTIÉRREZ VENEGAS
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

MÉXICO, D.F., JUNIO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

A Dios por darme la oportunidad de vivir plenamente esta
parte de mi vida.

A mis padres y hermanos. Mamá, gracias por todo tu apoyo,
abrigo y amor. Papá, sé que desde el Cielo continúas
cuidando de mí para poder hacer todo esto posible junto con
mi mamá.

A Dulce, quien sin todo su apoyo esto hubiera sido imposible,
gracias por estar conmigo, TE AMO.

A Karen, quien ha sido un ejemplo y una guía a seguir.
Siempre agradeceré toda tu ayuda, apoyo y consejos. Gracias.

A mis amigos que siempre me han apoyado.

AGRADECIMIENTOS

- Agradezco a la máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México, por la oportunidad que me da para desarrollarme académica y personalmente.
- A la Dra. Gloria, por todo lo que me enseñó y por guiarme en mi preparación académica. Agradezco su exigencia y paciencia.
- A la Facultad de Odontología por facilitarme las herramientas para mi desarrollo académico.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. RESUMEN	4
2. TABLA DE ABREVIATURAS	5
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	6
4. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	7
5. ANTECEDENTES	8
1. Bacterias bucales en asociación con enfermedades cardiovasculares y endocarditis infecciosa.	9
1.1. Asociación de placa dentobacteriana y microorganismos cariogénicos con enfermedades cardiovasculares.	10
1.2. <i>Porphyromonas gingivalis</i> y las enfermedades cardiovasculares.	16
1.3. <i>Streptococcus sanguinis</i> y las enfermedades cardiovasculares.	18
1.4. Endocarditis y bacterias orales.	19
2. Mecanismos celulares y moleculares de la enfermedad cardiovascular asociada a bacterias de la cavidad oral.	23
2.1. Cardiomiocitos y respuesta inflamatoria inducida por bacterias (PAMPs).	23
2.2. Endotoxinas bacterianas: lipopolisacárido y ácido lipoteicoico.	26
2.3. Receptores tipo Toll.	29
2.4. Transducción de señales de los receptores tipo Toll.	31
2.5. Proteína cinasa C y el corazón.	34
2.6. Ciclooxigenasa-2.	35
2.7. Interleucina-1 β .	35
6. Hipótesis	36
7. Objetivos	37
8. Materiales y métodos	38

9. Resultados	41
10. Discusión	56
11. Conclusiones	60
12. Referencias	61

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

- **Figura 1.** Enfermedad bucal asociada a enfermedades sistémicas. 10
- **Figura 2.** Colonización de la superficie dental por bacterias bucales. 11
- **Figura 3.** La patogénesis molecular de la caries dental asociada a *S. mutans*. 12
- **Figura 4.** Características clínicas de la endocarditis infecciosa. 21
- **Figura 5.** Estructura del lipopolisacárido. 20
- **Figura 6.** Estructura de los receptores tipo Toll. 30
- **Figura 7.** Curso temporal, dosis respuesta y efecto de los inhibidores de cinasas sobre la expresión de COX-2 por el LTA obtenido de *S. sanguinis* en H9c2. 42
- **Figura 8.** Curso temporal, dosis respuesta y efecto de los inhibidores de cinasas sobre la inducción transcripcional del ARNm de COX-2 por el LTA obtenido de *S. sanguinis* en H9c2. 45
- **Figura 9.** Papel de MEK y JNK en la regulación de la expresión de COX-2 a través de los inhibidores PD98059 y SP600125 sobre la expresión de COX-2 por LTA obtenido de *S. sanguinis* en H9c2. 48
- **Figura 10.** Dosis respuesta y efecto de los inhibidores de cinasas sobre la inducción del ARNm de IL-1 β por el LTA de *S. sanguinis* en H9c2. 50
- **Figura 11.** Curso temporal sobre la fosforilación de PKC α por el efecto del LTA de *S. sanguinis* en H9c2. 51
- **Figura 12.** Dosis respuesta y efecto de los inhibidores de cinasas sobre la expresión de COX-2 por el LPS obtenido de *P. gingivalis* en H9c2. 53
- **Figura 13.** Curso temporal y efecto de los inhibidores de cinasas sobre la inducción transcripcional de IL-1 β por el LPS de *P. gingivalis* en H9c2. 55

TABLAS

- **Tabla 1.** Ejemplos de estudios sobre el papel de las bacterias en la periodontitis como un enlace a la enfermedad cardiovascular. 14
- **Tabla 2.** Microbiología de la endocarditis infecciosa en grupos específicos de pacientes. 21
- **Tabla 3.** Receptores tipo Toll y sus ligandos. 31

A. Resumen

Se sabe que microorganismos residentes de la cavidad oral como *Streptococcus sanguinis* (*S. sanguinis*) y *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) presentan importantes características patogénicas y que pueden alcanzar el torrente sanguíneo debido a procedimientos dentales y desarrollar enfermedades sistémicas como endocarditis. Los procesos infecciosos y la respuesta inflamatoria desarrollados por estas bacterias dependen, en gran medida, de las endotoxinas bacterianas. Dentro de estas, se encuentra el lipopolisacárido (LPS) el cual es el mayor componente de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, como *P. gingivalis*, y se asocia el receptor tipo Toll (TLR) 4. Las bacterias Gram-positivas, como *S. sanguinis*, poseen en su pared celular el ácido lipoteicoico (LTA), el cual se asocia al TLR-2. Una vez que estas endotoxinas se asocian a su receptor, desencadenan una respuesta proinflamatoria en diversos tipos celulares a través de cascadas de señalización dependiente de cinasas como la proteínas cinasas C (PKC) y las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK), las cuales activan diversos factores de transcripción. El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto del LTA de *S. sanguinis* y el LPS de *P. gingivalis* sobre la inducción de ciclooxigenasa-2 (COX-2) e interleucina-1 β (IL-1 β) y el papel de las MAPKs y PKC sobre este evento en cardiomiocitos de ratón neonatal. En los resultados obtenidos por los métodos de Western blot y PCR de transcriptasa reversa se encontró que las cinasas involucradas en la inducción del ARNm y la expresión de COX-2 por el LTA fueron dependientes de la MAPK cinasa (MEK), la cinasa c-Jun N-terminal (JNK) y PKC, y para IL-1 β fue MEK y PKC; cuando las células estuvieron en presencia del LPS se observó que la inducción del ARNm y la expresión de COX-2 fue dependiente de MEK y JNK, y para IL-1 β fue MEK, p38, JNK y PKC. A partir de estos resultados podemos concluir que los mecanismos celulares asociados a la producción de IL-1 β y PGE₂ por la presencia de bacterias orales dependen de una activación diferencial de cinasas en células de corazón. Estudios como el aquí mostrado nos ayudará a comprender de una mejor forma, a nivel celular, el desarrollo de una enfermedad tan grave como la endocarditis.

B. Tabla de abreviaturas

Bad – muerte celular mitocondrial asociada con Bcl-2.	LTA – ácido lipoteicoico.
ClfA – factor de aglutinación A.	Mal – proteína adaptadora tipo MyD88.
COX-2 – ciclooxigenasa 2.	MAPK – proteína cinasa activada por mitógeno.
Cyt C – citocromo C citosólico	MyD88 – proteína del gen 88 de respuesta primaria a diferenciación mieloide.
Cx43 – conexina 43	MEK – MAPK cinasa.
CREB – proteína de fijación del elemento de respuesta a AMP cíclico.	NF- κ B – factor nuclear κ B
DAG – diacilglicerol.	NVE – válvula nativa de lado izquierdo.
EI – endocarditis infecciosa.	PAAP – proteína de agregación asociada a plaquetas.
ERK 1/2 – cinasa reguladora de la señal extracelular 1/2.	PAMP – patrón molecular asociado a patógeno.
FnBPA – proteína A de unión a fibronectina.	PGE ₂ – prostaglandina E ₂ .
GTFs – glucosiltransferasas.	PI3K – fosfatidilinositol 3 fosfato.
HSP – proteína de choque térmico.	PKB – proteína cinasa B.
IL-1 β – interleucina 1 beta.	PKC – proteína cinasa C.
I κ B – inhibidor κ B	PVE – prótesis valvular de lado izquierdo.
IKK – cinasa I κ B.	TNF- α – factor de necrosis tumoral alpha.
iNOS – óxido nítrico sintetasa inducible.	TAK1 – factor de crecimiento transformante β 1.
IRAK – cinasa asociada al receptor IL-1.	TIR – dominio homólogo al receptor Toll/IL-1.
IRF3 – interferón 3.	TLR – receptor tipo Toll.
JNK – cinasa C-Jun N-terminal	TRAF-6 – factor-6 asociado al TNF-R
LBP – proteína de unión al LPS.	TxA ₂ – tromboxano A ₂ .
LPC – lisofosfatidilcolina.	
LPS – lipopolisacárido.	

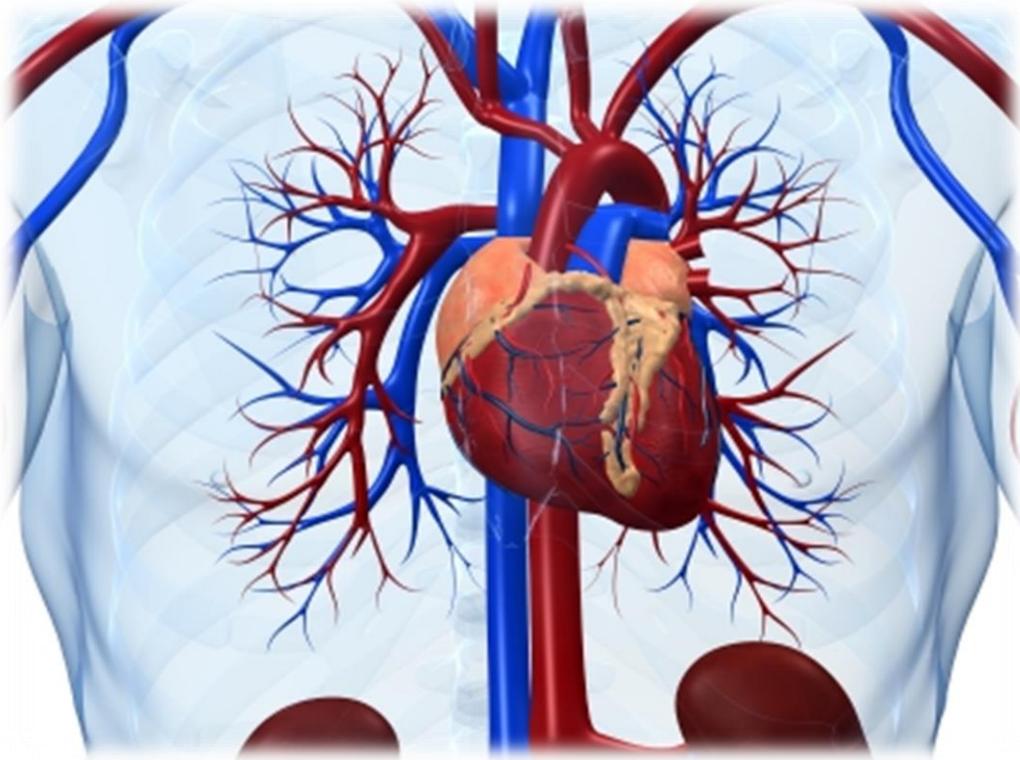
C. Planteamiento del problema

Con en el desarrollo de la placa dentobacteriana se observa que la cavidad oral es colonizada por una gran variedad de bacterias con diferentes factores de virulencia. Debido a los procedimientos dentales, algunas de estas bacterias pueden llegar al torrente sanguíneo y producir bacteremias transitorias que varían de severidad dependiendo de la salud dental de las personas. Una vez que estas bacterias se encuentran en el torrente sanguíneo pueden contribuir con el desarrollo de enfermedades sistémicas como la endocarditis, que se caracteriza por la colonización de las válvulas cardiacas generando una severa respuesta inflamatoria y apoptótica de células del endocardio y miocardio, siendo mortal en algunos casos. Es por esta razón que es necesario comprender de una mejor forma los mecanismos celulares que intervienen en la respuesta inflamatoria de un órgano tan importante para el corazón debido a la colonización de bacterias presentes comúnmente en la cavidad oral.

D. Justificación de estudio

Mediante la caracterización de las vías de señalización involucradas en la respuesta proinflamatoria por la presencia de bacterias de origen oral en un órgano de vital importancia como lo es el corazón, se podrá comprender de una mejor forma cómo actúan estas bacterias para promover el daño tisular a través de una respuesta inmune que comprende el proceso inflamatorio a través de la producción de citocinas inflamatorias.

E. Antecedentes



1. BACTERIAS BUCALES EN ASOCIACIÓN CON ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES Y ENDOCARDITIS INFECCIOSA

Las bacterias de la placa dentobacteriana tienen una gran importancia en el desarrollo de las enfermedades inflamatorias periodontales y de la caries dental. La caries dental, descrita en escritos antiguos como gusanos y demonios del diente, es la descomposición lenta del diente debido a la pérdida de cristales de hidroxiapatita (fosfato de calcio) de la matriz del esmalte ¹ debido a la producción de ácido láctico de las bacterias presentes en la placa dentobacteriana como *Streptococcus mutans*.² Las enfermedades periodontales son entidades clínicas diferentes que afectan los componentes del periodonto. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*), *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), y *Treponema denticola* (*T. denticola*) están asociados con la enfermedad periodontal. Se puede mencionar que las bacterias bucales han desarrollado tácticas altamente especializadas de colonización, incluyendo múltiples mecanismos de adherencia.^{3,4} Tanto *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* pueden invadir células epiteliales, un mecanismo probablemente involucrado en la migración a tejidos profundos donde sucede el daño a las células huésped (Fig. 1).^{5,6}

Los organismos causantes de la caries dental y la enfermedad periodontal son capaces de producir infección en otras partes del cuerpo. Ahora se ha reconocido que además de un papel en la **endocarditis infecciosa** (EI) y diabetes, los patógenos bucales también contribuyen al desarrollo de trombosis coronarias e infarto ⁷⁻¹¹. Varios estudios epidemiológicos han identificado asociación estadística significativa entre la periodontitis y enfermedades cardiovasculares ¹⁰⁻¹².

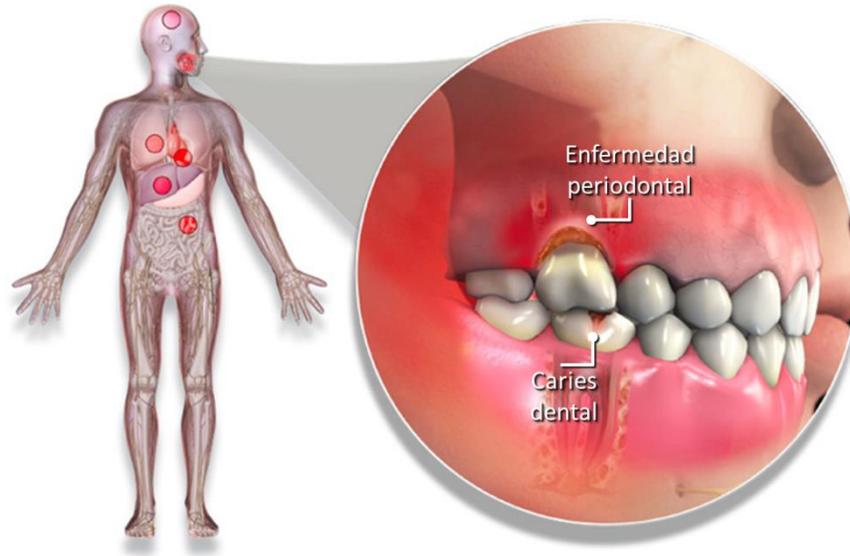


FIGURA 1 | Enfermedad bucal asociada a enfermedades sistémicas. Las caries no tratadas y la enfermedad periodontal interfieren con las funciones vitales para el mantenimiento de la salud pudiendo contribuir en el desarrollo de enfermedades infecciosas en diferentes órganos del cuerpo como corazón, pulmón, cerebro, riñón, entre otros.¹³

1.1. ASOCIACIÓN DE PLACA DENTOBACTERIANA Y MICROORGANISMOS

CARIOGÉNICOS CON ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

El nicho ecológico de la microbiota bucal es único y dinámico. De más de 500 especies bacterianas que se encuentran en la cavidad bucal humana, miembros de alrededor de 22 géneros son los más dominantes. Las principales superficies de la cavidad oral disponibles para la colonización son los dientes, el epitelio de la mucosa, y la misma placa dentobacteriana, que es el biofilm microbiano más complejo asociado con los dientes. La colonización sobre la superficie de un diente limpio, el cual es un proceso altamente complejo y específico, se presenta en la Figura 2.³

La patogénesis de la caries depende de diversos eventos asociados con la bacteria *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), la cual es un miembro del grupo de estreptococos Gram-positivos (Fig. 3). Esta bacteria también se ha aislado de la

sangre de varios pacientes con bacteremias y *E. S. mutans* se clasificó en 3 serotipos (c, e, y f) basados en la composición química de los polisacáridos de la superficie celular, que está compuesta por ramnosa y polímeros de glucosa; y se ha reportado que aproximadamente del 70-80% de las cepas de *S. mutans* de la cavidad bucal pertenecen al serotipo c, seguido por el e (20%) y el f (menor al 5%). Una gran variedad de antígenos proteicos de *S. mutans* se han caracterizado, entre los cuales las glucosiltransferasas (GTFs), y proteínas de unión a glucano son las mejor conocidas.¹⁴

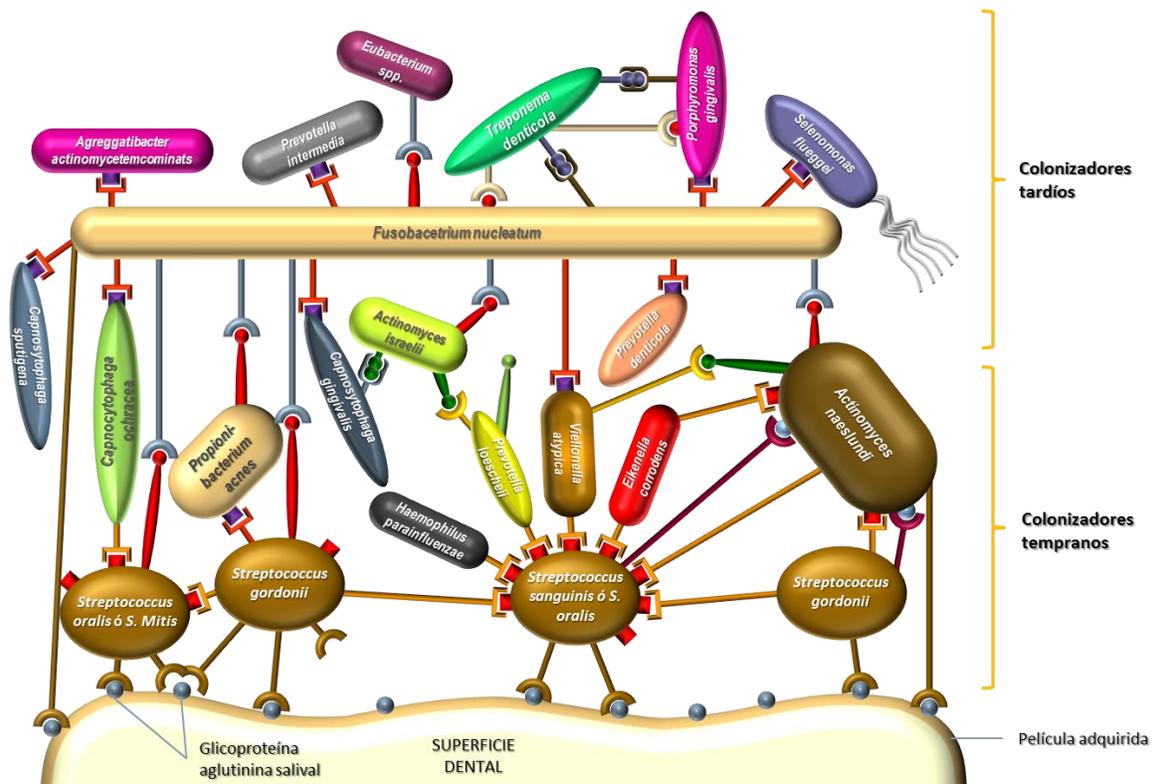


FIGURA 2 | Colonización de la superficie dental por bacterias bucales. Modelo espacio temporal de la colonización de la superficie dental por bacterias bucales, mostrando el reconocimiento de receptores salivales de la película adquirida por colonizadores bacterianos y subsecuentemente la coagregación entre colonizadores tempranos, fusobacterias y los colonizadores tardíos de la superficie dental.¹⁵

