



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EL EFECTO DEL FLAVONOIDE APIGENINA SOBRE LA REGULACIÓN  
DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN LA LÍNEA CELULAR H9C2  
DERIVADA DE CARDIOMIOCITOS ESTIMULADOS CON LPS DE  
*PORPHYROMONAS GINGIVALIS*.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**MÓNICA ARISBET FLORES SÁNCHEZ**



**Ciudad de Universitaria, CDMX**

**2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **JURADO ASIGNADO**

|                       |  |
|-----------------------|--|
| <b>PRESIDENTE</b>     | <b>Dr. Jesús Fernando Montiel Aguirre</b>    |
| <b>VOCAL</b>          | <b>Dra. Gloria Gutiérrez Venegas</b>         |
| <b>SECRETARIO</b>     | <b>M. en C. Julio Cesar Martínez Álvarez</b> |
| <b>1 er. SUPLENTE</b> | <b>Dr. Gerardo David Anaya Eugenio</b>       |
| <b>2do. SUPLENTE</b>  | <b>Dra. Rosa Camacho Sandoval</b>            |

## **SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA**

**Laboratorio de Bioquímica. División de Estudios de Posgrado e Investigación  
en la Facultad de Odontología, UNAM.**

## **ASESOR DEL TEMA:**

**Dra. Gloria Gutiérrez Venegas**

---

## **SUSTENTANTE:**

**Mónica Arisbet Flores Sánchez**

---

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES:**

### **A la UNAM**

*Le agradezco a la máxima casa de estudios por haberme dado la oportunidad de realizar no sólo mis estudios, también por brindarme muchas oportunidades, y sobre todo, por permitirme conocer gran diversidad de personas y experiencias que forjarán mi vida. Mi paso por la Preparatoria y la Facultad de Química han sido, sin duda alguna, la mejor etapa de mi vida. Gracias UNAM!!!*

### **A la Facultad de Química (F.Q.)**

*A pesar de que mi sueño original era estudiar Biología, no me arrepiento de nada, absolutamente nada. Volvería a padecer ese horrible primer semestre (con todo y mis dudas de cambiarme de carrera), las interminables horas de camino a la Facultad, tareas, series, prácticas, laboratorios, no comer ni dormir bien, y mi vida social casi inexistente. Ahora después de 5 años, estoy segura de que entrar a esta hermosa Facultad fue la mejor decisión que he tomado. No sólo me brindo una educación excelente a través de profesores que aman enseñar, amigos (hermanos), compañeros; sino que también me ayudo a salir de mi zona de confort . Por siempre F.Q.*

### **A la División de Estudios de Posgrado e Investigación (DEPeI) y Facultad de Odontología.**

*Nunca imagine realizar mi SS, estancia y Tesis en Odontología, pero el proyecto que realicé, la asesoría que tuve, mis compañeros y amigos de Odontología, me alentaron para siempre dar lo mejor de mí. Muchas gracias por aceptarme.*

*Este proyecto fue financiado con el apoyo otorgado a la Dra. Gloria Gutiérrez Venegas por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) a través del Programa de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), proyecto IN201816.*

*Al proyecto antes mencionado por la beca otorgada para la conclusión de mis estudios y posterior realización de tesis.*