Dentro de los colonizadores tempranos de la placa dental se encuentran los estreptococos del grupo *viridans*, de los cuales *Streptococcus sanguinis* (*S. sanguinis*), que es una bacteria Gram-positiva, anaerobia facultativa y es un habitante normal de la boca humana sana, promueve la modificación del ambiente para que sea menos acogedor para otras cepas de *Streptococcus* que provocan la

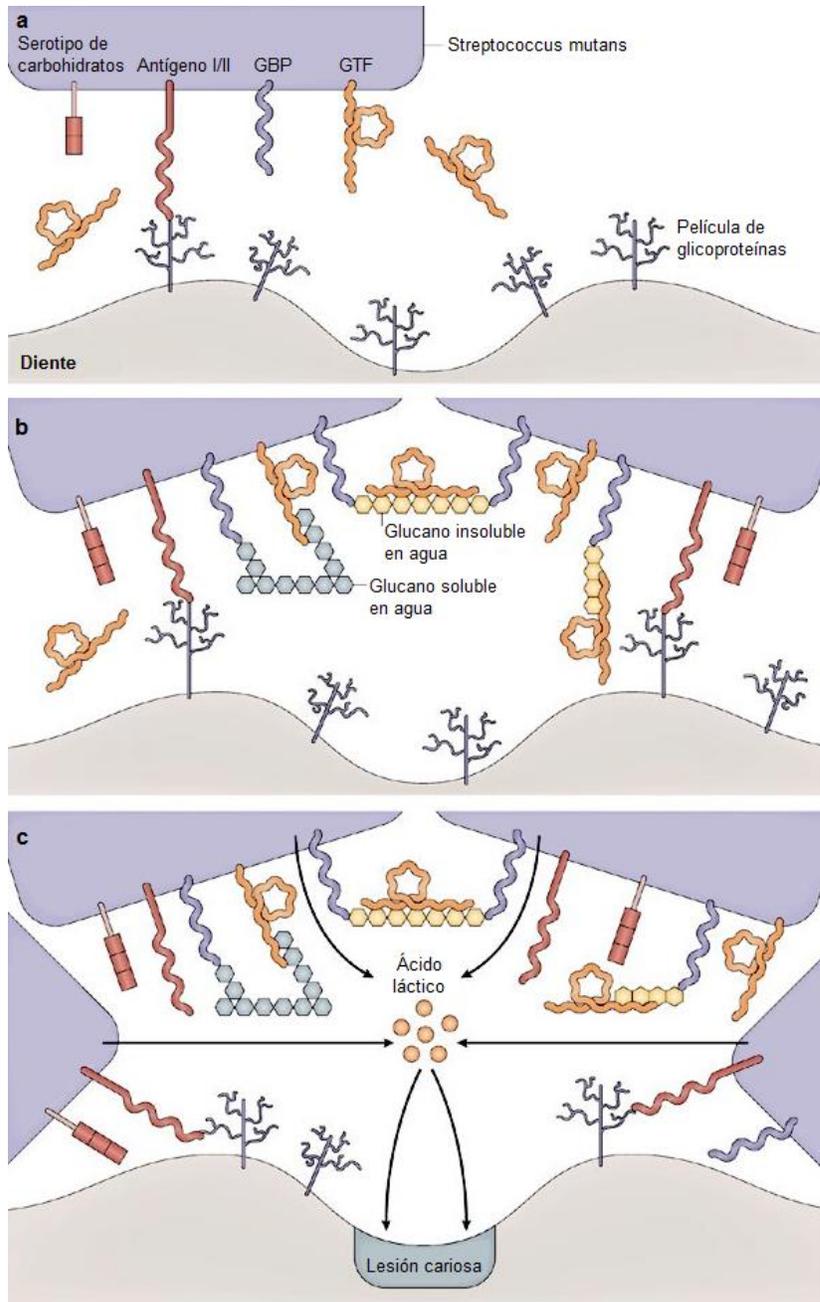


FIGURA 3 | La patogénesis molecular de la caries dental asociada con *S. mutans*.

S. mutans participa en la formación de biofilms en la superficie dentaria. Estos biofilms son conocidos como placa dentobacteriana. Se requiere de la sacarosa para la acumulación de *S. mutans*. También se requiere de enzimas glucosiltransferasas (GTFs, por sus siglas en inglés), para esta acumulación, que son constitutivamente sintetizadas por *S. mutans*.

a | La adhesión inicial de *S. mutans* a la superficie del diente. Esta adhesión se piensa que es el primer evento en la formación de la placa dentobacteriana. La adhesina de *S. mutans* (también conocida como antígeno I/II) interactúa con los α -galactósidos en la glicoproteína derivada de la saliva constituyente de la película dental. Otras fracciones en la superficie de *S. mutans* incluyen a la proteína de unión a glucano (GBP, por sus siglas en inglés), serotipo de carbohidratos y GTFs.

b | La acumulación de *S. mutans* en la superficie del diente en presencia de sacarosa. En la presencia de sacarosa, las GTFs sintetizan glucanos extracelulares a partir de glucosa (después

de romper la sacarosa en glucosa y fructosa), y se piensa que esto es el segundo evento en la formación de la placa dentobacteriana. La proteína GBP de *S. mutans* es una proteína tipo receptor que es diferente a las GTFs, y se une específicamente a glucanos. Las GTFs por si mismas tienen un dominio de unión a glucano y por lo tanto pueden también funcionar como receptores de glucanos. Por lo tanto, *S. mutans* se une a los glucanos preformados a través de GBP y GTFs, y esto da lugar a agregados de *S. mutans*.

c | Producción de ácido por *S. mutans*. El metabolismo de varios sacáridos por la acumulación de bacterias del biofilm resulta en la producción y secreción de cantidades considerables del producto final del metabolismo, ácido láctico, el cual puede provocar la desmineralización de las estructuras del diente cuando está presente en cantidades suficientes en proximidad con la superficie del diente. Se piensa que esto es el tercer evento de la formación de la placa dentobacteriana, y resulta eventualmente en una lesión cariosa. ²

caries, como *S. mutans*. Así como muchas bacterias, *S. sanguinis* puede entrar en la circulación sanguínea a través de procedimientos dentales que pueden ir desde limpiezas dentales hasta cirugías y colonizar las válvulas del corazón, especialmente la válvula mitral y válvula aórtica, siendo uno de los patógenos más comunes de la endocarditis infecciosa subaguda. Por esta razón, los cirujanos orales suele prescribir un tratamiento corto de antibióticos que deben tomarse unos pocos días antes a unos pocos días después de la cirugía oral.¹⁶

Se han realizado diversos estudios basados en la asociación y riesgo entre la periodontitis y enfermedades cardiovasculares.¹⁷ Se encontró una relación significativa entre el estado periodontal basado en las medidas clínicas del sondeo de la profundidad de bolsa y la pérdida de inserción, e infarto al miocardio agudo.¹⁸ La mayoría de los estudios presentan la severidad de la periodontitis (determinada por sondeo de profundidad de bolsa y los niveles de inserción clínica) como un factor de riesgo para enfermedad cardiovascular a niveles de menos de una relación de 3:1. Los estudios que resultaron en razones de proporción más altos usan comúnmente a la disminución del hueso alveolar como definición de periodontitis en lugar de la profundidad del sondeo de la bolsa periodontal y nivel de inserción clínico.¹⁹⁻²²

Varios estudios se han enfocado en determinar el papel de la infección en las enfermedades cardiovasculares. La etiología infecciosa de la periodontitis está bien establecida.^{23,24} Varios estudios que evalúan la presencia de bacterias asociadas con la periodontitis en muestras recogidas de la aorta o de otros vasos sanguíneos han identificado bacterias asociadas con la periodontitis en muestras de aorta y las válvulas cardíacas. Un resumen de dichos reportes se presenta en la Tabla 1.

Especies estreptocócicas también se han relacionado con el síndrome coronario agudo.²⁵⁻²⁷ En la formación de biofilms bucales, los estreptococos se coagregan con bacterias Gram negativas incluyendo *P. gingivalis* y el mismo mecanismo puede ser parte de la colonización de *P. gingivalis* en las células endoteliales.²⁸ Otros han, sin embargo, fallado en demostrar que el conteo de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *Parvimonas micra*, *Dialister pneumonsites* o

Campylobacter rectus podrían estar asociados con la enfermedad cardiovascular según lo definido por la angiografía.²⁹

TABLA 1 | Ejemplos de estudios sobre el papel de las bacterias en la periodontitis como un enlace a la enfermedad cardiovascular

Autores	Bacteria/tipo de estudio	Diseño de estudio	Condición/resultado
Haraszthy et al. (2000) ²³	<i>A. actinomycetemcomitans</i> <i>P. gingivalis</i> , <i>P. intermedia</i> <i>T. forsythia</i>	Serie de casos con muestras de 50 sujetos que requerían de endarterectomía. Análisis por PCR.	61% de 36 muestras fueron positivos para bacterias de una o más especies estudiadas. 36% dieron positivo para <i>P. gingivalis</i> .
Beck et al. (2005) ²¹	<i>A. actinomycetemcomitans</i> , <i>C. ochracea</i> , <i>P. intermedia</i> <i>T. denticola</i>	Títulos de anticuerpos séricos para 17 especies diferentes en la periodontitis: SCA	RP: <i>A. actinomycetemcomitans</i> 1.7(95% IC: 1.2–2.7) RP: <i>C. ochracea</i> 2.0 (95%IC: 1.2 3.0) RP: <i>P. nigrescens</i> 1.7 (95% IC: 1.1–2.6)
Fiehn et al. (2005) ²⁴	<i>A. actinomycetemcomitans</i> , <i>C. rectus</i> , <i>P. gingivalis</i> , <i>P. intermedia</i> , <i>P. nigrescens</i> <i>T forsythia</i> , <i>Oral streptococci</i>	179 especímenes de placa aterosclerótica eliminado de las arterias carótida o femoral se estudiaron mediante el uso de técnicas de PCR.	Bacterias orales viables no pudieron ser aisladas de los ateromas. Se detectó ADN de los patógenos periodontales en las placas ateroscleróticas. <i>P. gingivalis</i> se encontró raramente y <i>P. intermedia</i> con mayor frecuencia.
Kozarov et al. (2006) ¹²⁷	<i>A. actinomycetemcomitans</i> <i>C. pneumoniae</i> <i>E. corrodens</i> <i>P. gingivalis</i> <i>P. intermedia</i> <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> <i>S. mutans</i> , <i>T. forsythia</i> <i>T. denticola</i>	Se estudiaron 129 muestras de ADN extraídos de ateromas de 29 individuos	El ADN de agentes infecciosos orales se encuentra comúnmente en los ateromas jóvenes, pero especialmente de sujetos de edad avanzada. La contribución de <i>C. pneumoniae</i> a la inflamación pueden ser mínimos. <i>S. mutans</i> se encontró en el 20%, <i>S. aureus</i> en 5%, <i>S. epidermidis</i> en un 10%, las especies bacteroides se encontraron en el 17% de los

			jóvenes y en el 80% de los sujetos de mayor edad.
Nomura et al. (2006) ¹²⁸	<i>S. mutans</i>	Muestras de las válvulas cardíacas de 52 pacientes y muestras de placa de ateroma de 50 pacientes fueron estudiadas y muestras de placa dental de 41 pacientes antes de la cirugía.	La distribución de los serotipos en pacientes cardiovasculares fue significativamente diferente de la de los sujetos sanos, lo que sugiere que el serotipo de <i>S. mutans</i> puede estar relacionado con la enfermedad cardiovascular.
Renvert et al. (2006) ¹²⁹	Se analizaron 40 especies de patógenos sublinguales destacando <i>S. intermedius</i> , <i>S. sanguinis</i> , <i>Streptococcus anginosus</i> , <i>T. forsythensis</i> , <i>T. denticola</i> y <i>P. gingivalis</i> por el método de hibridación de ADN-ADN.	Un total de 161 casos consecutivos ingresados que sobrevivieron con el diagnóstico de SCA y 161 sujetos de control.	La carga oral de bacterias de <i>S. intermedius</i> , <i>S. sanguinis</i> , <i>S. anginosus</i> , <i>T. forsythia</i> , <i>T. denticola</i> y <i>P. gingivalis</i> son factores de riesgo concomitantes en el SCA.
Aimetti et al. (2007) ¹³⁰	<i>T. forsythia</i> , <i>P. gingivalis</i> , <i>T. denticola</i> , <i>P. intermedia</i> y <i>A. actinomycetemcomitans</i>	El ADN se extrajo de la placa subgingival y ateromas de carótida de 33 sujetos.	El ADN bacteriano se detectó en 31 de 33 muestras de endarterectomías. Ninguna de las muestras que se estudió dio positivo para ADN de los patógenos periodontales.
Gotsman et al. (2007) ¹³¹	<i>P. gingivalis</i>	201 pacientes con angina estable o SCA que fueron sometidos a una evaluación periodontal. La gravedad de la enfermedad de la arteria coronaria se determinó por el número de arterias coronarias obstruidas.	Los pacientes con SCA tuvieron significativamente altas puntuaciones de placa, índice gingival, y recuento de <i>P. gingivalis</i> que los pacientes estables.
Nakano et al. (2006) ¹³²	<i>S. mutans</i>	35 válvulas cardíacas y 27 placas ateromatosas se estudiaron por PCR	<i>S. mutans</i> se detectó en el 69% de las válvulas cardíacas y en el 74% de las placas ateromatosas
Nakano et al. (2007) ¹³³	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	Se analizaron 60 válvulas cardíacas, 10 con endocarditis, y 50 con	El serotipo e, y f de <i>A. actinomycetemcomitans</i> se detectó tanto en la placa

		enfermedad valvular, y la placa dental por PCR. Se realizó el serotipado de A.a.	dental como en las muestras cardiovasculares.
Pucar et al. (2007) ¹³⁴	<i>A. actinomycetemcomitans</i> , <i>C. pneumoniae</i> <i>P. intermedia</i> , <i>P. gingivalis</i> <i>T. forsythia</i> , y <i>Cytomegalovirus</i>	Se estudiaron pacientes con un diagnóstico de enfermedad de la arteria coronaria. Fueron investigadas las arterias coronarias con aterosclerosis y 15 arterias mamarias internas sin degeneración aterosclerótica clínica.	La ausencia putativa de bacterias patógenas en arterias mamarias internas, y su presencia en un alto porcentaje de arterias coronarias ateroscleróticas apoyan el concepto de que los organismos periodontales están asociados con el desarrollo y la progresión de la aterosclerosis.
Zaremba et al. (2007) ¹³⁵	<i>A. actinomycetemcomitans</i> <i>C. rectus</i> , <i>F. nucleatum</i> <i>P. gingivalis</i> , <i>P. intermedia</i> <i>T. forsythia</i> , <i>T. denticola</i>	Se estudió la incidencia periodontal bacteriana en placas ateroscleróticas por medio de análisis de ADN de 20 sujetos.	<i>A. actinomycetemcomitans</i> en 1/20 <i>C. rectus</i> en 4/20 <i>F. nucleatum</i> en 5/20 <i>P. intermedia</i> en 33% <i>P. gingivalis</i> en 10/20 <i>T. Denticola</i> en 6/20 <i>T. forsythia</i> en 5/20

A. actinomycetemcomitans, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; *P. gingivalis*, *Porphyromonas gingivalis*; *P. intermedia*, *Prevotella intermedia*; *T. forsythia*, *Tanerella forsythia*; *C. ochracea*, *Captocytophaga ochracea*; *C. rectus*, *Campylobacter rectus*; *P. nigrescens*, *Prevotella nigrescens*; *C. pneumonia*, *Chlamydomphila pneumonia*; *S. aureus*, *Staphylococcus aureus*; *S. mutans*, *Staphylococcus mutans*; *S. epidermidis*, *Staphylococcus epidermidis*; *F. nucleatum*, *Fusobacterium nucleatum*; SCA, síndrome coronario agudo; RP, razón de proporción; IC, intervalo de confianza.

1.2. *Porphyromonas gingivalis* Y LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

P. gingivalis es una bacteria Gram-negativa que, como se mencionó anteriormente, es una de las principales bacterias periodontopatógenas y se puede aislar preferentemente del surco gingival, de forma especial cuando hay lesiones periodontales avanzadas. Se le relaciona con multitud de procesos patológicos:

gingivitis, pulpitis, abscesos periodontales y periapicales, etc., pero su asociación más importante es con la destrucción y progresión de algunos tipos de periodontitis.¹

Esta bacteria exhibe varias propiedades de virulencia potenciales que son importantes en procesos patológicos en la cavidad oral, aunque también podrían estar jugando un papel en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares,¹ se implican numerosos factores de virulencia que básicamente provocan la destrucción tisular y la evasión de las defensas del hospedador; entre ellos cabe destacar los siguientes:

- **Cápsula.** Es de naturaleza polisacárida, que, aparte de permitir la subdivisión de la especie en seis serotipos, tiene una acción antifagocitaria por su efecto antiopsónico.³⁰
- **Membrana externa.** Tiene gran interés fisiopatológico por:
 - a) Poseer proteínas que se comportan como adhesinas que participan en fenómenos de adhesión y coagregación bacteriana y, por tanto, en la colonización de células epiteliales y fibroblastos y en la formación y mantenimiento de la placa subgingival; con respecto a esto último caben destacar los procesos agregativos de *P. gingivalis* con *A. actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) y *Actinomyces naeslundii* (*A. naeslundii*).
 - b) La endotoxina asociada al lipopolisacárido (LPS).
 - c) Formar vesículas superficiales que se liberan con facilidad del resto del soma celular; dichas vesículas atraviesan barreras impermeables a la célula completa y transportan, de esta forma, factores de virulencia que serían trasladados a distancia.³¹
- **Fimbrias.** Proteínas de la membrana externa que se comportan como adhesinas e intervienen en fenómenos de coagregación y adhesión a superficies epiteliales y dentales, en este último caso con la mediación de la saliva.^{30,32}
- **Proteasas.** *P. gingivalis* produce una amplia gama de enzimas proteolíticas; algunas se asocian a la membrana externa y otras se liberan al exterior o son

transportadas a distancia por las vesículas superficiales. Debido a estas proteasas, *P. gingivalis* obtiene nutrientes a partir de tejidos del hospedador provocando importantes daños tisulares; esto, además, favorece su multiplicación y su capacidad de penetración y diseminación. El efecto destructivo de estas enzimas se extiende también a elementos del sistema inmunitario, permitiendo la evasión bacteriana de la respuesta del hospedador. Se comprende que estas proteasas, al comportarse como agresinas e impedinas, desempeñen un papel fundamental en el surco gingival para producir periodontitis.³³⁻³⁵

En algunos estudios con animales se ha demostrado que la exposición a *P. gingivalis* es comparable a una dieta alta en colesterol en la inducción de aterosclerosis.³⁶⁻³⁸ De esta forma, existe evidencia que sugiere un papel importante para la infección de esta bacteria en enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares.

Se ha demostrado que un medio en el que se encuentra el patógeno periodontal *P. gingivalis* aumenta la hipertrofia y apoptosis de los cardiomiocitos mientras que este efecto no se observa con *A. actinomycetemcomitans* y *P. intermedia*. Se sugiere que la activación de las vías de señalización de p38 y ERK son inducidas a través del medio condicionado con *P. gingivalis* y de esta forma se activan las vías de apoptosis dependiente de mitocondrias llevando a la muerte celular en cultivo de células de miocardio H9c2.^{39,40} Además se ha encontrado que solo la hipertrofia de células miocárdicas se da a través de las vías de señalización de las MAPKs, PI3K, y calcineurina, y que la actividad de la MMP-9 inducida por *P. gingivalis* se da de una forma alterna a estas vías de señalización.⁴¹

1.3. *Streptococcus sanguinis* Y LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

Los estreptococos del grupo viridans son comúnmente comensales de la cavidad oral y pueden contribuir con el desarrollo de la caries dental. Ocasionalmente

pueden tener acceso al sistema vascular y provocar EI. Estudios en modelos animales de endocarditis mostraron la habilidad que presenta *S. sanguinis* para adherirse a las plaquetas e inducir su activación, lo cual se relaciona con un aumento en la severidad de la enfermedad.⁹

Un componente bacteriano importante en la agregación plaquetaria de forma dependiente y complementaria de anticuerpo es la proteína M, la cual se ha indentificado en los estreptococos del grupo A. Más adelante se encontró que la proteína M de *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*) y *S. sanguinis* es indispensable para la agregación plaquetaria relacionada con estas bacterias.⁴²

Por otra parte, un componente tipo colágeno de *S. sanguinis*, que también fue implicado en la agregación plaquetaria, se describió como proteína de agregación asociada a plaquetas (PAAP). Gong y colegas reportaron que PAAP interactúa con las proteínas membranales de plaquetas de 175 kDa y 230 kDa para mediar la agregación y unión a plaquetas.^{43,44}

Se ha encontrado que *S. sanguinis* requiere de la interacción de la inmunoglobulina G (IgG) con el receptor plaquetario FcγRIIIa para mediar la agregación plaquetaria. Sin embargo aún no es claro la asociación entre los niveles de IgG, los polimorfismos de FcγRIIIa y la variabilidad del donador.⁴⁵

1.4. ENDOCARDITIS Y BACTERIAS ORALES

La endocarditis infecciosa (EI) es una de las enfermedades cardiovasculares que tienen una asociación con los padecimientos bucales. Durante los últimos 30 años, el total de incidencia de EI se ha mantenido entre 2 a 6 individuos por cada 100,000 habitantes en la población en general por año,⁴⁶⁻⁵¹ y la mortalidad asociada se ha mantenido entre el 10% y el 30% dependiendo del tipo de patógeno (por ejemplo estreptococos bucales son menos agresivos que el *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)),⁵² la condición subyacente y si la infección ocurre en válvulas cardiacas

nativas y protéticas.⁵³ Mientras que los estreptococos que se encuentran en la cavidad oral son los patógenos más predominantes en la EI,^{48,49,54,55} el *S. aureus* y los estafilococos coagulasa negativos (principalmente *S. epidermidis*) se encuentran más a menudo en consumidores de drogas intravenosas, en pacientes con prótesis valvulares, y en aquellos pacientes con un estado de salud que aumente el riesgo de desarrollar EI.^{47,56-58} Además, se ha encontrado una mayor presencia de estreptococos del grupo D (principalmente *Streptococcus gallolyticus*, anteriormente conocido como *Streptococcus bovis*) en pacientes con EI de edad avanzada y una relación importante con otra patología como lo son los tumores de colon. Las principales características clínicas de la endocarditis infecciosa se presentan en la Figura 4.^{47-49,59,60}

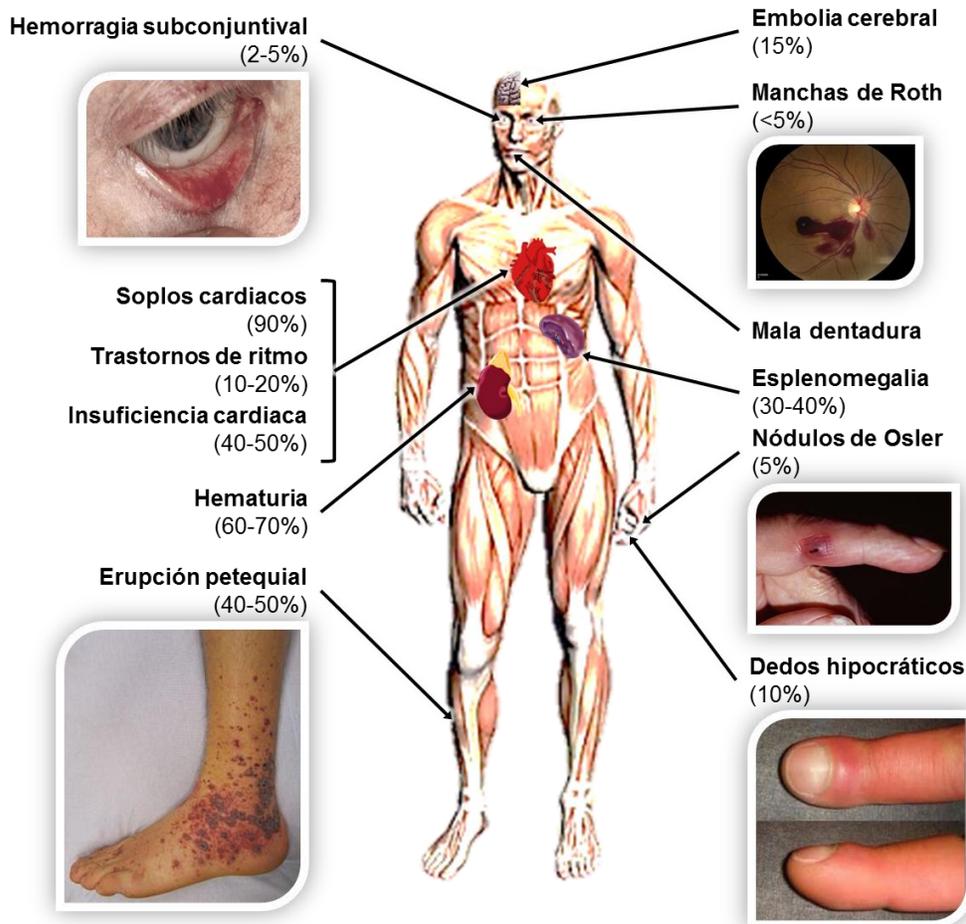


FIGURA 4 | Características clínicas de la endocarditis infecciosa. Las manifestaciones clínicas de la EI se pueden presentar en diversas regiones del cuerpo dependiendo de la colonización de las vegetaciones provenientes de la lesión de la válvula cardiaca.⁴⁷⁻⁴⁹

El primer paso en la patogénesis de la EI es la colonización de las válvulas dañadas por las bacterias que circulan en la sangre. Las lesiones físicas del endotelio de las válvulas resultan en la exposición de las proteínas de la matriz extracelular subyacente, la producción de factor tisular, y la deposición de fibrina y plaquetas, como una parte del proceso normal de curación lo cual favorece la adhesión bacteriana y la infección.⁶¹

Los patógenos más frecuentes en la EI son las bacterias Gram positivas *S. aureus*, *Streptococcus* spp., y los enterococos siendo los responsables de más del 80% de todos los casos de EI (Tabla 2).⁶¹ Estas bacterias también tienen una mayor capacidad para adherirse y colonizar las válvulas dañadas,⁶¹ están equipadas con adhesinas superficiales que median la unión con las proteínas de la matriz extracelular del huésped. Las adhesinas incluyen tanto proteínas y polisacáridos, y se denominan colectivamente como componentes de la superficie microbiana que reaccionan con moléculas adhesivas de la matriz (MSCRAMMs).⁶²

TABLA 2 | Microbiología de la EI en grupos específicos de pacientes.⁶¹

Patógeno	Válvula nativa			Válvula protésica		
	% en aquellos con EI adquirida de la comunidad (n=1,065)	% en aquellos con EI asociada con salud (n=557)		% en consumidores de drogas intravenosas con EI (n=237)	% en aquellos con EI temprana (n=53)	% en aquellos con EI tardía (n=331)
		Nosocomial (n=303)	No nosocomial (n=254)			
<i>Staphylococcus aureus</i>	20	47	42	68	36	18
Estafilococos coagulasa negativos	6	12	15	3	17	20
Enterococos	9	14	17	5	8	13
<i>Streptococcus viridans</i>	28	11	6	10	2	10
<i>Streptococcus bovis</i>	10	3	3	1	2	7
HACEK	3	0	0	0	0	2
Hongos	0	2	2	1	9	3
Otros	14.6	7.5	10	3	6	14
Cultivo sanguíneo negativo	11	5	6	5	17	12

HACEK, *Hemophilus parainfluenzae*, *H. aphrophilus*, *H. paraphrophilus*, *H. influenzae*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens*, *Kingella kingae* y *K. denitrificans*; EI, endocarditis infecciosa.

En animales con vegetaciones en la válvula aórtica con catéteres, se demostró experimentalmente también la importancia de la bacteriemia transitoria con manipulación dental. Tanto la magnitud de la bacteriemia durante procedimientos dentales y la capacidad de los patógenos para adherirse a las válvulas dañadas fueron importantes. De una gran variedad de microorganismos gingivales que circulan en la sangre después de la manipulación dental, sólo aquellos capaces de unirse a las válvulas dañadas (*Streptococcus* sp. y *S. aureus* principalmente) producen EI.⁶³

La bacteriemia transitoria también se produce durante actividades normales como la masticación y el cepillado de dientes. Estos casos de bacteremia son generalmente de bajo grado y corta duración (1-100 UFC/ml de sangre durante menos de 10 min),⁶⁴ pero son recurrentes. La exposición acumulativa de las bacterias circulantes (en UFC/ml de sangre por año) se ha calculado que es 100,000 veces mayor durante actividades fisiológicas que después de una simple extracción dental,^{65,66} lo cual podría explicar porque la mayoría de los casos de EI ocurren independientemente de los procedimientos quirúrgicos médicos.⁶⁷

2. MECANISMOS CELULARES Y MOLECULARES DE LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR ASOCIADA CON BACTERIAS ORALES

La flora bucal está confinada en su gran mayoría en asociación con la lengua, encías, membranas mucosas y dientes.¹ Procedimientos dentales como la extracción dental, cirugía periodontal, curetajes, e incluso el cepillado de los dientes por lo general llevan a la presencia de bacterias orales en la circulación sanguínea.⁶⁸ Las bacteremias dentales asociadas con la periodontitis son factores de riesgo para enfermedades coronarias del corazón e infarto.¹¹ Las células inflamatorias y los mediadores inflamatorios (el factor de necrosis tumoral alfa [TNF- α], la interleucina 1 beta [IL-1 β], y la prostaglandina E₂ [PGE₂]) juegan un papel importante en enfermedades coronarias del corazón y la aterosclerosis.⁶⁹⁻⁷²

2.1. CARDIOMIOCITOS Y RESPUESTA INFLAMATORIA INDUCIDA POR BACTERIAS: PAMPs.

Estudios recientes indican que el miocardio adulto de mamíferos posee un sistema inmune innato funcionalmente intacto. Cabe mencionar en primer lugar que existe suficiente evidencia acerca de que los mediadores y efectores de la respuesta inmune innata incluyendo, citocinas proinflamatorias, óxido nítrico (NO), y quimiocinas se expresan en el corazón adulto de mamíferos en respuesta a patrones moleculares asociadas a patógenos (PAMPs), como el LPS y partículas virales. En segundo lugar, se sabe que el corazón expresa por lo menos cuatro receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) para PAMPs.⁷³ Dentro de estos PRR podemos mencionar que los receptores tipo Toll (TLRs) son los principales responsables en iniciar la respuesta inflamatoria que preceden a los signos clínicos de sepsis y el choque séptico después de la unión de productos de la degradación

bacteriana como el LPS o DNA bacteriano.^{74,75} Se ha demostrado en ensayos *in vivo* e *in vitro* que estos productos bacterianos son capaces de inducir la inflamación cardíaca acompañada de una significativa reducción de la contractilidad de cardiomiocitos en diferentes modelos animales. Estos hallazgos soportan el hecho de que células somáticas, como los cardiomiocitos, expresan TLRs y modulan la respuesta inflamatoria junto con las células inmunes.⁷⁶⁻⁷⁸

Uno de los órganos vitales que son afectados en el choque séptico es el corazón.⁷⁹ Se sabe que el choque séptico, caracterizado por la inflamación sistémica en respuesta a una producción excesiva de citocinas y colapso cardiovascular, es desencadenado por los PAMPs que son reconocidos por los PRRs,⁸⁰ como los TLRs, y activan la respuesta inmune innata a través de la señalización de NF- κ B,⁸¹ así como a través de la familia de las MAPKs.^{82,83} Los eventos de señalización postreceptor que llevan a las respuestas de estrés y la producción de citocinas son sensibles a cambios de redox y los productos provenientes de la peroxidación lipídica. De esta forma se ha encontrado que la aldosa reductasa media la inflamación y cardiomiopatía inducida por endotoxina.⁸⁴

El fallo de contracción miocárdica ocurre en un 24 a 44% de los pacientes con choque séptico.⁸⁵ A pesar de que existen escasos reportes de los mecanismos patogénicos, se ha establecido que las citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-1 β son potentes efectores cardiodepresores.⁸⁶ Hallazgos recientes indican que el corazón expresa varios TLRs, incluyendo al TLR2, TLR4, y TLR6.^{87,88} Esto implica que el corazón puede censar los PAMPs bacterianos para montar su propia respuesta inmune y promover su propia disfunción.⁸⁹ De hecho existen estudios reportando que el LPS de bacterias Gram-negativas inducen la inflamación miocárdica y la disfunción cardíaca por la interacción con sus ligandos, CD14 y TLR4, en cardiomiocitos.^{90,91} Otro PAMP bacteriano como la flagelina, la cual también es liberada substancialmente y es la principal proteína del flagelo bacteriano, puede provocar la respuesta inmune a través de la unión a su receptor específico, TLR5, expresado en células inmunes y epiteliales lo cual se ha visto que

induce inflamación sistémica en roedores, y circula en concentraciones significantes en el plasma de pacientes con choque séptico.⁹²⁻⁹⁵

Se ha investigado el efecto de puntos de mutación en TLR4 en la inflamación cardiaca en un modelo de choque endotóxico.⁷⁸ La presencia de LPS induce un incremento rápido en la expresión del ARNm de TNF- α e IL-1 en ratones. En contraste, la respuesta del LPS en ratones C3H/HeJ (deficientes de TLR4) se encontró disminuida y retrasada significativamente. Los niveles de TNF e IL-1 dentro del miocardio después del estímulo con LPS fue significativamente más alto en ratones control. De la misma manera, la actividad de la NO sintasa y la producción de NO en el miocardio fue significativamente más alto en los ratones control. La activación miocárdica de NF- κ B se observó dentro de los 30 min del estímulo con LPS en ratones, pero no se observó el mismo efecto en ratones deficientes de TLR4. Estos hallazgos indican que la señalización de TLR4 es responsable, por lo menos en parte, de la inducción de mediadores pro-inflamatorios en el corazón durante el choque séptico.⁹⁶ Nemoto et al estudiaron si la participación del TLR4 era crítico para el desarrollo de la disfunción miocárdica inducida por el LPS *in vivo*. Tras la administración de LPS, los ratones deficientes de TLR4 y los ratones control se sometieron a ecocardiogramas comparativos antes y 6 horas después de la administración de LPS. La presencia del LPS resultó en una disminución significativa de los índices de fase de expulsión de la función contráctil (porcentaje de acortamiento fraccional y velocidad de acortamiento circunferencial de fibra) en ratones de tipo silvestre, mientras que no se observaron cambios significativos de estos parámetros en los ratones deficientes en TLR4. Esta observación sugiere que TLR4 activa vías de señalización corriente abajo que son responsables de la mediación de la disfunción ventricular izquierda inducida por LPS.⁹⁷

Por otra parte el ácido lipoteicoico es un factor patogénico de las bacterias Gram-positivas y contribuye significativamente con la disfunción orgánica en la sepsis, una complicación frecuente en pacientes de cuidados intensivos. La exposición con LTA durante 24 hrs. resulta en una significativa disminución de calcio

transitorio así como el acortamiento del sarcomero comparado con los controles. Se ha encontrado que el LTA afecta más comúnmente el flujo de calcio de los cardiomiocitos lo cual lleva a una reducción del calcio intracelular. Funcionalmente, un efecto temprano del estímulo del LTA con un contractilidad aumentada de los cardiomiocitos puede deberse a una reflexión *in vitro* de las fases tempranas hiperdinámicas de la sepsis clínica.⁹⁸

2.2. ENDOTOXINAS BACTERIANAS: LIPOPOLISACÁRIDO Y ÁCIDO LIPOTEICOICO

Las endotoxinas como el LPS de bacterias Gram-negativas son iniciadores de la inflamación a nivel tanto local como sistémico. Las moléculas de LPS están localizadas en la parte exterior de membrana externa. El segmento más conservado de la estructura es el lípido A. El lípido A está unido a través de una región O específica de cadena lateral, la cual es típicamente heterogénea en longitud y muy variable en estructura de una bacteria a otra. Un estudio realizado con el motivo lípido A sintetizado químicamente demostró que la actividad endotóxica del

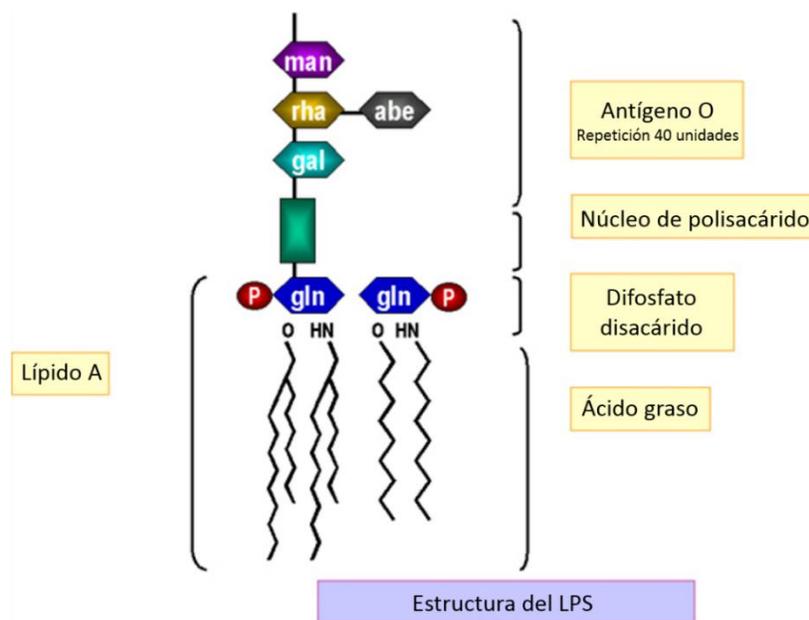


FIGURA 5 | Estructura del lipopolisacárido. El LPS conformado del antígeno O, núcleo de polisacárido, difosfato disacárido, ácido graso y el lípido A.¹⁰⁰

LPS es derivada de este motivo. La estructura del LPS de bacterias Gram-negativas incluye además del lípido A una cola de ácido graso hidrofóbico y una cabeza polar de azúcares fosfatados (Fig. 5).⁹⁹

El LPS de *P. gingivalis* se ha considerado como un importante componente patogénico en la iniciación de la enfermedad periodontal, debido a que el LPS bacteriano es considerado como un potente estimulador de la producción de citocinas inflamatorias y resorción de hueso.^{101,102}