# INDICE

|  |          |
|--|----------|
| INDICE DE FIGURAS .....  | VI       |
| INDICE DE ESQUEMAS.....  | VII      |
| INDICE DE TABLAS.....  | VII      |
| ABREVIATURAS .....   | VIII     |
| <b>1. RESUMEN.....</b>   | <b>1</b> |
| <b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>                          | <b>2</b> |
| <b>3. MARCO TEÓRICO.....</b>                                       | <b>3</b> |
| 3.1 PERIODONTO.....  | 3        |
| 3.1.1 Encía:.....  | 3        |
| 3.1.2 Ligamento Periodontal:.....                                  | 4        |
| 3.1.3 Cemento: .....   | 4        |
| 3.1.4 Hueso Alveolar: .....  | 5        |
| 3.2 MICROBIOTA ORAL .....  | 5        |
| 3.2.1 Placa Dentobacteriana .....                                  | 7        |
| 3.2.2 Biopelícula .....  | 7        |
| 3.2.3 Biopelícula Dental.....                                      | 9        |
| 3.2.4 Placa Supragingival y Subgingival .....                      | 10       |
| 3.3 PERIODONTITIS.....   | 12       |
| 3.3.1 Clasificación de la Enfermedad Periodontal.....              | 14       |
| 3.4. MICROORGANISMOS PERIODONTOPATOGENOS .....                     | 15       |
| 3.4.1 <i>Porphyromonas gingivalis</i> .....                        | 16       |
| 3.4.2 Características Bacterianas y Factores de Virulencia.....    | 17       |
| 3.4.3 Lipopolisacárido (LPS) .....                                 | 19       |
| 3.4.4 Mecanismos de evasión de la Respuesta Inmune.....            | 21       |
| 3.5 ENFERMEDAD PERIODONTAL Y SALUD SISTÉMICA.....                  | 22       |
| 3.5.1 Enfermedad periodontal y el riesgo cardiovascular .....      | 23       |
| 3.5.2 Periodontitis como causa de la Endocarditis Infecciosa ..... | 24       |
| 3.6 SISTEMA INMUNOLÓGICO .....                                     | 27       |
| 3.6.1 La inflamación .....   | 28       |
| 3.6.2 Inmunidad Innata.....  | 29       |
| 3.6.3 El Reconocimiento por el Sistema Inmune Innato: PRR.....     | 30       |
| 3.6.4 Receptores Tipo Toll .....                                   | 31       |
| 3.6.5 Estructura de receptores Tipo Toll .....                     | 33       |
| 3.6.6 Vías de señalización activadas por TLR .....                 | 34       |
| 3.6.7 Vía dependiente de MyD88. ....                               | 34       |
| 3.6.8 Vía independiente de MyD88. ....                             | 35       |
| 3.6.9 MAPK (Proteína Cinasas Activadas por Mitógenos).....         | 36       |
| 3.6.10 TLR 2.....  | 38       |
| 3.6.11 TLR 4.....  | 38       |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.7 FLAVONOIDES .....  | 40        |
| 3.7.1 Estructura química y clasificación .....   | 40        |
| 3.7.2 Propiedades biológicas .....   | 42        |
| 3.7.3 Síntesis, Absorción y Metabolismo. ....  | 43        |
| 3.8 APIGENINA .....  | 44        |
| 3.8.1 Localización .....   | 44        |
| 3.8.2 Propiedades Biológicas .....   | 45        |
| <b>4. OBJETIVOS .....</b>  | <b>46</b> |
| 4.1 OBJETIVO GENERAL .....   | 46        |
| 4.2 OBJETIVOS PARTICULARES .....   | 46        |
| <b>5. HIPÓTESIS.....</b>   | <b>47</b> |
| <b>6. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>  | <b>48</b> |
| 6.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO: .....   | 48        |
| 6.2 CRITERIOS CONSIDERADOS: .....  | 48        |
| 6.4 METODOLOGÍA .....  | 49        |
| 6.4.1 Cultivo celular .....  | 49        |
| 6.4.2 Tratamiento celular .....  | 49        |
| 6.4.3 Ensayo de Western blot .....   | 49        |
| 6.4.4 Ensayo de RT-PCR .....   | 50        |
| 6.4.5 Ensayo de MTT .....  | 51        |
| 6.4.6 Análisis estadístico. ....   | 51        |
| <b>7 RESULTADOS.....</b>   | <b>52</b> |
| 7.1 Efecto de apigenina en la viabilidad celular de H9c2 .....   | 52        |
| 7.2 Efecto de apigenina en la activación de la proteína JNK perteneciente a las MAPKs, inducida por <i>Porphyromonas gingivalis</i> . ....     | 53        |
| 7.3 Efecto de apigenina en la activación de la proteína ERK 1/2 perteneciente a las MAPKs, inducida por <i>Porphyromonas gingivalis</i> . .... | 54        |
| 7.4 Efecto de apigenina en la activación de la proteína p38 perteneciente a las MAPKs, inducida por <i>Porphyromonas gingivalis</i> . ....     | 55        |
| 7.5 Efecto de apigenina en la transcripción y traducción de COX-2 inducido por LPS de <i>Porphyromonas gingivalis</i> . ....                   | 56        |
| <b>8 DISCUSIÓN.....</b>  | <b>58</b> |
| <b>9 CONCLUSIÓN.....</b>   | <b>64</b> |
| <b>10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>  | <b>65</b> |

## INDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Estructura del periodonto. ....  | 4  |
| <b>Figura 2.</b> Formación de Biopelícula bacteriana. ....  | 8  |
| <b>Figura 3.</b> Modelo de biopelícula oral. ....   | 11 |
| <b>Figura 4.</b> Transición del periodonto sano a periodontitis. ....   | 14 |
| <b>Figura 5.</b> Características microbiológicas de <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277. ....                      | 17 |
| <b>Figura 6.</b> Estructura química del Lipopolisacárido. ....  | 21 |
| <b>Figura 7.</b> Proceso de formación de vegetaciones en la Endocarditis Infecciosa. ....                                 | 26 |
| <b>Figura 8.</b> Estructura tridimensional de TLRs. ....  | 33 |
| <b>Figura 9.</b> Localización y las vías de señalización activadas por los receptores tipo Toll (TLRs). ....              | 36 |
| <b>Figura 10.</b> Cascada de señalización para TLR4. ....   | 39 |
| <b>Figura 11.</b> Estructura química de la Apigenina. ....  | 44 |
| <b>Figura 12.</b> Efecto de apigenina en la viabilidad celular H9c2. ....   | 52 |
| <b>Figura 13.</b> Efecto de Apigenina sobre la acción de LPS en la activación de JNK en células H9c2. ....                | 53 |
| <b>Figura 14.</b> Efecto de Apigenina sobre la acción de LPS en la activación de ERK en células H9c2. ....                | 54 |
| <b>Figura 15.</b> Efecto de Apigenina sobre la acción de LPS en la activación de p38 en células H9c2. ....                | 55 |
| <b>Figura 16.</b> Efecto de Apigenina sobre la acción de LPS en la transcripción de la enzima COX-2 en células H9c2. .... | 56 |
| <b>Figura 17.</b> Efecto de Apigenina sobre la acción de LPS en la activación de la enzima COX-2 en células H9c2. ....    | 57 |

## INDICE DE ESQUEMAS

|  |   |
|--|---|
| <b>Esquema 1.</b> Proporción de microorganismos presentes en la cavidad oral. .... | 6 |
|--|---|

## INDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 1.</b> Clasificación de las Enfermedades Periodontales ..... | 16 |
|---|----|

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 2.</b> Localización celular, origen y principales ligandos para los TLRs presentes en el ser humano. .... | 32 |
|--|----|

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 3.</b> Clasificación de Flavonoides, estructura y fuente alimenticia. .... | 41 |
|---|----|

## ABREVIATURAS

|               |   |
|---------------|---|
| <b>A (R)</b>  | Arginina  |
| <b>ADN</b>    | Ácido desorribonucleico                           |
| <b>AI</b>     | Autoinductor                                      |
| <b>Akt</b>    | Proteína cinasa B                                 |
| <b>ALRS</b>   | Receptores tipo AIM2                              |
| <b>AP-1</b>   | Proteína activadora 1                             |
| <b>APP</b>    | Academia Americana Periodontología                |
| <b>ARN</b>    | Ácido ribonucleico                                |
| <b>ATCC</b>   | American type culture collection                  |
| <b>ATP</b>    | Adenosina trifosfato                              |
| <b>C3</b>     | Componente 3 del complemento                      |
| <b>CBG</b>    | Cannabigerol                                      |
| <b>CD</b>     | Células dendríticas                               |
| <b>CD-14</b>  | Grupos de diferenciación 14                       |
| <b>CD-36</b>  | Grupos de diferenciación 36                       |
| <b>CLR</b>    | Receptores de lectina tipo C                      |
| <b>CoA</b>    | Coenzima A  |
| <b>COX2</b>   | Ciclooxigenasa-2                                  |
| <b>CpG</b>    | Islas CpG   |
| <b>CREB</b>   | Elemento de unión de respuesta a AMPc             |
| <b>CREB</b>   | Proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP |
| <b>DABCO</b>  | 1,4 diazabicyclo-octano                           |
| <b>DAMPs</b>  | Patrones moleculares asociados a daño             |
| <b>DAPI</b>   | 4',6-diamino-2-fenilindol                         |
| <b>DEPC</b>   | Dietilpirocarbonato                               |
| <b>DMEM</b>   | Medio Eagle modificado por Dulbecco               |
| <b>DNA</b>    | ácido desoxirribonucleicos                        |
| <b>dsRNA</b>  | Ácido ribonucleico de cadena doble                |
| <b>ECV</b>    | Enfermedad Cardiovascular                         |
| <b>ERK1/2</b> | Cinasa regulada extracelularmente 1/2             |
| <b>ETTT</b>   | Ecocardiografía Trasesofágica                     |
| <b>Fim-A</b>  | Fimbria A   |
| <b>FITC</b>   | Isotiocianato de fluoresceína                     |
| <b>G0</b>     | Fase G0 del ciclo celular                         |
| <b>G1</b>     | Fase G1 del ciclo celular                         |
| <b>G2</b>     | Fase G2 del ciclo celular                         |
| <b>M</b>      | Fase Mitosis del ciclo celular                    |
| <b>GADPH</b>  | Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa           |
| <b>HA</b>     | Superficie apática mineral                        |
| <b>HMGB1</b>  | Grupo de proteína 1 de alta movilidad             |
| <b>HOMD</b>   | Base de Datos del Microbioma Oral Humano          |
| <b>hPDL</b>   | Ligamento periodontal humano                      |
| <b>HSP</b>    | Proteínas de choque térmico                       |
| <b>IgG</b>    | Inmunoglobulinas                                  |