El LPS bacteriano inicia la expresión de IL-1 β , que impide la fibrinólisis pero facilita la coagulación y la trombosis.¹⁰³ Las aortas dañadas están asociadas con un gran número de macrófagos secretando TNF- α e IL-1 β .⁷⁰ Estas citocinas desencadenan tanto la acumulación de colesterol en macrófagos y la proliferación de músculo liso, lo cual presumiblemente resulta en el engrosamiento de las paredes vasculares.⁶⁹ De esta forma la activación de la vía LPS–macrófago–mediador inflamatorio está implicado como un importante mecanismo en la patogénesis de la enfermedad coronaria del corazón y la aterosclerosis.¹¹

La respuesta inflamatoria en la enfermedad periodontal es marcada.¹⁰⁴ Los macrófagos dentro del periodonto responden al LPS de los organismos de la placa secretando importantes mediadores pro-inflamatorios, como el TNF- α , IL-1 β , PGE₂ y tromboxano A₂ (TxA₂), que no sólo causan efectos dañinos en el periodonto, sino también se pueden presentar sistémicamente.^{11,104} Así, la enfermedad periodontal, como la enfermedad isquémica del corazón, involucra la activación de la vía mediada por la inflamación LPS – macrófago.¹¹ La periodontitis es acompañada por una fuerte respuesta sistémica humoral de anticuerpos para antígenos específicos y para la endotoxina de patógenos orales.¹⁰⁵ La respuesta sistémica resulta de la penetración de bacterias en los tejidos, la pérdida de la integridad del epitelio del surco gingival, y/o lo trascendental de la bacteremia dental. Se ha demostrado que las endotoxinas de los microorganismos de la placa son capaces de penetrar el tejido gingival y está presente en cantidades suficientes para traer anticuerpos específicos a LPS en una respuesta sistémica, indicando la presencia de cantidades apreciables de LPS específico de periodontopatógenos.¹⁰⁶

Los LPS son los principales componentes de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, lo que las hace blancos primarios para el reconocimiento por el sistema inmune. Las respuestas de defensa del huésped al LPS incluyen la expresión de una variedad de citocinas proinflamatorias, como TNF- α e IFN- β , y también otras proteínas proinflamatorias como el óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS). La comprensión del sistema de transducción del LPS es una clave importante en el esfuerzo de proveer una base molecular para los efectos letales del LPS durante un choque séptico. El receptor para el LPS es el receptor tipo Toll 4 (TLR4). La formación del complejo del receptor en respuesta al LPS, consiste en la dimerización del TLR4 y MD-2. Una respuesta temprana, que es dependiente en la proteína del gen 88 de respuesta primaria a diferenciación mieloide (MyD88) y el adaptador tipo MyD88 (Mal), lleva a la activación del factor nuclear- κ B (NF- κ B). Una respuesta tardía al LPS hace uso del dominio homólogo al receptor Toll/IL-1 (TIR) que contiene a otras proteínas adaptadoras, y lleva a la activación tardía de NF- κ B y del factor de transcripción regulador de interferón 3 (IFN3), y la inducción de citocinas, quimiocinas, y otros factores de transcripción.¹⁰⁷

Existe evidencia que sugiere que el LPS participa en la respuesta inflamatoria en el sistema cardiovascular y en la hipertrofia cardíaca. Se ha encontrado que el tratamiento de células H9c2 con LPS induce respuestas hipertróficas patológicas como el aumento del tamaño de las células, la reorganización de los filamentos de actina, y la sobrerregulación de marcadores de hipertrofia incluyendo al péptido atrial natriurético (ANP) y el péptido natriurético tipo B (BNP) en células H9c2. Además, el tratamiento con LPS promueve significativamente la activación de GATA-4 y la translocación nuclear de NFAT-3, los cuales actúan como factores que median el desarrollo de la hipertrofia cardíaca.¹⁰⁸

Por otra parte, una profunda disfunción cardiovascular es causa importante de la mortalidad por choque séptico. Las MAPKs son importantes en la transducción de señales mediadoras de la inflamación en donde la señalización de las proteínas G modulan la respuesta cardíaca a estrés. Usando la línea celular H9c2 se ha estudiado la interacción de las MAPK y la señalización de proteínas G en un modelo

de sepsis. Se ha encontrado que la producción de citocinas proinflamatorias estimuladas por el LPS es fuertemente exacerbada por el uso de siRNA para las MAPK.¹⁰⁹

Los peptidoglucanos y el ácido lipoteicoico (LTA) son dos de los principales componentes de las bacterias Gram-positivas que tienen actividades relacionadas con el desarrollo de sepsis. Se han identificado tres eventos ocasionados por bacterias Gram-positivas y que conducen a la liberación de citocinas por parte de diferentes células del hospedero como macrófagos y células dendríticas. El primero se produce por presencia de componentes provenientes de las bacterias Gram-positivas, seguida de la interacción con receptores presentes en las células inmunes y finalmente por la activación de mecanismos de transducción que conducen a la expresión de moléculas proinflamatorias. El LTA es un componente único de la pared celular de las bacterias Gram-positivas, es un polímero de glicerol-fosfato que contiene azúcar y dos grupos acilo, estos últimos le confieren la propiedad en la membrana celular. El TLR2 reconoce una gran variedad de componentes microbianos, entre los que se encuentran las lipoproteínas y lipopéptidos de varios patógenos, péptidoglucano y el LTA de bacterias Gram-positivas.¹¹⁰

Entre las vías de transducción activadas en respuesta al tratamiento con LTA se encuentran la de las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPKs) y la de fosfatidilino-sitol-3 cinasa (PI3K). En la sepsis en humanos la activación de MAPKs está implicada en la granulocitosis y permite de esta forma restaurar la función inmune en sepsis.¹¹⁰

2.3. RECEPTORES TIPO TOLL

Los receptores tipo Toll (TLR) son una familia de proteínas membranales que sirven como receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) de una gran variedad de microbios y estimulan las respuestas de la inmunidad innata a los microbios que presentan estas moléculas. La primera

proteína en ser identificada en esta familia fue la proteína de *Drosophila* Toll. Hasta ahora se han descubierto 10 diferentes TLRs en los mamíferos con base a la homología de secuencia de los Toll de la *Drosophila*, y son nombrados del 1 al 10, pero puede ser existan más miembros de la familia. Todos estos receptores contienen en su dominio extracelular con repeticiones ricas en leucina flanqueados por motivos característicos ricos en cisteína en sus regiones extracelulares, un dominio transmembranal y un dominio TIR en su región citoplasmática, la cual es esencial para la señalización. En la figura 7 se muestra la estructura de los TLRs.¹¹¹

Los TLRs de los mamíferos están involucrados en la respuesta a tipos muy divergente de moléculas que son comúnmente expresados en células microbianas pero no mamíferas. En la tabla 3 se ejemplifican algunos ejemplos de PAMPs que se pueden asociar a los diferentes TLRs.¹¹¹

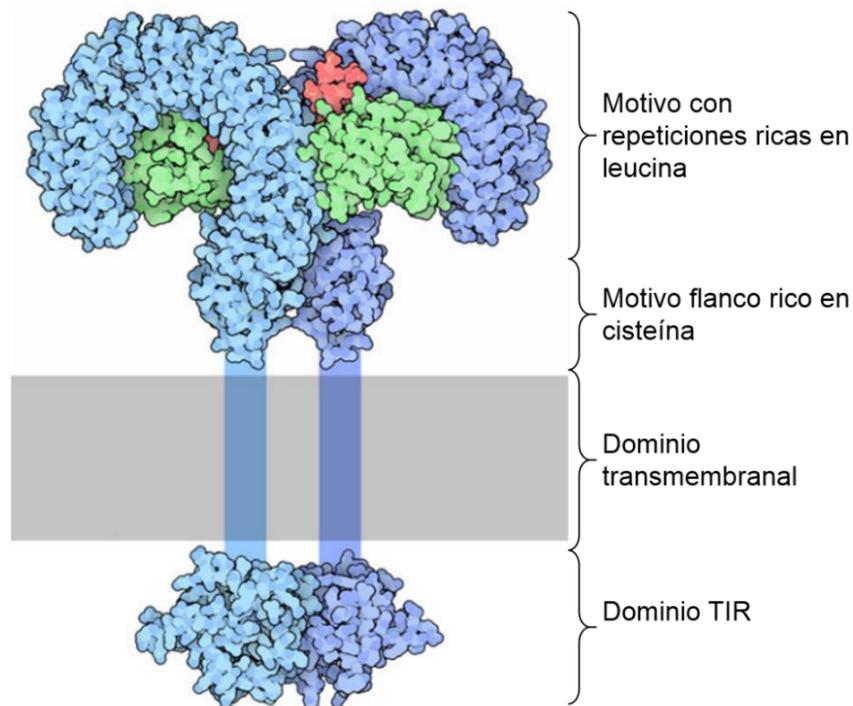


FIGURA 6 | Estructura de los receptores tipo Toll. Los TLRs están constituidos por un dominio extracelular que presenta un motivo con repeticiones ricas en leucina y un motivo flanco rico en cisteína; el dominio transmembranal; y el dominio intracelular o también conocido como dominio TIR.¹¹²

TABLA 3 | Receptores tipo Toll y sus ligandos.¹¹¹

TLR	Ligando	Procedencia
TLR2	Lipoproteínas	Bacteria
	Peptidoglucano	Bacteria Gram positiva
	Zimozano	Fungi
	LTA	Bacteria Gram positiva
	GPI	Tripanosomas
	Lipoarabinomanano	Micobacteria
	Fosfatidilinositoldimanosado	Micobacteria
TLR3	Doble cadena de ARN	Virus
TLR4	LPS	Bacteria Gram negativa
	HSP60	Clamidia
TLR5	Flagelina	Varias bacterias
TLR9	CpG	Bacterias, protozoarios

La especificidad de los TLR también está influenciada por varias moléculas de adaptación que no son TLR. Esto está completamente entendido para TLR4 y su ligando LPS. El LPS primero se une a la proteína soluble de unión al LPS (LBP) en la sangre o fluido extracelular, y este complejo sirve para facilitar la unión del LPS a CD14, el cual existe tanto como una proteína plasmática soluble y una proteína de unión membranal glicofosfatidilinositol en la mayoría de las células excepto en el endotelio. Una vez que el LPS se una al CD14, el LBP se disocia, y el complejo LPS-CD14 se asocia físicamente con el TLR4. Una proteína accesoria extracelular adicional llamada MD2 también se une al complejo con CD14. El complejo LPS/CD14/MD2 se requiere para la señalización inducida por el LPS, pero no está completamente claro si es necesario de una interacción física directa del LPS con el TLR4.¹¹¹

2.4. TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES DE LOS RECEPTORES TIPO TOLL

Las respuestas desencadenadas por las señales de transducción incluyen la regulación de la expresión génica, la regulación metabólica y la locomoción celular.

La vía de señalización predominante usada por los TLRs resulta en la activación de NF- κ B. En esta vía, el ligando que se une al TLR de la superficie de la célula lleva al reclutamiento de varias moléculas citoplasmáticas de señalización a través de interacciones específicas dominio-dominio. La primera proteína en ser reclutada es la proteína citoplasmática de adaptación MyD88, la cual contiene un dominio TIR que se une al dominio TIR del TLR. MyD88 también contiene un dominio muerte, homólogo al encontrado en las moléculas de señalización de la familia de los receptores a TNF. Una segunda proteína en reclutarse dentro del complejo de señalización es llamada cinasa asociada al receptor de IL-1 (IRAK). IRAK contiene un dominio muerte que media la interacción con el dominio muerte de MyD88, y activa al factor-6 asociado a TNF-R (TRAF-6). Luego TRAF-6 activa la cascada de la cinasa I κ B, la cual lleva a la activación de NF- κ B. Esta misma vía está involucrada en la inducción de IL-1 e IL-18 por la activación de NF- κ B. En algunos tipos de células, ciertos TLRs también comprometen otras vías de señalización, como la cascada de las MAPKs, llevando a la activación del factor de transcripción AP-1.¹¹¹

Los genes que se expresan en respuesta a la señalización de proteínas codificadas por TLR son importantes en diferentes componentes de las respuestas de la inmunidad innata. Esto incluye citocinas inflamatorias (TNF- α , IL-1 e IL-12), moléculas de adhesión endoteliales (E-selectina), y las proteínas involucradas en mecanismos para matar microbios (iNOS). Los genes particulares expresados dependerán de la respuesta de tipo de célula.¹¹¹

El TLR4 se encuentra sobrerregulado en cardiomiocitos de paciente diabético. Se ha encontrado que el TLR4 puede regular el metabolismo de ácido graso cardiaco y la patogénesis de la enfermedad cardiaca diabética en ratón. Se demostró que los corazones de ratones NOD deficientes de TLR4 tiene una baja acumulación de triglicéridos en las etapas tempranas de la diabetes, lo cual se ha asociado con una reducción en los niveles de MyD88, la fosforilación de la MAPK p38, lipoproteína lipasa, y JNK pero un aumento en AMPK. El tratamiento con ácido oleico en cardiomiocitos H9c2 también lleva a una acumulación lipídica, la cual es atenuada por un pequeño RNA interferente de TLR4. La deficiencia de TLR4 en las

células disminuye a MyD88, fosfo p38, y la lipoproteína lipasa (LPL) inducido por ácido graso, sugiriendo que el TLR4 puede modular el metabolismo de lípido inducido por ácido graso en cardiomiocitos. Además, también la función cardíaca fue diferente tanto en animales NOD silvestres y NOD deficientes de TLR4 comparados con ratón no diabético de control, este déficit fue menor en los ratones NOD deficientes de TLR4.¹¹³

En el caso del TLR2 una vez que reconoce al LTA se produce un amplio espectro de señales intracelulares como la activación de la familia de las MAPKs, proteína cinasa B (PKB) y de la cinasa I κ B (IKK). El incremento de la actividad de estas cinasas consecuentemente activa a diversos factores de transcripción como NF- κ B (p50 y p65), AP-1, factor de respuesta a suero (SRF), proteína semejante a Ets (ELK), proteína de unión y aumento de CCAAT (C/EBP) y la proteína de fijación del elemento de respuesta a AMP cíclico (CREB). El primer evento que inicia la cascada de transducción consiste en la colocalización y agrupamiento de receptores y señales de transducción en la membrana plasmática.¹¹⁴

Se ha encontrado que en respuesta a la presencia de estreptococos β hemolíticos, se forma un complejo TLR2/TLR6/CD14 que recluta a la proteína adaptadora MyD88 la cual recluta a IRAK-1. IRAK-1 forma multímeros que se autofosforilan y reclutan a TRAF-6, a la cinasa activadores del factor de crecimiento transformante β -1 (TAK1). La activación de TAK1 promueve su liberación del complejo de multímeros y de esta forma activa a IKK y a MAP. La activación de IKK promueve la fosforilación, ubiquitinación y degradación en el proteosoma 26s de I κ B y la translocación al núcleo de NF- κ B. Por el otro lado la proteína cinasa MAP-b (MKKb) es responsable de la activación de las MAPK p38 y la cinasa terminal N-Jun (JNK). En presencia de la proteína adaptadora denominada intermediario conservado evolutivo de la vía de Toll (ECSIT) y MEK cinasa (1/MKK1), TRAF6 puede activar a la cinasa reguladora de la señal extracelular 1/2 (ERK 1/2). Sin embargo, ERK 1/2 también puede activarse por un mecanismo independiente de TRAF-6, que involucra a la forma atípica de la proteína cinasa C (PKC), la PKC ζ que está asociada a la acumulación de ácido fosfatídico lo que conlleva a la

activación de ERK 1/2. Finalmente, se ha demostrado también la activación de PI3K de una manera dependiente de PKB lo que conduce a la activación de NF- κ B.¹¹⁴

2.5. PROTEÍNA CINASA C Y EL CORAZÓN

La proteína cinasa C (PKC) es un grupo de proteínas cinasas serin/treonina relacionadas, que se clasifican como (1) las PKCs clásicas (α , β I, β II, y γ), enzimas dependientes de diacilglicerol (DAG) y calcio, (2) las PKCs nuevas (δ , ϵ , θ , y η), las cuales requieren de DAG, pero no de calcio, para su actividad, y (3) las PKCs atípicas (ζ , λ), las cuales no son estimuladas por el DAG o el calcio, pero estimuladas por otros segundos mensajeros derivados de lípidos. Estas cinasas regulan las respuestas celulares efectoras del huésped.¹¹⁵

En el corazón, la activación de las PKC lleva a cambios rápidos en la contractilidad y otros efectos como la remodelación ventricular. Los cardiomiocitos co-expresan múltiples isoformas de PKC, sin embargo se ha visto a PKC α como un blanco terapéutico muy atractivo debido a que es la isoforma más predominante en la mayoría de preparaciones de cardiomiocitos, y su expresión y/o su actividad aumentan en varios modelos de lesión cardíaca, hipertrofia, o fallo cardíaco.¹¹⁶⁻¹¹⁸

La lisofatidilcolina (LPC) es un potente proarrítmico derivado de la fosfatidilcolina de membrana, la cual se acumula en los tejidos cardíacos durante la isquemia cardíaca. Se ha encontrado que el LPC, induce la activación de PKC, y la fosforilación de PKC dependiente de la Conexina 43 (Cx43) en serina (Ser) 368. La LPC destruye la estructura y la función de uniones gap por la fosforilación en serina de Cx43 mediado por PKC ϵ .¹¹⁹

2.6. CICLOOXIGENASA-2

La ciclooxigenasa es una enzima regulatoria clave en el metabolismo eicosanoide, convirtiendo al ácido araquínódico libre en PGH_2 . Las prostaglandinas median la inflamación localmente y modulan respuestas fisiológicas sistemáticamente.¹²⁰ La ciclooxigenasa-2 (COX-2), enzima precursora particularmente de PGE_2 , es altamente inducible y esta generalmente presente en tejidos de los mamíferos a bajos niveles, pero puede incrementar uno o varios tipos de estímulos como citocinas o factores de crecimiento.¹²¹ Al parecer COX-2 tiene un papel doble en la inflamación: inicialmente induciendo el proceso inflamatorio y más tarde ayudando a su resolución.¹²²

2.7. INTERLEUCINA 1 BETA

La citocina interleucina-1 (IL-1) es un potente estimulador de la inflamación y está involucrada en la respuesta tardía del asma. Altos niveles de $\text{IL-1}\beta$, principalmente secretada por los macrófagos, se ha observado en secreciones broncoalveolares de pacientes asmáticos. La $\text{IL-1}\beta$ actúa induciendo a varios genes, incluyendo citocinas, quimiocinas, proteasas, moléculas de adhesión, y ciclooxigenasas. La extensión y expresión de estos genes son cruciales en la regulación de la intensidad del proceso inflamatorio. Muchos sistemas de señalización se han reportado usados en la respuesta de la inducción de IL-1. Avances recientes en la señalización de IL-1 sugieren que IL-1 activa por lo menos cuatro cascadas de proteínas cinasas.¹²³

F. Hipótesis

La activación de los receptores TLR 2 y 4 por el LTA *Streptococcus sanguinis* y el LPS de *Prophyromonas gingivalis*, respectivamente, promueven la inducción de COX-2 e IL-1 β a través de la activación diferencial y específica de cascadas de señalización dependientes de las MAPKs e isoformas de PKC en células H9c2.