|                                       |  |
|---------------------------------------|--|
| <b>IκB</b>                            | Inhibidor de NF-KB   |
| <b>IL</b>                             | Interleucina   |
| <b>IL-1R</b>                          | Receptor de Interleucina 1                                 |
| <b>INF-γ</b>                          | Interferon gamma   |
| <b>iNOS</b>                           | Óxido nítrico sintasa inducible                            |
| <b>IRAK</b>                           | Cinasa asociado al receptor de IL-1                        |
| <b>IRF-3</b>                          | Factor regulador de IFN-3                                  |
| <b>JNK</b>                            | Cinasa c-Jun N-terminal                                    |
| <b>K</b>                              | Lisina   |
| <b>KDO</b>                            | ácido 3-desoxi-D-manooctulosónico                          |
| <b>LBP</b>                            | Proteína de unión a Lipopolisacárido                       |
| <b>LPS</b>                            | Lipopolisacárido   |
| <b>LRR</b>                            | Repeticiones ricas en Leucina                              |
| <b>LTA</b>                            | Ácido lipoteicoico   |
| <b>MALP2SK<sub>4</sub></b>            | Diacil lipopeptidos (Ligandos sintéticos)                  |
| <b>MAPK</b>                           | Proteína cinasa activada por mitógenos                     |
| <b>MAPKK o MEK</b>                    | Cinasa de la MAPK  |
| <b>MAPKKK o MEKK</b>                  | Cinasa de la cinasa de la MAPK                             |
| <b>MD2</b>                            | Factor de Diferenciación mieloide 2                        |
| <b>Mfa</b>                            | Fimbria menor  |
| <b>MKK3</b>                           | MAP cinasa cinasa 3  |
| <b>MPE</b>                            | Matriz Polimérica Extracelular                             |
| <b>MTT</b>                            | Bromuro de 3-(4,5- dimetiliazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol |
| <b>MyD88</b>                          | Factor de Diferenciación mieloide 88                       |
| <b>NCBI</b>                           | Centro Nacional para la información biotecnológica         |
| <b>NEMO</b>                           | Modulador esencial de NF-kb                                |
| <b>NF-kb</b>                          | Factor de Transcripción nuclear-kb                         |
| <b>NIH</b>                            | Instituto Nacional de Salud                                |
| <b>NKs</b>                            | Células asesinas naturales                                 |
| <b>NOD</b>                            | Dominio de oligomerización de unión de a nucleótidos       |
| <b>P 105</b>                          | subunidad p105 del factor nuclear NF-kappa-B               |
| <b>p 38</b>                           | Proteína cinasa p38  |
| <b>p 50</b>                           | Subunidad 50 del dímero NF-kappa-B                         |
| <b>p 53</b>                           | Proteína apoptotica p53                                    |
| <b>p 65</b>                           | Subunidad 65 del dímero NF-kappa-B                         |
| <b>Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub></b> | Lipopéptido triacetilado                                   |
| <b>PAMPs</b>                          | Patrones Moleculares asociados a Patógenos                 |
| <b>PBS</b>                            | Buffer de Fosfato salino                                   |
| <b>PCR</b>                            | Reacción en cadena de la polimerasa                        |
| <b>PGD<sub>2</sub></b>                | Prostaglandina D2  |
| <b>PGE</b>                            | Prostaglandinas  |
| <b>PGE<sub>2</sub></b>                | Prostaglandina E2  |
| <b>PGF<sub>2α</sub></b>               | Prostaglandina F2α   |
| <b>PGH<sub>2</sub></b>                | Prostaglandina H2  |

|                        |   |
|------------------------|---|
| <b>PGHS</b>            | Prostaglandina-endoperóxido sintasa                             |
| <b>PGI<sub>2</sub></b> | Prostaglandina I <sub>2</sub>                                   |
| <b>PGN</b>             | Peptidoglicano  |
| <b>PI3K</b>            | Fosfatidilinositol-3-cinasa                                     |
| <b>PKC</b>             | Proteína cinasa C   |
| <b>PMN</b>             | Polimorfonucleares  |
| <b>PRP</b>             | Proteínas ricas en prolina                                      |
| <b>PRR</b>             | Receptores de Reconocimiento                                    |
| <b>PVDF</b>            | Polifluoruro de vinilideno                                      |
| <b>R-848</b>           | Resiquimod. Ligando selectivo para TLR                          |
| <b>Ras</b>             | Proteínas Ras   |
| <b>RLR</b>             | Receptores tipo RIG-I   |
| <b>RM</b>              | Resonancia Magnética  |
| <b>RNA</b>             | Ácido Ribonucleico  |
| <b>RT-PCR</b>          | Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa   |
| <b>SBF</b>             | Suero Bovino fetal  |
| <b>SDS-PAGE</b>        | Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS                     |
| <b>SphK1/S1P</b>       | Esfingosina quinasa 1 / esfingosina 1-fosfato                   |
| <b>TAB</b>             | Proteínas de unión a TAK1                                       |
| <b>TAK-1</b>           | Cinasa activada de TGF-β  |
| <b>TBS</b>             | Tris Buffer Salino  |
| <b>TC</b>              | Tomografía computarizada  |
| <b>TGF-β1</b>          | Factor de crecimiento transformante beta 1                      |
| <b>Thr-X-Tyr</b>       | Treonina- X- Tirosina   |
| <b>TIR</b>             | Receptor Toll/IL-1R   |
| <b>TIRAP</b>           | Proteína adaptadora con dominio TIR                             |
| <b>TLP-2</b>           | Progresión tumoral Locus 2                                      |
| <b>TLR</b>             | Receptor tipo Toll  |
| <b>TNF- α</b>          | Factor de Necrosis Tumoral alpha                                |
| <b>TPA</b>             | 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato                             |
| <b>TRAM</b>            | Molécula adaptadora relacionada a TRIF                          |
| <b>TRIF</b>            | Proteína adaptadora con dominio TIR inductor de Interferón beta |
| <b>TXA<sub>2</sub></b> | Tromboxano A <sub>2</sub>                                       |

## 1. RESUMEN

La enfermedad periodontal es un padecimiento de inflamación crónica localizada que se origina en la cavidad oral, sin embargo, está relacionado con el inicio, desarrollo y progresión de enfermedades sistémicas como la Endocarditis Infecciosa. Por otro lado, Apigenina es un flavonoide que exhibe un amplio espectro de actividad biológica, destaca, su propiedad anti-inflamatoria, antioxidante, anti-cancerígena y antimicrobiana. Este estudio tuvo como objetivo investigar los efectos anti-inflamatorios de Apigenina en la expresión de cinasas de la vía de señalización MAPK, así como, en la regulación a nivel de transcripción y traducción de la enzima COX-2 en la línea celular H9c2 estimulada con Lipopolisacárido (LPS) de *Porphyromonas gingivalis*. En primera instancia para descartar un efecto citotóxico del flavonoide en las células, se elaboró un ensayo de MTT. Adicionalmente, mediante Western blot, se determinó si Apigenina regulaba la activación de las cinasas p38, JNK, ERK (1/2) y de la enzima COX-2, estimulada por LPS de *P. gingivalis*. Finalmente, mediante un ensayo de RT-PCR se evaluó la modulación del flavonoide en la transcripción de COX-2. Se encontró que Apigenina no ejerce efecto citotóxico en las células H9c2 a 24, 48 y 72 hrs. Además este flavonoide inhibió de manera dependiente de la concentración la expresión de las proteínas JNK, p38 y ERK (1/2) inducidas por LPS en células cardíacas, siendo 15  $\mu\text{M}$  la concentración de mayor efecto. Por último se determinó que el flavonoide Apigenina disminuyó la cantidad de expresión del mRNA, activado por el ligando, de COX-2 en los cardiomiocitos de manera dependiente de la concentración, siendo 10  $\mu\text{M}$  la concentración más efectiva. Se observó una tendencia similar para la expresión de la proteína de COX-2. En conclusión, los resultados sugieren que Apigenina es capaz de disminuir la fosforilación de las moléculas implicadas en el proceso de inflamación inducido por el Lipopolisacárido de *P. gingivalis*, mediante la modulación en la vía de señalización intracelular MAPK y la enzima COX-2.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De acuerdo con los resultados del Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Patologías Bucales (SIVEPAB), coordinada por la Secretaría de Salud (SSA) , cerca del 59.6% de la población adulta en México presentan algún signo de enfermedad periodontal.<sup>1</sup> Este padecimiento es un proceso de inflamación crónica localizada ocasionada por bacterias patógenas presentes en la biopelícula oral. En un principio causa la destrucción del periodonto, y en casos más graves provoca la pérdida del órgano dentario. Estudios epidemiológicos han demostrado que las infecciones orales representan un factor de riesgo en el desarrollo y progresión de condiciones sistémicas, por ejemplo, enfermedades cardiovasculares. La endocarditis bacteriana es una infección del revestimiento de las cavidades del corazón, causada por bacterias y otros microorganismos. El origen de esta infección es producido por bacteremias transitorias, debido a procedimientos quirúrgicos. Sin embargo, en pacientes con periodontitis avanzada, actividades cotidianas como masticar alimentos o el cepillado dental, propician el deterioro de la encía. Este evento permite que las bacterias migren al torrente sanguíneo y colonicen las válvulas cardíacas.