G. Objetivos

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el efecto de las endotoxinas bacterianas LTA de *Streptococcus sanguinis* y el LPS de *Porphyromonas gingivalis* sobre la inducción de COX-2 e IL-1 β a través de las MAPKs y la familia de las PKCs en la línea celular H9c2.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar el efecto del LTA de *Streptococcus sanguinis* y el LPS de *Porphyromonas gingivalis* sobre la inducción de COX-2 e IL-1 β en la línea celular H9c2.
- Determinar el papel de las MAPKs sobre la inducción de COX-2 e IL-1 β por el LTA de *Streptococcus sanguinis* y el LPS de *Porphyromonas gingivalis* en las células H9c2.
- Determinar el papel de PKC sobre la inducción de COX-2 e IL-1 β a través del efecto inducido por el LTA de *Streptococcus sanguinis* y el LPS de *Porphyromonas gingivalis* en las células H9c2.

H. Materiales y métodos

Reactivos. Ácido lipoteicoico obtenido de *Streptococcus sanguis* y lipopolisacárido de *Porphyromonas gingivalis* se adquirieron en SIGMA; medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suero bovino fetal, reactivo y Super Script One-Step RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) se adquirieron en Invitrogen (Carlsbad, CA); anticuerpos contra COX-2, PKC- α , p-PKC- α (Ser 657), γ -tubulina y el reactivo de luminol se compraron en Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), quercetagina, los inhibidores SB203580, PD98059, and Calfostina C se adquirieron de Calbiochem (La Jolla, CA, USA).

Cultivo celular: La línea celular H9c2 derivada de cardiomiocitos de ratón neonatal se obtuvo de ATCC (CRL-1446) se cultivaron en medio Eagle Modificado por Dulbecco, suplementado con 2mM de L-glutamina, penicilina (100 U/ml)/estreptomina (100 mg/ml)/fungizona (1mg/ml) y 10% de suero bovino fetal. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂. Los cultivos se mantuvieron hasta su confluencia. Para el tratamiento con los inhibidores y el LTA o el LPS las células se sembraron en cajas de 6 pozos. Cuando alcanzaron la subconfluencia se incubaron con DMEM + 2% de SBF por 16 horas, al término se trataron a diferentes dosis y tiempos de LTA y LPS y cuando se usaron los inhibidores las células se preincubaron durante 30 min. con estos y después se trataron con el LTA o LPS.

Cuantificación de proteínas y RNAm: la cuantificación de proteínas se realizó por método de Bradford. La cuantificación de RNA se realizó por espectrofotometría y se calculó usando un volumen de 1 μ l de agua de grado molecular con el RNA aislado.

Ensayo de inmunoblot: los cardiomiocitos H9c2 (1x10⁶ células/pozo) se cultivaron en cajas de 6 pozos. Después del estímulo el medio se aspiró y las células se desprendieron con buffer de fosfatos salino (PBS) + 1 mM ortovanadato de sodio,

la muestra se centrifugó a 6,000 g durante 10' y la pastilla se colocó con 50 µl de buffer de lisis (0.05 M Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5 M PMSF, 10 µg/ml leupeptina, 0.4 mM ortovanadato de sodio, 10 mM de fluoruro de sodio y 10 mM de pirofosfato de sodio), todos estos reactivos se obtuvieron de Sigma Chemical Co. La muestra se sonicó (1s x 30) en un baño con hielo. Para el ensayo de Western se utilizaron 50 µg de proteína que se mezcló 1:1 con buffer de muestra 2x (20% glicerol, 4% SDS, 10% 2-mercaptoetanol, 0.05% azul de bromofenol y 1.25 M Tris-HCl pH 6.8; (todos los reactivos se obtuvieron de Sigma Chemical Co.), la muestra se cargó en un gel al 10% SDS-PAGE y se corrió a 40V por 2 h. Las proteínas celulares se transfirieron a una membrana de PVDF (Amersham) 1 hr a 0.3 amperes-y 5 V. Para verificar que se colocó igual concentración de proteína, las membranas se tiñeron con rojo de Ponceau (Sigma Chemicals Co.). Posteriormente la membrana se bloqueó con 150 mM NaCl, 100mM Tris- HCl pH 7.8 (TBST) y 5% de suero albúmina de bovino por 1 hr., se lavó y se incubó con el anticuerpo primario se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti ratón-policonal PKC- α (1:1000), anti cabra-policonal COX-2 (1:1000); ó anti cabra-policonal γ -tubulina (1:1000). Las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C y posteriormente se lavaron durante 3 ocasiones con TBST y se incubaron durante 2 hr con el anticuerpo secundario, HPR-conjugado anti-ratón IgG (1:1000) ó anti-cabra IgG (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology). Las bandas inmunoreactivas se revelaron utilizando el sustrato de quimio-luminiscencia (Santa Cruz Biotechnology) y la autoradiografía se obtuvo después de exponer la película durante 2 min. Los experimentos se realizaron en 5 ocasiones por separado. Las muestras se analizaron con el sistema digital Lab-Works.

Ensayo RT PCR: el RNA total se aisló de los cardiomiocitos con el reactivo TRIzol. Después, el RNA total (1µg) fue transcrito en forma reversa (RT) usando el equipo One Step RT-PCR (In vitrogen). La reacción de la polimerasa en cadena (PCR) se realizó utilizando los oligonucleótidos 5'CATGCAAGGAAGGGAAGTCTTTC3' (sentido codificante) y 5'ACAGGGAAGTCTGAAGCACTAG3' (Sentido anticodificante) derivado de COX-2; 5' GGCTGCAGTTCAGTGATCGTACAGG 3' (sentido codificante) y 5' AGATCTAGAGTACCTGAGCTCGCCAGTGAA 3' (sentido

anticodificante) derivado de IL-1 β y 5'-TCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3' (Sentido codificante) y 5'-AGATCCACAACGGATACATT-3' (Sentido anticodificante) derivado del gene de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GADPH). Las condiciones de la amplificación fueron las siguientes: desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento a 55°C por 1 min y extensión a 72°C por 1.5 min. El PCR se efectuó por 35 ciclos y como resultado del RT-PCR se obtuvo una banda sencilla de 309 pares de bases para COX-2, banda sencilla de 327 pares de bases para IL-1 β y una banda sencilla de 287 pares de bases para GADPH. La identidad del fragmento se caracterizó por su tamaño aparente en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Se realizaron tres experimentos por separado de cada tratamiento.

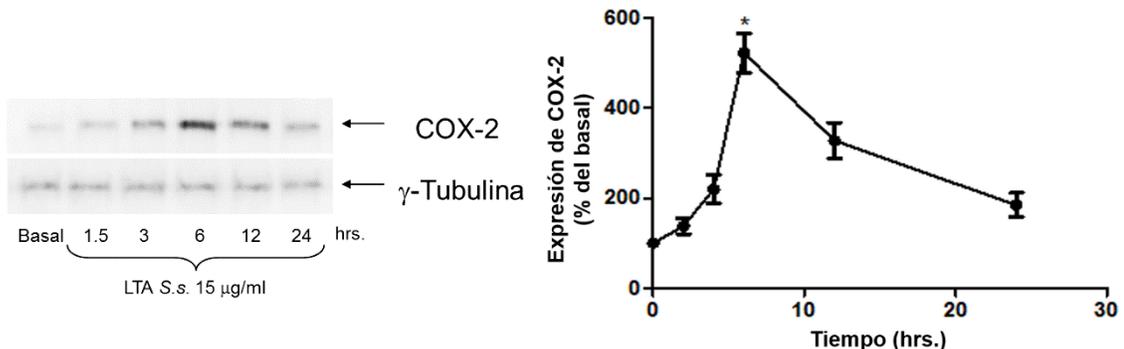
Método de Procesamiento de los datos: Programas de Cómputo Digilt Doc, Labs Work y Excel.

I. Resultados

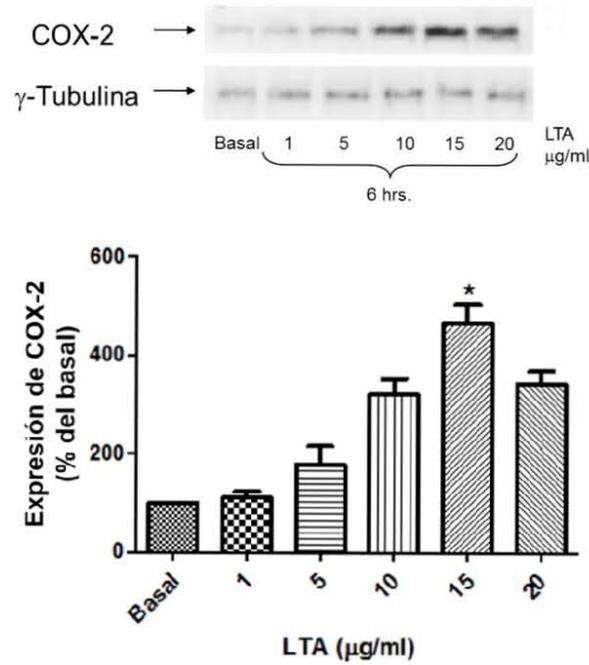
El LTA obtenido de *S. sanguinis* aumenta la expresión de COX-2 de forma dependiente de la dosis y el tiempo a través de MEK, JNK y PKC.

Para determinar el efecto que tiene el LTA de *S. sanguinis* sobre la expresión de COX-2 se estudió a través de dosis respuestas y cursos temporales para observar si la expresión de COX-2 es dependiente del tiempo y la dosis de la endotoxina. Se observó que la mayor expresión de COX-2 se presentó a las 6 hrs. de tratamiento y disminuyó a partir de las 12 hrs. (Fig. 7A). En cuanto a la dosis se observó que la mayor expresión de COX-2 se dio a una dosis de 15 $\mu\text{g/ml}$ de LTA de *S. sanguinis* (Fig. 7B) Para determinar la cinasa involucrada en la expresión de COX-2 se utilizaron los inhibidores específicos para MEK, p38, JNK y PKC que fueron PD98059, SB203580, SP600125 y Calfostina C respectivamente. Se observó que los inhibidores PD98059, SP600125 y Calfostina C tuvieron un efecto negativo en la expresión de COX-2 (Fig. 7C). De esta forma, podemos concluir que MEK, JNK y PKC están involucrados directamente en la expresión de COX-2 ya que los inhibidores específicos de estas cinasas disminuyeron la expresión de COX-2 a un nivel muy cercano del basal.

A



B



C

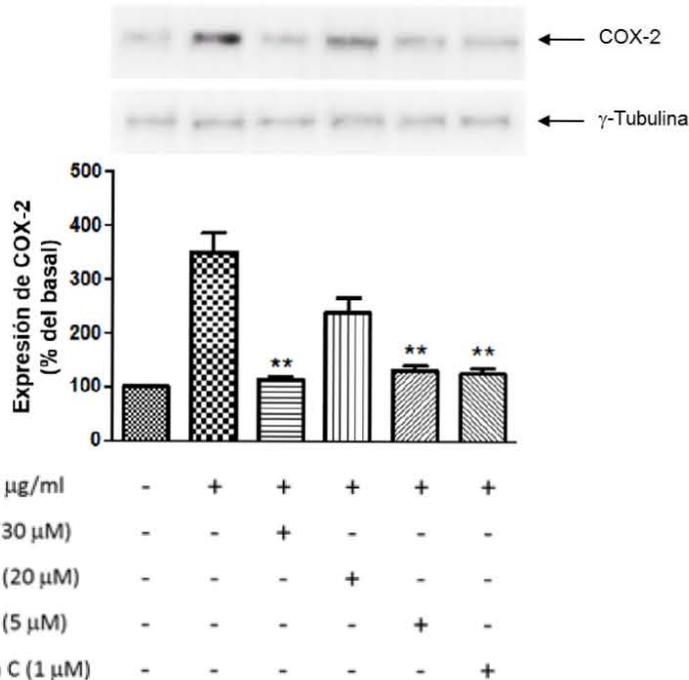


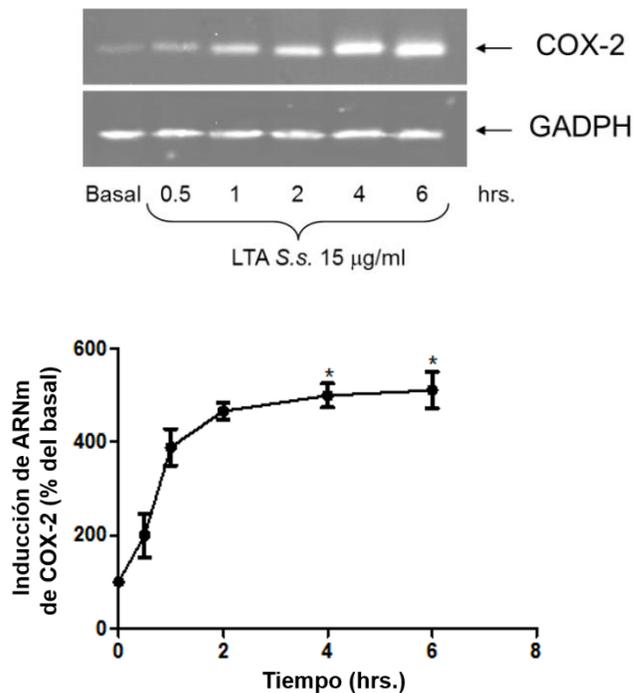
Figura 7. Curso temporal, dosis respuesta y efecto de los inhibidores de cinasas sobre la expresión de COX-2 por el LTA obtenido de *S. sanguinis* en H9c2. A) Las células H9c2 (1×10^6) se cultivaron en cajas de 6 pozos. Cuando alcanzaron la subconfluencia se incubaron en DMEM + 2% SBF por 16 horas, al término se trataron por diferentes periodos con LTA (15

$\mu\text{g/ml}$). B) Las células H9c2 se cultivaron en cajas de 6 pozos. Cuando alcanzaron la subconfluencia se incubaron por 16 hrs. en DMEM + 2% SBF se trataron con diferentes dosis de LTA por 6 horas. C) Las células se preincubaron durante 30 minutos con los inhibidores posteriormente se trataron con LTA por 6 hr. Al término la reacción se detuvo incorporando buffer de fosfatos salino frío y se utilizaron 50 μg de proteína que se separaron en un gel de poliacrilamida (10%) con dodecilsulfato de sodio y se transfirieron a membrana de PVDF. La expresión de COX-2 se evaluó utilizando anticuerpo específico. El anticuerpo contra γ -tubulina se utilizó como control. Se utilizó la técnica de quimioluminiscencia. Se realizaron tres experimentos por separado y se colocó una imagen representativa. Las imágenes se obtuvieron por el sistema Digi-Doct y se analizaron por el sistema Labs Work. * $p < 0.05$ en comparación del basal con la máxima expresión proteica de COX-2 y ** $p < 0.05$ en comparación de la máxima expresión proteica de COX-2 con el mayor efecto de los inhibidores sobre dicha expresión.

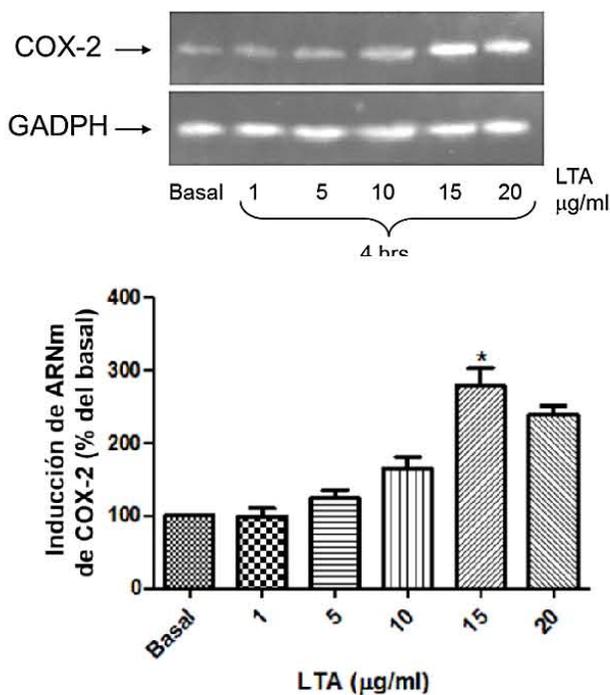
El LTA obtenido de *S. sanguinis* aumenta la inducción transcripcional de COX-2 a través de MEK, JNK y PKC.

Una vez definidas las condiciones a las cuales se presentaba una mayor expresión proteica de COX-2, se caracterizó a nivel transcripcional el efecto del LTA de *S. sanguinis* en H9c2. En los resultados pudimos observar que la mayor inducción de COX-2 se da a partir de las 4 hrs. de tratamiento y se mantuvo hasta las 6 hrs. (Fig. 8A). La máxima dosis para la inducción del ARNm de COX-2 se observó con 15 $\mu\text{g/ml}$ de LTA (Fig. 8B). Como se observó en la figura anterior se determinó que posible cinasa está involucrada en la inducción del ARNm de COX-2 utilizando los inhibidores PD98059, SB203580, SP600125 y Calfostina C. Se observó, como en la expresión proteica de COX-2, que PD98059, SP600125 y Calfostina C inhibieron la inducción del ARNm de COX-2 bajo el tratamiento con el LTA de *S. sanguinis* durante 4 hrs. (Fig. 8C). Esto nos sugiere que las cinasas MEK, JNK y PKC están involucrados en la regulación de la inducción transcripcional de COX-2 por el LTA de la bacteria de origen oral *S. sanguinis* en cardiomiocitos de ratón neonatal.

A



B



C

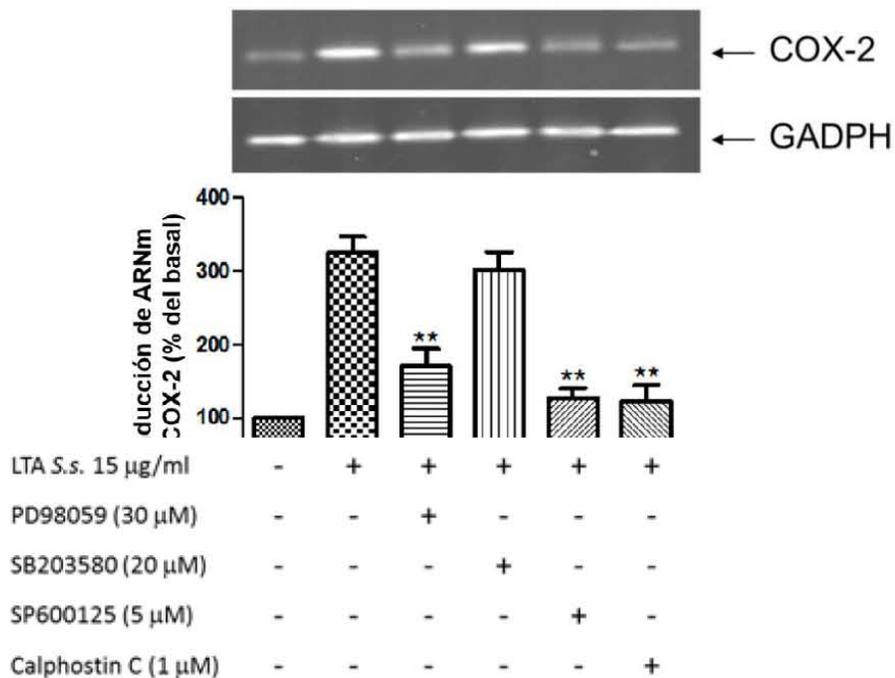


Figura 8. Curso temporal, dosis respuesta y efecto de los inhibidores de cinasas sobre la inducción transcripcional del ARNm de COX-2 por el LTA obtenido de *S. sanguinis* en H9c2. A) Las células H9c2 (1×10^6) se cultivaron en cajas de 6 pozos. Cuando alcanzaron la subconfluencia se incubaron en DMEM + 2% SBF por 16 horas, al término de la incubación se

trataron por diferentes periodos de tiempo con LTA (15 μ g/ml). B) Las células H9c2 se cultivaron en cajas de 6 pozos. Cuando alcanzaron la subconfluencia se incubaron por 16 hrs. en DMEM + 2% SBF y se trataron con diferentes dosis de LTA por 4 horas. C) Las células se preincubaron durante 30 minutos con los inhibidores posteriormente se trataron con LTA por 4 hr. Los experimentos se realizaron por triplicado y se colocó una imagen representativa. Se utilizó GADPH como control. Al término la reacción se aisló el RNA y se utilizó 1 μ g de RNA para el ensayo de RT-PCR, los geles se tiñeron con bromuro de etidio y las imágenes se obtuvieron por el sistema Digi-Doct y se analizaron por el sistema Labs Work. * $p < 0.05$ en comparación de basal con la máxima inducción transcripcional de COX-2 y ** $p < 0.05$ en comparación de la máxima inducción transcripcional de COX-2 con el mayor efecto de los inhibidores sobre dicha expresión.