Normalmente los microorganismos de la cavidad oral desempeñan funciones benéficas para el huésped. No obstante, cuando incrementa la población de bacterias patógenas como *Porphyromonas gingivalis* en la biopelícula oral, desemboca en estados de inflamación del tejido periodontal; primero como gingivitis y después como Periodontitis. Esto promueve la migración de células del sistema inmune y producción de citocinas pro-inflamatorias. La activación de vías de señalización ante el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) como el Lipopolisacárido, mediante receptores de reconocimiento de patrones (PRR), funge un papel primordial en procesos inflamatorios. El tratamiento de la enfermedad periodontal tiene como finalidad reducir la inflamación y corregir causas subyacentes de este padecimiento. Por ello, destaca la investigación de compuestos de origen natural como los flavonoides, compuestos polifenólicos producto del metabolismo de plantas, con potencial preventivo y terapéutico, al modular la respuesta inflamatoria y combatir microorganismos causantes de la enfermedad periodontal. Por tal motivo, el objetivo de esta investigación es determinar el efecto del flavonoide Apigenina en la regulación de las vías de señalización en la línea celular H9c2 derivada de cardiomiocitos estimulados con LPS de *Porphyromonas gingivalis*.

### **3. MARCO TEÓRICO**

#### **3.1 PERIODONTO**

La palabra periodonto significa (peri = alrededor, odontos = diente), denominado también “aparato de inserción o tejido de sostén de los dientes”, constituye una unidad de carácter biológico y funcional. Factores como la edad y el ambiente bucal propician cambios en su morfología y función. El periodonto comprende las siguientes estructuras: la encía, el ligamento periodontal, el cemento y el hueso alveolar. Se ha dividido en dos partes: la encía y aparato de inserción (el ligamento periodontal, el cemento y el hueso alveolar) <sup>2, 3</sup>.

##### **3.1.1 Encía:**

Forma parte de la mucosa oral que cubre y protege la porción del diente que está unido al hueso alveolar, así como, la porción cervical de los dientes (Figura 1). La encía es de color rosado en la corona de los dientes, mientras que, en sentido apical ésta continúa con la mucosa alveolar hasta la unión mucogingival <sup>3</sup>.

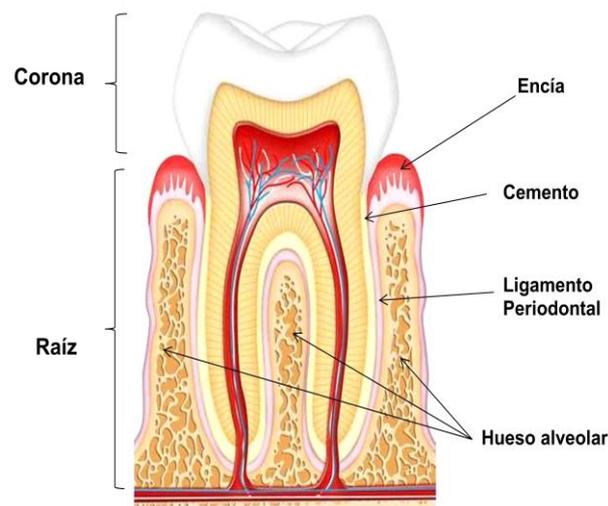
Entre la encía y el diente existe un espacio denominado surco gingival. En este sitio y en condiciones de homeostasis, habitan gran variedad de microorganismos comensales. Sin embargo, cuando se perturba el equilibrio, el surco gingival puede ser colonizado por bacterias patógenas que ocasionan daño al periodonto. Histológicamente está compuesto de epitelio gingival y de tejido conjuntivo. Anatómicamente, la encía se divide en: encía marginal, encía insertada y encía interdental <sup>2,4</sup>.

En relación con los elementos celulares presentes en la encía, destaca el fibroblasto gingival, encargado de la síntesis y degradación de algunos componentes de matriz extracelular y de fibras de colágeno. No obstante, también se encuentran diversidad de células que abarcan desde macrófagos, histocitos, mastocitos, eosinófilos, neutrófilos, linfocitos y plasmocitos <sup>5</sup>.

### 3.1.2 Ligamento Periodontal:

Se compone de un tejido conectivo blando altamente especializado que rodea la raíz del diente y establece la unión al hueso alveolar adyacente <sup>2</sup>. Las principales fibras que componen esta estructura son de colágeno, éstas se encargan de absorber y disipar la carga oclusal ejercida en los dientes durante la masticación. Además de las fibras de colágeno, el ligamento periodontal está constituido por vasos sanguíneos y nervios, cuya finalidad es aportar nutrientes al resto de las estructuras dentales y participar en la transmisión de estímulos por las vías trigeminales, respectivamente.

En su mayoría, la población celular es altamente heterogénea conformada por fibroblastos, cementoblastos, osteoblastos, osteoclastos, células endoteliales vasculares, periocitos, macrófagos, mastocitos y eosinófilos <sup>2, 6</sup>.



**Figura 1.** Estructura del periodonto.

Anatómicamente se divide en corona o parte superior y raíz o parte inferior. Se ilustra la localización de cada componente en el aparato de inserción o periodonto.

Adaptada de Newman MG *et al.* Carranza's Clinical Periodontology .Elsevier Health Sciences. 2011.

### 3.1.3 Cemento:

Es un tejido mineral no vascularizado, que cubre la superficie de la raíz de los dientes. Realiza dos funciones esenciales, primero a través de la inserción de fibras de colágeno del ligamento periodontal al hueso alveolar con el propósito de fijar los dientes. Además, actúa como una cubierta protectora sobre la superficie de la dentina que evita reabsorción radicular (fenómeno de lisis) ocasionado por la remodelación del periodonto<sup>3</sup>.

En contraste con el ligamento periodontal y el hueso alveolar, el cemento no se somete a rotación continua, no obstante, es capaz de incrementar de espesor. Histológicamente se clasifica en: cemento celular o primario que se forma a medida que se forma la raíz del diente, y cemento celular o secundario desarrollado luego de la erupción dentaria <sup>3</sup>.

### **3.1.4 Hueso Alveolar:**

Se localiza en los maxilares superior e inferior de la cavidad oral que rodean y contienen los alveolos dentarios, los cuales son cavidades cónicas donde se encuentran insertados los dientes. La función del hueso alveolar consiste en proporcionar una estructura idónea, a través del cemento y ligamento periodontal, que suministre al sistema dentario el soporte necesario durante el proceso de contacto de los dientes, masticación, deglución y fonación. Está conformado por hueso compacto y hueso trabecular. Al igual que otros huesos, el hueso alveolar también sufre remodelación fisiológica, principalmente, producto del movimiento dental y otros estímulos externos<sup>4</sup>. Con respecto a la población celular, se encuentran en abundancia osteoblastos (principales células responsables de la resorción ósea), osteocitos, células óseas de revestimiento o bordeantes y osteoclastos <sup>2,4</sup>.

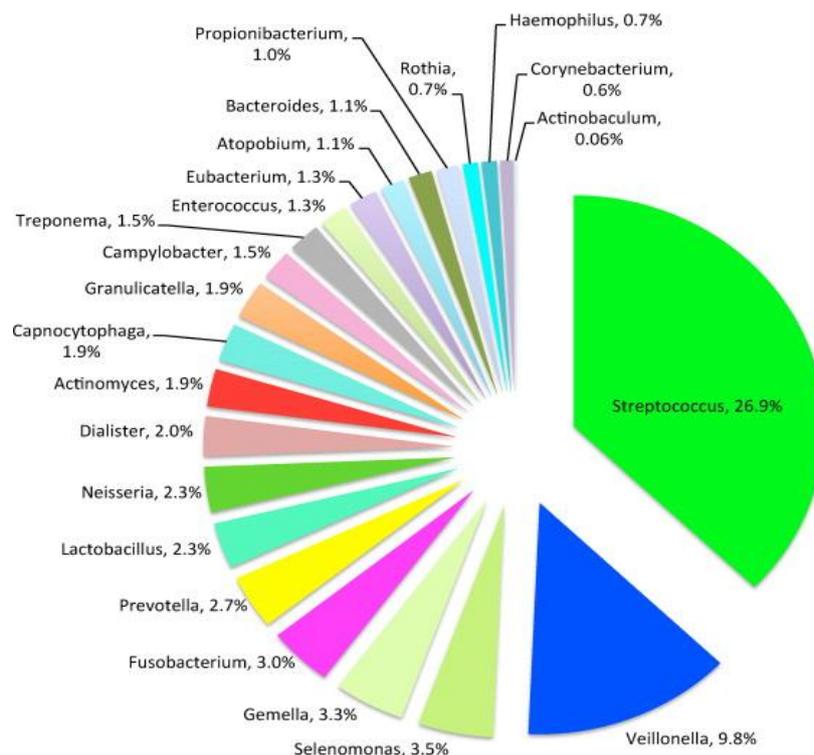
Es importante resaltar que cada estructura además de proporcionar soporte al sistema dentario, establece una barrera contra la penetración de agentes patológicos a tejidos profundos <sup>2,5</sup>.