MEK y JNK regulan la expresión de COX-2.

Una vez que se determinó que las cinasas MEK y JNK están involucradas en la regulación de la expresión de COX-2, se quiso comprobar si PD98059 y SP600125 inhibían el efecto del LTA sobre la expresión de COX-2 de una forma dependiente de la dosis del inhibidor. De esta forma se preincubaron las células a dos concentraciones diferentes de los inhibidores, una de las dosis por debajo de la IC₅₀ descrita para cada uno de los inhibidores (IC₅₀ PD98059, 10 μM; IC₅₀ SP600125, 5 μM). Observamos que la inhibición de la expresión de COX-2 fue dependiente la dosis de los inhibidores, lo cual corresponde con los resultados obtenidos en la figura 1 (Fig. 9).

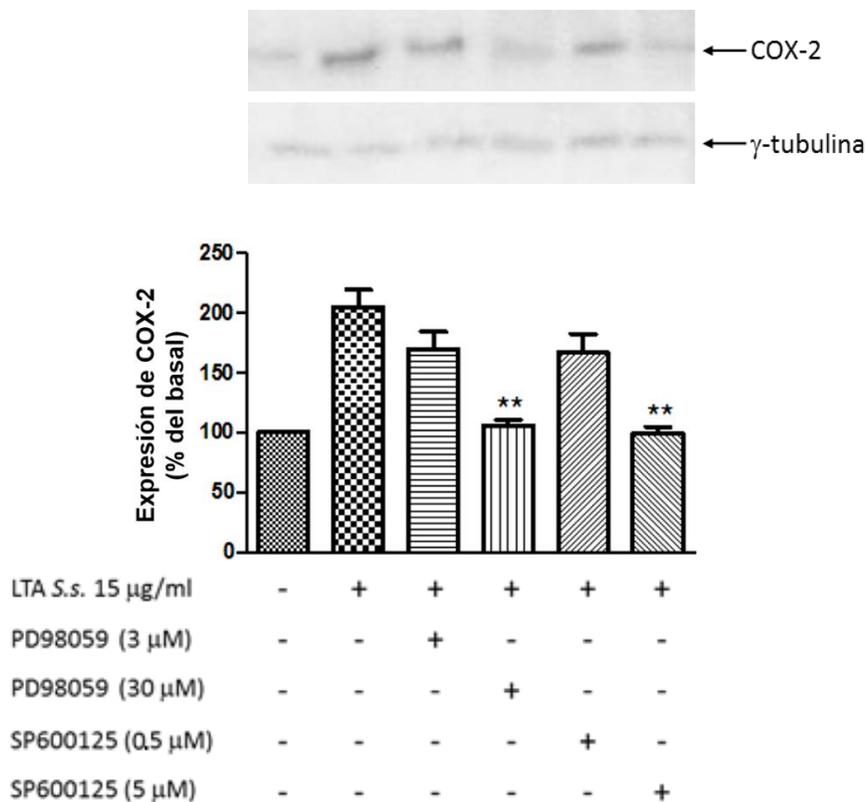
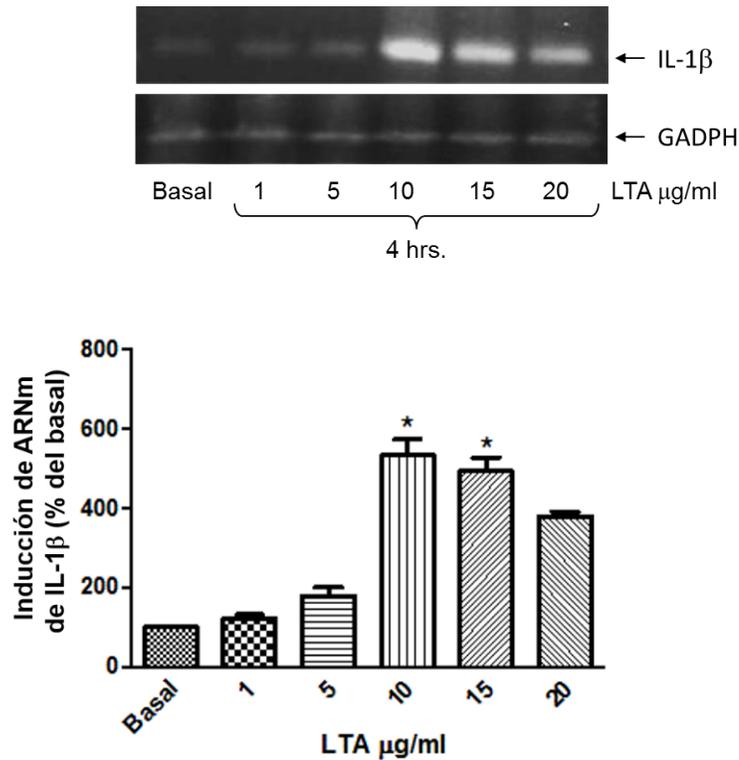


Figura 9. Papel de MEK y JNK en la regulación de la expresión de COX-2 a través de los inhibidores PD98059 y SP600125 sobre la expresión de COX-2 por LTA obtenido de *S. sanguinis* en H9c2. A) Las células H9c2 (1×10^6) se cultivaron en cajas de 6 pozos. Cuando alcanzaron la subconfluencia se incubaron en DMEM + 2% SBF por 16 horas, al término las células se preincubaron durante 30 minutos con los inhibidores, posteriormente se trataron con LTA por 6 hrs. Al término la reacción se detuvo incorporando buffer de fosfatos salino frío y se utilizaron 50 μg de proteína que se separaron en un gel de poliacrilamida (10%) con dodecilsulfato de sodio y se transfirieron a membrana de PVDF. La expresión de COX-2 se evaluó utilizando anticuerpo específico. Las imágenes se obtuvieron por el sistema Digi-Doct y se analizaron por el sistema Labs Work. ** $p < 0.05$ en comparación de la máxima expresión proteica de COX-2 con el mayor efecto de los inhibidores sobre dicha expresión.

El LTA induce el ARNm de IL-1 β a través de MEK y PKC.

Debido a la importancia que tiene la citocina IL-1 β como parte de la respuesta inflamatoria nos enfocamos a determinar el efecto que tiene el LTA de *S. sanguinis* sobre la inducción transcripcional del ARNm de IL-1 β y la cinasas involucradas en este evento. En este ensayo se procedió a determinar a nivel transcripcional el efecto del LTA de *S. sanguinis* en H9c2 observando que la mayor inducción de IL-1 β se dio a una dosis de 10 $\mu\text{g/ml}$ del LTA (Fig. 10A). También se determinó que cinasa está involucrada en la inducción de IL-1 β a nivel transcripcional utilizando los inhibidores PD98059, SB203580, SP600125 y Calfostina C. En nuestros resultados se encontró que principalmente PD98059 y Calfostina C inhibieron la inducción del ARNm de IL-1 β (Fig. 10B). De esta forma podemos concluir que las cinasas involucradas en inducción de IL-1 β por el LTA de *S. sanguinis* son MEK y PKC.

A



B

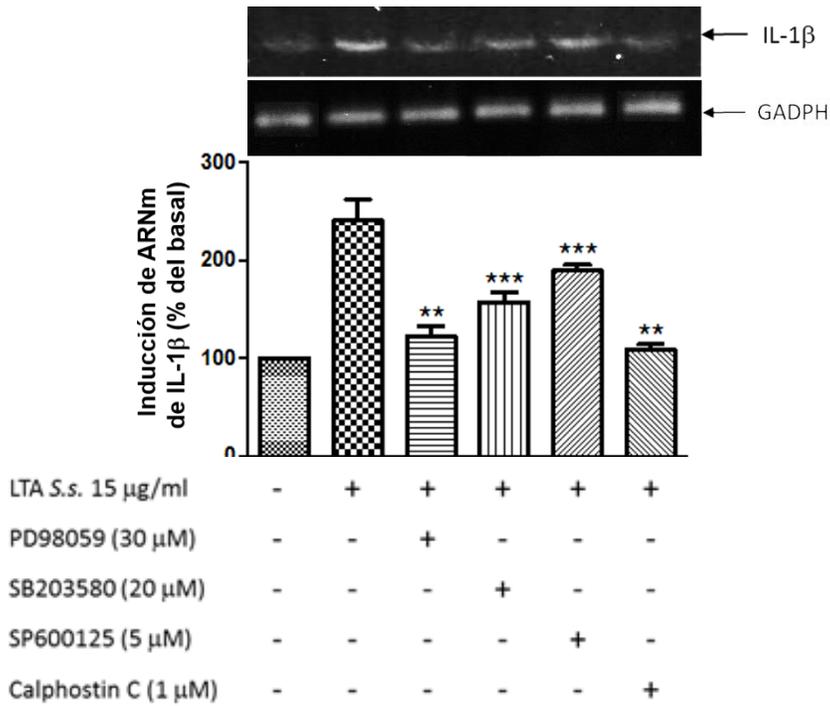


Figura 10. Dosis respuesta y efecto de los inhibidores de cinasas sobre la inducción del ARNm de IL-1 β por el LTA de *S. sanguinis* en H9c2. A) Las células H9c2 se cultivaron en cajas de 6 pozos. Cuando alcanzaron la subconfluencia se incubaron por 16 hrs. en DMEM + 2% SBF se trataron con diferentes dosis de LTA por 4 horas. B) Las células se preincubaron durante 30 minutos con los inhibidores posteriormente se trataron con LTA por 4 hr. Los experimentos se realizaron por triplicado y colocó una imagen representativa. Se utilizó GAPDH como control. Al término la reacción se aisló el ARN y se utilizó 1 μ g de ARN para el ensayo de RT-PCR, los geles se tiñieron con bromuro de etidio y las imágenes se obtuvieron por el sistema Digi-Doct y se analizaron por el sistema Labs Work. * $p < 0.05$ en comparación de basal con la máxima inducción transcripcional de IL-1 β , y ** $p < 0.05$ en comparación de la máxima inducción transcripcional de IL-1 β y *** $p > 0.05$ en comparación de la máxima inducción transcripcional de IL-1 β con el mayor efecto de los inhibidores sobre dicha expresión.

El LTA de *S. sanguinis* induce la fosforilación de PKC α de forma dependiente del tiempo.

Debido a que se observó que la inhibición de PKC disminuye la expresión de COX-2 por el efecto del LTA de *S. sanguinis* se estudió si la endotoxina promovía la fosforilación de la isoforma de PKC α de forma dependiente del tiempo. Nuestros resultados demostraron que la fosforilación de PKC α es dependiente del tiempo sobre el tratamiento con el LTA siendo su mayor fosforilación a los 5 min de tratamiento en las células H9c2 (Fig 11).

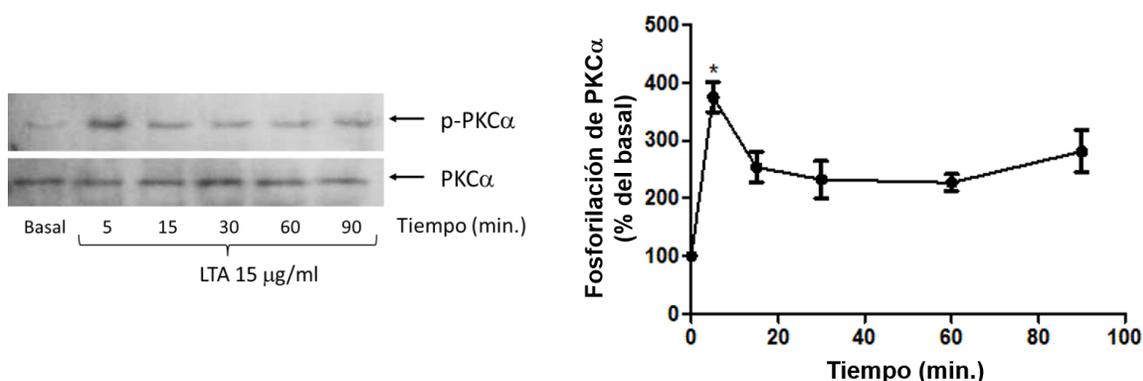
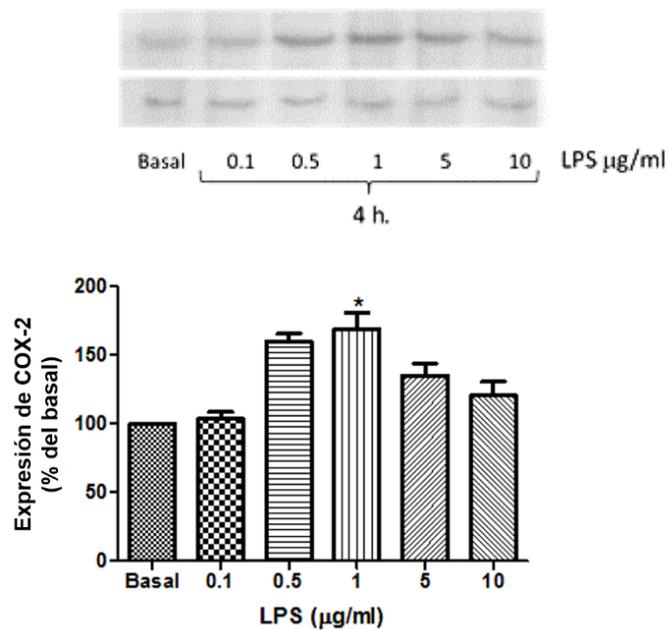


Figura 11. Curso temporal sobre la fosforilación de PKC α por el efecto del LTA de *S. sanguinis* en H9c2. Las células H9c2 se cultivaron en cajas de 6 pozos. Cuando alcanzaron la subconfluencia se incubaron por 16 hrs. en DMEM + 2% SBF se trataron con diferentes tiempos a una dosis de 15 μ g/ml de LTA. Al término la reacción se detuvo incorporando buffer de fosfatos salino frío y se utilizaron 50 μ g de proteína que se separaron en un gel de poliácridamida (10%) con dodecilsulfato de sodio y se transfirieron a membrana de PVDF. La fosforilación de PKC α se evaluó utilizando anticuerpo específico. Las imágenes se obtuvieron por el sistema Digi-Doct y se analizaron por el sistema Labs Work. * p < 0.05 en comparación de basal con la máxima expresión proteica p-PKC α .

El LPS obtenido de *P. gingivalis* aumenta la expresión de COX-2 a través de MEK y JNK.

A pesar de que se sabe muy bien la función que tiene el LPS en la producción de citocinas proinflamatorias y la prostaglandina PGE₂ en varios tipos celulares, aún no se sabe del papel del LPS de la bacteria oral *P. gingivalis* sobre la producción de citocinas proinflamatorias y PGE₂ en cardiomiocitos. Debido a esto, nos propusimos a determinar el papel del LPS de *P. gingivalis* en la expresión de la enzima precursora de PGE₂, COX-2. En nuestros resultados observamos que la mayor expresión de COX-2 se dio a una dosis de 1 µg/ml de LPS de *P. gingivalis* (Fig. 12A). Además, para determinar que posible cinasa está involucrada en la expresión de COX-2 por el LPS de *P. gingivalis* se utilizaron los inhibidores PD98059, SB203580, SP600125 y Calfostina C. Se observó que los inhibidores PD98059 y SP600125 tuvieron un efecto negativo en la expresión de COX-2 (Fig. 12B).

A



B

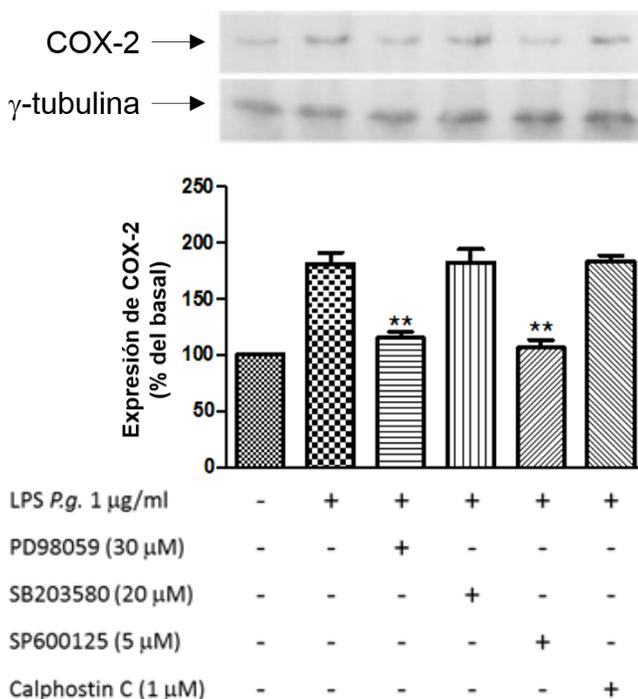
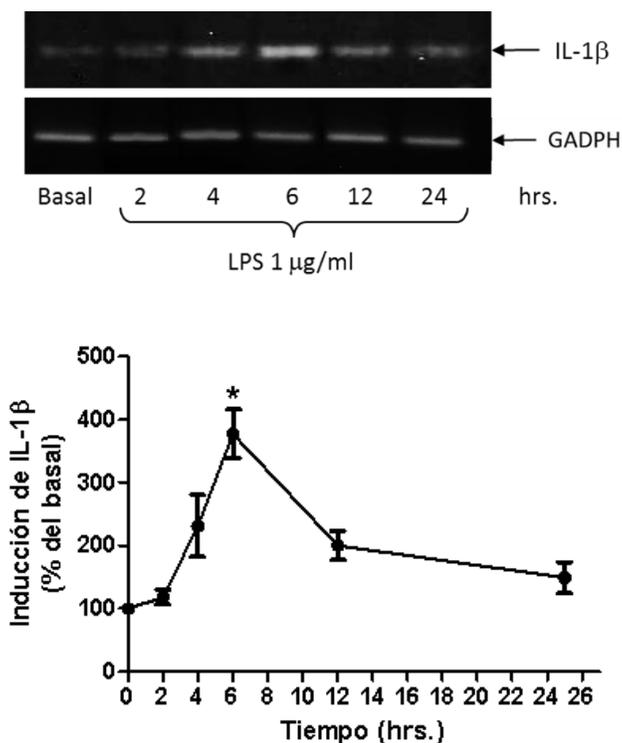


Figura 12. Dosis respuesta y efecto de los inhibidores de cinasas sobre la expresión de COX-2 por el LPS obtenido de *P. gingivalis* en H9c2. A) Las células H9c2 se cultivaron en cajas de 6 pozos. Cuando alcanzaron la subconfluencia se incubaron por 16 hrs. en DMEM + 2% SBF se trataron con diferentes dosis de LPS por 4 hrs. B) Las células se preincubaron durante 30 minutos con los inhibidores posteriormente se trataron con el LPS por 4 hr. Al término la reacción se detuvo incorporando buffer de fosfatos salino frío y se utilizaron 50 µg de proteína que se separaron en un gel de poliacrilamida (10%) con dodecilsulfato de sodio y se transfirieron a membrana de PVDF. La expresión de COX-2 se evaluó utilizando anticuerpo específico. El anticuerpo contra γ -tubulina se utilizó como control. Se utilizó la técnica de quimioluminiscencia. Se realizaron tres experimentos por separado y se colocó una imagen representativa. Las imágenes se obtuvieron por el sistema Digi-Doct y se analizaron por el sistema Labs Work. * $p < 0.05$ en comparación de basal con la máxima expresión proteica de COX-2 y ** $p < 0.05$ en comparación de la máxima expresión proteica de COX-2 con el mayor efecto de los inhibidores sobre dicha expresión.

El LPS de *P. gingivalis* aumenta la inducción transcripcional de IL-1 β a través de MEK, p38, JNK y PKC.

Basados en los resultados anteriores, se estudió el papel del LPS de *P. gingivalis* en la inducción de ARNm de IL-1 β . Se observó que la mayor inducción de IL-1 β se dio a partir de las 4 hrs. de tratamiento y se mantuvo hasta las 6 hrs. (Fig. 13A). Para determinar las cinasas involucradas en la inducción de IL-1 β a nivel transcripcional se utilizaron los inhibidores PD98059, SB203580, SP600125 y Calfofostina C. Se observó que PD98059, SB203580, SP600125 y Calfofostina C inhibieron la inducción del ARNm de IL-1 β (Fig. 13B). A partir de estos datos podemos concluir que la activación de las cinasas MEK, p38, JNK y PKC regula la inducción transcripcional de IL-1 β en cardiomiocitos por el efecto del LPS de *P. gingivalis*.

A



B

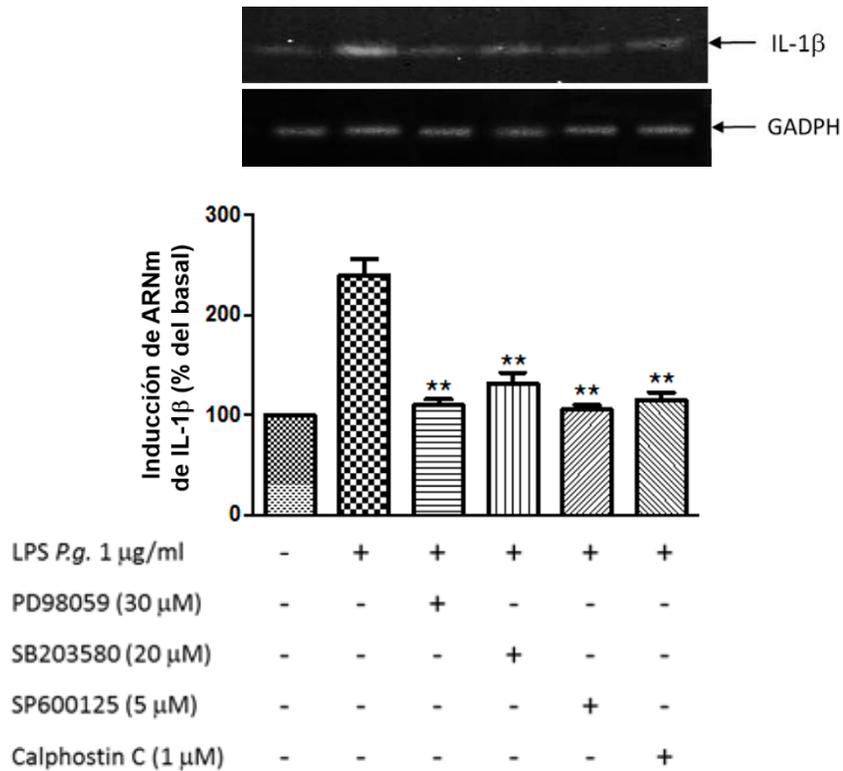


Figura 13. Curso temporal y efecto de los inhibidores de cinasas sobre la inducción transcripcional de IL-1 β por el LPS de *P. gingivalis* en H9c2. A) Las células H9c2 (1×10^6) se cultivaron en cajas de 6 pozos. Cuando alcanzaron la subconfluencia se incubaron en DMEM + 2% SBF por 16 hrs. al término se trataron por diferentes periodos con LPS (1 μ g/ml). B) Las células se preincubaron durante 30 minutos con los inhibidores posteriormente se trataron con LPS por 6 hrs. Al término la reacción se aisló el RNA y se utilizó 1 μ g de RNA para el ensayo de RT-PCR, los geles se tiñeron con bromuro de etidio y las imágenes se obtuvieron por el sistema Digi-Doct y se analizaron por el sistema Labs Work. * $p < 0.05$ en comparación de basal con la máxima inducción transcripcional de IL-1 β y ** $p < 0.05$ en comparación de la máxima inducción transcripcional de IL-1 β con el mayor efecto de los inhibidores sobre dicha expresión.

J. Discusión

Las endotoxinas bacterianas como el LPS y LTA de *P. gingivalis* y *S. sanguinis*, respectivamente, promueven la expresión e inducción transcripcional de COX-2 e IL-1 β en cardiomiocitos. Cabe destacar que el origen de las endotoxinas que se utilizaron en este estudio, son de bacterias presentes en la cavidad bucal y la respuesta que se observó refuerza lo que se sabe acerca del papel de estas bacterias en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares como endocarditis y aterosclerosis. Se sabe que *S. sanguinis* es uno de los principales organismos infecciosos causantes de la endocarditis, pero llega a sorprender que es muy poco lo que se sabe acerca de cómo esta bacteria induce inflamación en tejido cardíaco. Además se ha demostrado que muchas bacterias secretan potentes proteínas inductoras e inhibidoras de citocinas.⁹⁵ Por esta razón es fundamental el comprender los mecanismos celulares que desencadenan estas bacterias en un órgano tan importante como el corazón.

Además de procesos inflamatorios desencadenados por patógenos en el corazón se ha encontrado que el fallo de contracción miocárdica en el choque séptico puede desarrollarse también después de interacciones directas entre motivos moleculares liberados por patógenos y los receptores específicos.¹²⁴ En el caso de las bacterias orales como *P. gingivalis* se ha demostrado que este periodontopatógeno induce hipertrofia en cardiomiocitos aumentando la actividad de la matriz metaloproteínasa (MMP)-9 y el aumento de tamaño en células H9c2, mientras que, otras bacterias periodontopatógenas como *A. actinomycetemcomitans* y *P. intermedia*, no inducen el mismo efecto.⁴¹ Los estudios del efecto del LPS sobre el corazón también han demostrado que algunos componentes, como el glucosido fenólico gastridina usado comúnmente en la medicina tradicional China, tiene la capacidad de inhibir procesos inflamatorios en el corazón. El glucosido fenólico gastridina que posee varias propiedades biológicas y farmacológicas. Se ha encontrado que el tratamiento con gastridina suprime la

activación de NF- κ B y la familia de las MAPKs y la sobrerregulación de la expresión de iNOS, COX-2, TNF- α , IL-6 en cardiomiocitos H9c2 estimulados por LPS. Además, la inhibición impiden parcialmente los efectos inhibitorios del gastrodina sobre la fosforilación de I κ B- α , ERK 1/2, JNK, y p38, y la activación de NF- κ B.¹²⁵ Esto contriuye con el plantemiento de buscar nuevas componentes que tengan un afecto directo sobre los mecanismos realcionaos con la inflamación del miocardio.

En esta investigación se demostró que la inducción de COX-2, una enzima muy importante en la producción de PGE₂, e IL-1 β por el LTA y el LPS de las bacterias estudiadas que se observan comúnmente en la cavidad oral es de forma diferencial. Se pudo observar que la MAPK ERK regula, junto con otras cinasas, la inducción tanto de COX-2 como IL-1 β por el LTA y el LPS, pudiendo destacar la importancia que tiene esta cinasa en varios eventos celulares. Por el otro lado observamos que JNK está involucrada en la regulación de la inducción de COX-2 e IL-1 β por el LPS y la inducción de COX-2 por el LTA. En el caso de p38 pudimos encontrar que está involucrada en la inducción de IL-1 β por el LPS. Sin embargo, cabe mencionar que Wu y colaboradores³⁹ encontraron que la actividad de las MAPKs, p38 y ERK, y las proteínas asociadas a estas, en células H9c2, son sobrerreguladas por el medio condicionado con *P. gingivalis*, aumentando el tamaño celular, fragmentación de DNA, condensación de núcleo, muerte celular mitocondrial asociada con Bcl-2 (Bad), citocromo C citosólico (Cyt C), y la forma activa de las proteína caspasa 9 en células H9c2. Sin embargo, estos eventos fueron reducidos después de la pretratamiento con SB203580.³⁹ Además, en un estudio realizado por Frazier y colaboradores¹⁰⁹ encontraron que la producción de citocinas disminuyó cuando las células fueron pretratadas con el inhibidor de p38 antes del tratamiento con LPS. Dos importantes moléculas de señalización celular típicamente reguladas por receptores acoplados a proteína G, AMPc y PKC, también son estimuladas por el LPS y las citocinas inflamatorias TNF- α e IL-6, a través de un proceso regulado por Mkp-1 y p38. Sin embargo, el uso de anticuerpos contra Ga(s) y Ga(q) bloquean el aumento de AMPc celular y la activación de PKC, respectivamente, en respuesta al estímulo inflamatorio, indicando un papel

importante de las proteínas G acopladas a receptores en este proceso. La estimulación con LPS aumenta la expresión de COX-2 en células H9c2, que también expresan receptores de prostaglandina. El bloqueo del receptor de prostaglandina EP4 unido a proteína G por AH23848 previene el aumento del AMPc inducido por el LPS.¹⁰⁹ Cabe mencionar que aún hace falta estudiar más a fondo el papel de las MAPKs en la señalización intracelular seguida a un infarto que lleva a una disminución de la contractilidad, apoptosis, fibrosis y caso fallo cardíaco, en donde las MAPKs podrían tener un papel fundamental tanto en estos eventos como en procesos infecciosos como la endocarditis.

Se ha demostrado que después de la administración de los inhibidores incluyendo U0126 (inhibidor de ERK 1/2), SB203580 (inhibidor de la MAPK p38), SP600125 (inhibidor de JNK 1/2), CsA (inhibidor de calcineurina), FK506 (inhibidor de calcineurina), y QNZ (inhibidor de NF- κ B), las características hipertróficas inducidas por LPS, como el incremento de tamaño de las células, las fibras de actina, y los niveles de ANP y BNP, y la localización nuclear de NFAT-3 son marcadamente inhibidas solo con los inhibidores de calcineurina, CsA y FK506 en un estudio realizado por Liu y colaboradores ¹⁰⁸. Colectivamente los resultados obtenidos sugieren que el LPS lleva a la hipertrofia miocárdica a través de la vía de señalización de calcineurina/NFAT-3 en células H9c2.¹⁰⁸

En el caso de PKC pudimos demostrar, con el uso del inhibidor Calfofostina C, que su activación regula la inducción de COX-2 e IL-1 β por el efecto del LTA, además de que regula la inducción de IL-1 β por el LPS. Debido a esto, y a que PKC α es la isoforma de PKC más comúnmente encontrada en cardiomiocitos, demostramos que la isoforma PKC α se fosforila de manera dependiente del tiempo en presencia del LTA en cardiomiocitos. Las isoformas de PKC han emergido como importantes reguladores de la contracción cardíaca, hipertrofia, y vías de señalización que influyen en la lesión isquémica.⁸⁷ Se ha reportado los diversos papeles de PKC en los cardiomiocitos, encontrando que el pretratamiento con el inhibidor específico de PKC ϵ , eV1-2, previene la fosforilación de la Cx43 inducida por la lisofosfatidilcolina (LPC) en Ser 368 y la pérdida de Cx43 en las uniones gap,

en donde se podría afectar la función de la comunicación intracelular por uniones gap. De esta forma se puede decir que el LPC destruye la estructura y la función de uniones gap por la fosforilación en serina de Cx43 mediado por PKC ϵ . De esta forma los inhibidores de PKC ϵ podrían ser efectivos en prevenir enfermedades relacionadas con LPC.¹¹⁹

En adición a lo encontrado en esta investigación con respecto a PKC, estudios recientes indican que las isoformas de PKC y las proteínas de choque térmico (HSP) están involucradas en la cardioprotección. Se ha encontrado que la expresión mediada por adenovirus de PKC α en miocitos ventriculares de ratón neonatal no solo aumentan la expresión de la HSP70 sino también la protege contra la simulación de isquemia reperfusión. Además se encontró que existe una cercana interacción entre PKC α y HSP70, independiente a la activación del factor 1 de choque térmico, y de esta forma la protección otorgada por la sobreexpresión de PKC α es mediada por la inducción transcripcional de la expresión de HSP70.¹²⁶

En resumen, la inducción de la citocina proinflamatoria IL-1 β y PGE₂ dependen de una activación diferencial de cinasas por el efecto de las endotoxinas de bacterias de la cavidad bucal, lo cual nos hace ver la complejidad de la transducción de señales en cardiomiocitos.

K. Conclusiones

La respuesta inmunológica innata no depende exclusivamente de los mecanismos de defensa asociados al epitelio y mucosa y de las células derivadas de la médula ósea, si no también de las células que forman la estructura de los tejidos y órganos. Como se pudo observar en esta y otras investigaciones, el papel de las células como los cardiomiocitos es muy importante al momento de sensor componentes bacterianos que desencadenan una respuesta inflamatoria como los PAMPs. Además del conocimiento que se tiene sobre los cambios en la contractilidad de los cardiomiocitos asociada a las presencia de Iso PAMPs es importante señalar que los cardiomiocitos poseen todos los mecanismos celulares necesarios para poder contribuir con la producción de citocinas inflamatorias como la IL-1 β y PGE₂. Por lo tanto, el conocimiento de estos mecanismos que regulan la producción de citocinas proinflamatorias por el efecto de endotoxinas de bacterias bucales ayudarán a fundamentar la relación de las bacterias bucales con las enfermedades cardiovasculares así como comprender de una mejor forma estos eventos para que el día de mañana se puedan desarrollar tratamiento específicos para enfermedades infecciosas relacionadas con las sepsis de bacterias de la cavidad oral.

L. Referencias

1. Meyer, D. H. & Taylor, P. M. Oral pathogens: from dental plaque to cardiac disease. *Curr. Opin. Microbiol.* 1, 88-95 (1998).
2. Taubam, M. A. & David, A. N. The scientific and public-health imperative for a vaccine against dental caries. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 555-563 (2006).
3. Whittaker, C. J. et al. Mechanisms of adhesion by oral bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 50, 513-552 (1996).
4. Jenkinson, H. F. & Lamont, R. J. Streptococcal adhesion and colonization. *Crit Rev Oral Biol Med.* 8, 175-200 (1997).
5. Meyer, D. H. et al. Models of invasion of enteric and periodontal pathogens into epithelial cells: a comparative analysis. *Crit Rev Oral Biol.* 8, 389-409 (1997).
6. Uitto, V. J. et al. Cytopathic effects of *Treponema denticola* chymotrypsin-like proteinase on migrating and stratified epithelial cells. *Infect Immun.* 63, 3401-3410 (1995).
7. Barbari, E. F. et al. Subspecialty clinics: infectious diseases. Infective endocarditis due to unusual or fastidious microorganisms. *Mayo Clin Proc.* 72, 532-542 (1997).
8. Burnette, C. D. et al. FimA, a major virulence factor associated with *Streptococcus parasanguis*. *Infect Immun.* 63, 4669-4674 (1995).
9. Herzberg, M. C. et al. The platelet interactivity phenotype of *Streptococcus sanguis* influences the course of experimental endocarditis. *Infect Immun.* 60, 4809-4818 (1992).
10. DeStefano, F. et al. Dental disease and risk of coronary heart disease and mortality. *British Med J.* 306, 688-691 (1993).
11. Beck, J. et al. Periodontal disease and cardiovascular disease. *J. Periodontol.* 67, 11123-11137 (1996).
12. Mattila, K. J. et al. Association between dental health and acute myocardial infraction. *British Med J.* 298, 779-781 (1989).

13. Illustrated by Zach Turner - Medical Illustrator - Blue Motion Studios LLC, <http://www.prophywithapurpose.com/oral-systemic.php>
14. Ooshima, T. et al. Roles of oral bacteria in cardiovascular diseases – from molecular mechanisms to clinical cases: Cell-surface structures of novel serotype k *Streptococcus mutans* strains and their correlation to virulence. *J Pharmacol Sci.* 113, 120-125 (2010).
15. Kolenbrander, P. E. et al. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat Rev Microbiol.* 7, 471-480 (2010).
16. Paik, S. et al. Identification of virulence determinants for endocarditis in *Streptococcus sanguinis* by signature-tagged mutagenesis. *Infect Immun.* 73, 6064-6074 (2005).
17. Mustapha, I. Z. et al. Cardiovascular disease markers of systemic bacterial exposure in periodontal disease and risk: a systemic review and meta-analysis. *J. Periodontol.* 78, 2289-2303 (2007).
18. Persson, G. R. et al. Chronic periodontitis, a significant relationship with acute myocardial infarction. *European Heart J.* 24, 2108–2115 (2003).
19. Geismar, K. et al. Periodontal disease and coronary heart disease. *J Periodontol.* 77, 1547–1554 (2006).
20. Rech, R. L. et al. Association between periodontal disease and acute coronary syndrome. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia.* 88, 185–190 (2007).
21. Beck, J. D. et al. Periodontal disease and coronary heart disease: a reappraisal of the exposure. *Circulation.* 112, 19–24 (2005).
22. Persson, R. E. Assessment of periodontal conditions and systemic disease in older subjects. II. Focus on cardiovascular diseases. *J Clin Periodontol.* 29, 803–810 (2002).
23. Haraszthy, V. I., et al. Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. *J Periodontol.* 71, 1554–1560 (2000).
24. Fiehn, N. E., et al. Identification of periodontal pathogens in atherosclerotic vessels. *J Periodontol.* 76, 731–736 (2005).
25. Li, X. et al. Systemic diseases caused by oral infection. *Clin Microbiol Rev.* 13, 547–558 (2000).

26. Herzberg, M. C. et al. Oral streptococci and cardiovascular disease: searching for the platelet aggregation- associated protein gene and mechanisms of *Streptococcus sanguis* induced thrombosis. *J Periodontol.* 76 (Suppl.), 2101–2105 (2005).
27. Plummer, C. & Douglas, C. W. Relationship between the ability of oral streptococci to interact with platelet glycoprotein I α and with the salivary low-molecular-weight mucin, MG2. *Immunol Med Microbiol.* 48, 390–399 (2006).
28. Maeda, K. et al. Oral streptococcal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mediates interaction with *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *Microbes Infect.* 6, 1163–1670 (2004).
29. Nonnenmacher, C. et al. Periodontal microbiota in patients with coronary artery disease measured by real-time polymerase chain reaction: a case–control study. *J Periodontol.* 78, 1724–1730 (2007).
30. Njoroge, T., Genco, R. J., Sojar, H. T., Hamada, N., Genco, C. T. A role for fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* invasion of oral epithelial cells of special interest. *Infect Immun.* 65, 1980-1984 (1997).
31. Duchesne, P., Grenier, D., Mayrand, D. Demonstration of adherence properties of *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles using a new microassay. *Oral Microbiol Immunol.* 10, 76-80 (1995).
32. Genco, R. J., Sojar, H., Lee, J. Y., Sharma, A., Bedi, D., Cho, M. I., Dyer, D. W. *Porphyromonas gingivalis* fimbriae: structure, function, and insertional inactivation mutants. In *Molecular pathogenesis of periodontal disease*. Washington, DC: ASM Press. 13-23 (1994).
33. Li, J., Ellen, R. P., Hovver, C. I., Felton, J. R. Association of proteases of *Porphyromonas* (bacteroides) *gingivalis* with its adhesion to *Actinomyces viscosus*. *J Den Res.* 70, 82-86 (1991).
34. Grenier, D. Further evidence for a possible role of trypsin-like activity in the adherence of *Porphyromonas gingivalis*. *Can J Microbiol.* 38, 1189-1192 (1992).

35. Kontani, M., Ono, H., Shibata, H., Okamura, Y., Tanaka, T., Fujiwara, T., Kimura, S., Hamada, S. Cysteine protease of *Porphyromonas gingivalis* 381 enhances binding of fimbriae to cultured fibroblasts and matrix proteins. *Infect Immun.* 64, 756-762 (1996).
36. Brodala, N. et al. *Porphyromonas gingivalis* bacteremia induces coronary and aortic atherosclerosis in normocholesterolemic and hypercholesterolemic pigs. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol.* 25, 1446–1451 (2005).
37. Lalla, E. et al. Oral infection with a periodontal pathogen accelerates early atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Arterioscler Thromb Vasc. Biol.* 23, 1405–1411 (2003).
38. Li, L., Messas, E., Batista, E. L. Jr, Levine, R. A. & Amar, S. *Porphyromonas gingivalis* infection accelerates the progression of atherosclerosis in a heterozygous apolipoprotein E-deficient murine model. *Circulation.* 105, 861–867 (2002).
39. Wu, H. C., et al. P38 mitogen-activated protein kinase pathways are involved in the hypertrophy and apoptosis of cardiomyocytes induced by *Porphyromonas gingivalis* conditioned medium. *Cell Biochem Funct.* 26, 246-55 (2008).
40. Lee, S. D., et al. Role of mitogen-activated protein kinase kinase in *Porphyromonas gingivalis*-induced myocardial cell hypertrophy and apoptosis. *Eur J Oral Sci.* 114, 154-9 (2006).
41. Lee, S. D., et al. *Porphyromonas gingivalis*-induced cellular hypertrophy and MMP-9 activity via different signaling pathways in H9c2 cardiomyoblast cells. *J Periodontol.* 77, 684-91 (2006).
42. Herzberg, M. C., Brintzenhofe, K. L. & Clawson, C. C. Aggregation of human platelets and adhesion of *Streptococcus sanguis*. *Infect Immun.* 39, 1457–1469 (1983).
43. Erickson, P. R. & Herzberg, M. C. A collagen-like immunodeterminant on the surface of *Streptococcus sanguis* induces platelet aggregation. *J Immunol.* 138, 3360–3366 (1987).
44. Erickson, P. R. & Herzberg, M. C. The *Streptococcus sanguis* platelet aggregation-associated protein. Identification and characterization of the minimal platelet-interactive domain. *J Biol Chem.* 268, 1646–1649 (1993).

45. Sullam, P. M., Jarvis, G. A. & Valone, F. H. Role of immunoglobulin G in platelet aggregation by viridans group streptococci. *Infect Immun.* 56, 2907–2911 (1988).
46. Que, Y. A. & Moreillon, P. Infective endocarditis. *Nat Rev Cardiol.* 8, 322–336 (2011).
47. Moreillon, P. & Que, Y. A. Infective endocarditis. *Lancet.* 363, 139–149 (2004).
48. Hoen, B. et al. Changing profile of infective endocarditis: results of a 1- year survey in France. *JAMA.* 288, 75–81 (2002).
49. Tleyjeh, I. M. et al. A systematic review of population-based studies of infective endocarditis. *Chest.* 132, 1025–1035 (2007).
50. de Sa, D. D. et al. Epidemiological trends of infective endocarditis: a population-based study in Olmsted County, Minnesota. *Mayo Clin Proc.* 85, 422–426 (2010).
51. Delahaye, F. et al. Characteristics of infective endocarditis in France in 1991. A 1- year survey. *Eur Heart J.* 16, 394–401 (1995).
52. Hasbun, R., Vikram, H. R., Barakat, L. A., Buenconsejo, J. & Quagliarello, V. J. Complicated left-sided native valve endocarditis in adults: risk classification for mortality. *JAMA.* 289, 1933–1940 (2003).
53. Chirouze, C. et al. Prognostic factors in 61 cases of *Staphylococcus aureus* prosthetic valve infective endocarditis from the International Collaboration on Endocarditis merged database. *Clin Infect Dis.* 38, 1323–1327 (2004).
54. Normand, J., et al. Changing patterns and prognosis of infective endocarditis in childhood. *Eur Heart J.* 16 (Suppl. B), 28–31 (1995).
55. Letaief, A. et al. Epidemiology of infective endocarditis in Tunisia: a 10-year multicenter retrospective study. *Int J Infect Dis.* 11, 430–433 (2007).
56. Hill, E. E. et al. Infective endocarditis: changing epidemiology and predictors of 6- month mortality: a prospective cohort study. *Eur Heart J.* 28, 196–203 (2007).
57. Cabell, C. H. et al. Changing patient characteristics and the effect on mortality in endocarditis. *Arch Intern Med.* 162, 90–94 (2002).

58. Fowler, V. G., Jr et al. Staphylococcus aureus endocarditis: a consequence of medical progress. *JAMA*. 293, 3012–3021 (2005).
59. Lopez, J. et al. Age-dependent profile of left-sided infective endocarditis: a 3-center experience. *Circulation*. 121, 892–897 (2010).
60. Durante-Mangoni, E. et al. Current features of infective endocarditis in elderly patients: results of the International Collaboration on Endocarditis Prospective Cohort Study. *Arch Intern Med*. 168, 2095–2103 (2008).
61. Moreillon, P., Que, Y. A. & Bayer, A. S. Pathogenesis of streptococcal and staphylococcal endocarditis. *Infect Dis Clin. North Am*. 16, 297–318 (2002).
62. Patti, J. M. et al. MSCRAMM-mediated adherence
63. Moreillon, P. et al. Predictors of endocarditis in isolates from cultures of blood following dental extractions in rats with periodontal disease. *J Infect Dis*. 157, 990–995 (1988).
64. Hall, G., Heimdahl, A. & Nord, C. E. Bacteremia after oral surgery and antibiotic prophylaxis for endocarditis. *Clin Infect Dis*. 29, 1–8 (1999).
65. Roberts, G. J. Dentists are innocent! “Everyday” bacteremia is the real culprit: a review and assessment of the evidence that dental surgical procedures are a principal cause of bacterial endocarditis in children. *Pediatr Cardiol*. 20, 317–325 (1999).
66. Pallasch, T. J. Antibiotic prophylaxis: theory and reality. *J Calif Dent Assoc*. 17, 27–39 (1989).
67. Strom, B. L. et al. Dental and cardiac risk factors for infective endocarditis. A population-based, case-control study. *Ann Intern Med*. 129, 761–769 (1998).
68. Durack, D. T. Prevention of infective endocarditis. *N Engl J Med*. 332, 38-44 (1995).
69. Marcus, A. J., Hajjar, D. P. Vascular transcellular signaling. *J Lipid Res*. 34, 2017-31 (1993).
70. Valtonen, V. V. Infection as a risk factor for infraction and atherosclerosis. *Ann Med*. 23, 539-43 (1991).

71. Pearce, W. H., Sweis, I., et al. Interleukin-1 and tumor necrosis factor release in normal and diseased human infrarenal aortas. *J Vasc Surg.* 16, 784-9 (1992).
72. Funk, J. L., Feingold, K. R., et al. Lipopolysaccharide stimulation of RAW 264.7 macrophages induces lipid accumulation and foam cell formation. *Atherosclerosis.* 98, 67-82 (1993).
73. Wada, H., Saito, K., Kanda, T., et al. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) plays a protective role in acute viral myocarditis in mice: a study using mice lacking TNF- α . *Circulation.* 103, 743–749 (2001).
74. Tsujimoto, H., Ono, S., Efron, P. A., Scumpia, P. O., Moldawer, L. L., Mochizuki, H. Role of toll-like receptors in the development of sepsis. *Shock.* 29, 315–321 (2008).
75. Salomao, R., Martins, P. S., Brunialti, M. K. C., et al. TLR signaling pathway in patients with sepsis. *Shock.* 30, 73–77 (2008).
76. Knuefermann, P., Nemoto, S., Baumgarten, G., et al. Cardiac inflammation and innate immunity in septic shock: is there a role for toll-like receptors? *Chest.* 121, 1329–1336 (2002).
77. Knuefermann, P., Schwederski, M., Velten, M., et al. Bacterial DNA induces myocardial inflammation and reduces cardiomyocyte contractility: role of toll-like receptor 9. *Cardiovascular Research.* 78, 26–35 (2008).
78. Baumgarten, G., Knuefermann, P., Schuhmacher, G., et al. Toll-like receptor 4, nitric oxide, and myocardial depression in endotoxemia. *Shock.* 25, 43–49 (2006).
79. Parker, M. M., Shelhamer, J. H., Bacharach, S. L., Green, M. V., Natanson, C., et al. Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock. *Ann Intern Med.* 100, 483–490 (1984).
80. Russell, J. A. Management of sepsis. *N Engl J Med.* 355, 1699–1713 (2006).
81. Trinchieri, G., Sher, A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol.* 7, 179–190 (2007).

82. Dowling, D., Hamilton, C. M., O'Neill, S. M. A comparative analysis of cytokine responses, cell surface marker expression and MAPKs in DCs matured with LPS compared with a panel of TLR ligands. *Cytokine*. 41, 254–262 (2008).
83. Zhang, Z., Reenstra, W., Weiner, D. J., Louboutin, J. P., Wilson, J. M. The p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway is coupled to Toll-like receptor 5 to mediate gene regulation in response to *Pseudomonas aeruginosa* infection in human airway epithelial cells. *Infect Immun*. 75, 5985–5992 (2007).
84. Ramana, K. V., et al. Endotoxin-induced cardiomyopathy and systemic inflammation in mice is prevented by aldose reductase inhibition. *Circulation*. 114(17), 1838-46 (2006).
85. Rudiger, A. & Singer, M. Mechanisms of sepsis-induced cardiac dysfunction. *Crit Care Med*. 35, 1599–1608 (2007).
86. Merx, M. W., Weber, C. Sepsis and the heart. *Circulation*. 116, 793–802 (2007).
87. Frantz, S., Kobzik, L., Kim, Y. D., et al. Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium. *J Clin Invest*. 104, 271–280 (1999).
88. Frantz, S., Kelly, R. A., Bourcier, T. Role of TLR-2 in the activation of nuclear factor kB by oxidative stress in cardiac myocytes. *J Biol Chem*. 276:5197–5203 (2001).
89. Flierl, M. A., Rittirsch, D., Huber-Lang, M. S., Sarma, J. V., Ward PA. Molecular events in the cardiomyopathy of sepsis. *Mol Med*. 14, 327–336 (2008).
90. Knuefermann, P., Nemoto, S., Misra, A., Nozaki, N., Defreitas, G., et al. CD14-deficient mice are protected against lipopolysaccharide-induced cardiac inflammation and left ventricular dysfunction. *Circulation*. 106, 2608–2615 (2002).
91. Nemoto, S., Vallejo, J. G, Knuefermann, P., Misra, A., Defreitas, G., et al. *Escherichia coli* LPS-induced LV dysfunction: role of toll-like receptor-4 in the adult heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 282, H2316–2323 (2002).
92. Eaves-Pyles, T., Murthy, K., Liaudet, L., Virag, L., Ross, G., et al. Flagellin, a novel mediator of *Salmonella*-induced epithelial activation and systemic inflammation: I kappa B alpha degradation, induction of nitric oxide synthase, induction of proinflammatory mediators, and cardiovascular dysfunction. *J Immunol*. 166, 1248–1260 (2001).

93. Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*. 410, 1099–1103 (2001).
94. Andersen-Nissen, E., Hawn, T. R., Smith, K. D., Nachman, A., Lampano, A. E., et al. Cutting edge: Tlr5^{-/-} mice are more susceptible to Escherichia coli urinary tract infection. *J Immunol*. 178, 4717–4720 (2007).
95. Feuillet, V., Medjane, S., Mondor, I., Demaria, O., Pagni, P. P., et al. Involvement of Toll-like receptor 5 in the recognition of flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103, 12487–12492 (2006).
96. Knuefermann, P., Nemoto, S., Baumgarten, G., Misra, A., Sivasubramanian, N., Carabello, B. A., Vallejo, J. G. Cardiac inflammation and innate immunity in septic shock: is there a role for toll-like receptors? *Chest*. 121(4), 1329-36 (2002).
97. Nemoto, S., Vallejo, J. G., Defreitas, G., et al. Role of gene deletion of the Toll-like receptor-4 (TLR-4) in lipopolysaccharide (LPS)-induced left ventricular dysfunction. *Circulation*. 102(suppl 2), II-74 (2000).
98. Mutig, N., Geers-Knoerr, C., Piep, B., Pahuja, A., Vogt, P. M., Brenner, B., Niederbichler, A. D., Kraft, T. Lipoteichoic acid from Staphylococcus aureus directly affects cardiomyocyte contractility and calcium transients. *Mol Immunol*. 56, 720-8 (2013).
99. Rietschel, E., Kirikae, T., Schade, F., Mamat, U., Schmidt, G., Loppnow, H., et al. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J*. 8, 217-225 (1994).
100. http://pathmicro.med.sc.edu/fox/cell_envelope.htm
101. Hamada, S., Fujiwara, T., Maihara, J. Bacterial endotoxic substances and their effects on host cells. In: *Molecular pathogenesis of periodontal disease*. Genco R, Hamada S, Lehner T, McGhee J, Mergenhagen S, editors. Washington DC: ASM Press. 105-117 (1994).
102. Tobias, P. S., Gegner, J., Tapping, R., Orr, S., Mathison, J., Lee, J. D., et al. Lipopolysaccharide dependent cellular activation. *J Periodontal Res*. 32, 99-103 (1997).

103. Clinton, S. K., Fleet, J. C., et. al. Interleukin 1 gene expression in rabbit vascular tissue in vivo. *Am J Pathol.* 138, 1005-14 (1991).
104. Offenbacher, S. Periodontal diseases: pathogenesis. *Ann Periodontol.* 1, 821-78 (1996).
105. Ebersole, J. L. Systemic humoral immune responses in periodontal disease. *Oral Biol Med.* 1, 283-331 (1990).
106. Hernichel-Gorbach, E., Komman, K. S., et. al. Host responses in patients generalized refractory periodontitis. *J Periodontol.* 65, 8-16 (1994).
107. Palsson-McDermott, E. M., O'Neill, L. A. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology.* 113, 153-62 (2004).
108. Liu, C. J., et al. Lipopolysaccharide induces cellular hypertrophy through calcineurin/NFAT-3 signaling pathway in H9c2 myocardial cells. *Mol Cell Biochem.* 313, 167-78 (2008).
109. Frazier, W. J., et al. MAPK signaling drives inflammation in LPS-stimulated cardiomyocytes: the route of crosstalk to G-protein-coupled receptors. *PLoS One.* 7, e50071 (2012).
110. Overland, G., Morath, S., et. al.: Lipoteichoic acid is a potent inducer of cytokine production in rat and human Kupffer cells in vitro. *Surg Infect.* 4, 181-91 (2003).
111. Takeda, K., Akira, S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol.* 17, 1-14 (2005).
112. <http://www.rcsb.org/pdb/101/motm.do?momID=143>
113. Dong, B., et al. TLR4 regulates cardiac lipid accumulation and diabetic heart disease in the nonobese diabetic mouse model of type 1 diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 303, H732-42 (2012).
114. Kao, S. J. Lipoteichoic acid induces nuclear factor- κ B activation and citric acid synthase expression via phosphatidylinositol 3-kinase AKT, and p38 MAPK in RQW 264.7 macrophages. *Immunology.* 115, 366-374 (2002).

115. Steinberg, S. F. Cardiac actions of protein kinase C isoforms. *Physiology* (Bethesda). 27(3), 130-9 (2012).
116. Bowling, N., Walsh, R. A., Song, G., Estridge, T., Sandusky, G. E., Fouts, R. L., Mintze, K., Pickard, T., Roden, R., Bristow, M. R., Sabbah, H. N., Mizrahi, J. L., Gromo, G., King, G. L., Vlahos, C. J. Increased protein kinase C activity and expression of Ca²-sensitive isoforms in the failing human heart. *Circulation*. 99, 384–391, (1999).
117. Rybin, V. O., Steinberg, S. F. Do adult rat ventricular myocytes express protein kinase C α ? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 272, H2485–H2491 (1997).
118. Rybin, V. O., Steinberg, S. F. Protein kinase C isoform expression and regulation in the developing rat heart. *Circ Res*. 74, 299–309 (1994).
119. Liao, C. K., et al. PKC ϵ mediates serine phosphorylation of connexin43 induced by lysophosphatidylcholine in neonatal rat cardiomyocytes. *Toxicology*. 314, 11-21 (2013).
120. Steinberg, S. F. Cardiac actions of protein kinase C isoforms. *Physiology* (Bethesda). 27, 130-9 (2012).
121. Bowling, N., Walsh, R. A., Song, G., Estridge, T., Sandusky, G. E., Fouts, R. L., Mintze, K., Pickard, T., Roden, R., Bristow, M. R., Sabbah, H. N., Mizrahi, J. L., Gromo, G., King, G. L., Vlahos, C. J. Increased protein kinase C activity and expression of Ca²-sensitive isoforms in the failing human heart. *Circulation*. 99, 384–391 (1999).
122. Rybin, V. O., Steinberg, S. F. Do adult rat ventricular myocytes express protein kinase C α ? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 272, H2485–H2491 (1997).
123. Banks, J., Poole, S., Nair, S. P., Lewthwaite, J., Tabona, P., McNab, R., Wilson, M., Paul, A., Henderson, B. *Streptococcus sanguis* secretes CD14-binding proteins that stimulate cytokine synthesis: a clue to the pathogenesis of infective (bacterial) endocarditis? *Microb Pathog*. 32, 105-16 (2002).
124. Rolli, J., et al. Bacterial flagellin triggers cardiac innate immune responses and acute contractile dysfunction. *PLoS One*. 5, e12687 (2010).
125. Yang, P., et al. Gastrodin attenuation of the inflammatory response in H9c2 cardiomyocytes involves inhibition of NF- κ B and MAPKs activation via the phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *Biochem Pharmacol*. 85, 1124-33 (2013).

126. Coaxum, S. D., et al. Influence of PKC-alpha overexpression on HSP70 and cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 292, H2220-6 (2007).
127. Kozarov, E., et al. Detection of bacterial DNA in atheromatous plaques by quantitative PCR. *Microbes Infect.* 8, 687–693 (2006).
128. Nomura, R. et al. Isolation and characterization of *Streptococcus mutans* in heart valve and dental plaque specimens from a patient with infective endocarditis. *J Med Microbiol.* 55, 1135–1140 (2006).
129. Renvert, S. et al. Bacterial profile and burden of periodontal infection in subjects with a diagnosis of acute coronary syndrome. *J Periodontol.* 77, 1110–1119 (2006).
130. Aimetti, M., Romano, F. & Nessi, F. Microbiologic analysis of periodontal pockets and carotid atheromatous plaques in advanced chronic periodontitis patients. *J Periodontol.* 78, 1718–1723 (2007).
131. Gotsman, I., et al. Periodontal destruction is associated with coronary artery disease and periodontal infection with acute coronary syndrome. *J Periodontol.* 78, 849–858 (2007).
132. Nakano, K., et al. Detection of cariogenic *Streptococcus mutans* in extirpated heart valve and atheromatous plaque specimens. *J Clin Microbiolol.* 44, 3313–3317 (2006).
133. Nakano, K., et al. Detection and serotype distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in cardiovascular specimens from Japanese patients. *Oral Microbiol Immunol.* 22, 136–139 (2007).
134. Pucar, A., et al. Correlation between atherosclerosis and periodontal putative pathogenic bacterial infections in coronary and internal mammary arteries. *J Periodontol.* 78, 677–682 (2007).
135. Zaremba, M., et al. Evaluation of the incidence of periodontitis associated bacteria in the atherosclerotic plaque of coronary blood vessels. *J Periodontol.* 78, 322–327 (2007).