## **3.2 MICROBIOTA ORAL**

El Microbioma oral está conformado de una gran cantidad de organismos entre los que se incluyen, bacterias, hongos, protozoos, virus y arqueas. El desarrollo de éstos obedece a factores como disponibilidad de nutrientes, concentraciones de oxígeno, temperatura, condiciones de pH, exposición a factores inmunológicos y características anatómicas. Sin embargo, la estabilidad de la microbiota oral también puede ser modificada por condiciones propias del huésped, particularmente, la dieta y el uso de antibióticos <sup>7</sup>. Recientes avances en técnicas de secuenciación del ácido desoxirribonucleico (ADN), ha permitido la creación de Bases de Datos que analizan distintas zonas del cuerpo humano.

Como ejemplo de lo anterior, se encuentra la Base de Datos del Microbioma Oral Humano (HOMD) con 34,753 secuencias clonadas de sitios sanos y enfermos de la cavidad oral humana. Entre otros resultados, esta base de datos permite conocer, por ejemplo, la proporción de microorganismos que habitan la cavidad oral (Esquema 1)<sup>7</sup>.

El microbioma comensal desempeña un papel primordial en el mantenimiento de la salud, y la cavidad oral no es la excepción. La presencia de la microbiota oral inhibe la colonización por patógenos, no solo por la ocupación de sitios de colonización, también debido a que algunas bacterias comensales actúan como antagonistas para patógenos orales. Otra propiedad benéfica del microbioma oral, se relaciona con el metabolismo del nitrógeno y su relación con la salud cardiovascular. En años recientes se ha comprobado que las bacterias orales reducen el nitrato, del torrente sanguíneo, a nitrito, el cual es convertido en óxido nítrico. Éste al llegar a los vasos sanguíneos ejerce un efecto anti-hipertensivo<sup>8</sup>.



**Esquema 1.** Proporción de microorganismos presentes en la cavidad oral.

En mayor cantidad se encuentran bacterias cocáceas Gram-positivas del género *Streptococcus*, seguido de cocos anaerobios Gram-negativos correspondientes a *Veillonella*. Por otro lado, las bacterias presentes en menor proporción son del género *Actinobaculum* y *Corynebacterium*.

Recuperado de Costalonga Massimo *et al.* The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. Immunology letters.2014

### 3.2.1 Placa Dentobacteriana

La placa dentobacteriana se define como una comunidad microbiana compuesta por numerosas especies, que se encuentran adheridas sobre la superficie dental y forman una biopelícula, la cual está constituida de polímeros de origen bacteriano y salival.

Se presenta en la boca de individuos sanos y enfermos, sin embargo, es un factor determinante en el inicio de las enfermedades orales más importantes: la caries dental y la enfermedad periodontal <sup>9</sup>.

### 3.2.2 Biopelícula

La biopelícula o biofilm, es una formación de agregados bacterianos altamente heterogénea, que se pueden adherir a superficies bióticas y abióticas, y se encuentran embebidos en una matriz polimérica extracelular. El soporte de la biopelícula es la Matriz Polimérica Extracelular (MPE) constituida por exopolisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos. Estos compuestos son secretados por los grupos bacterianos presentes en función del microambiente en el que se encuentren. En general, los exopolisacáridos funcionan como andamios que permiten la unión de proteínas, otros hidratos de carbono, ácidos nucleicos y lípidos <sup>10</sup>. La MPE favorece la existencia de canales que permiten el flujo de agua, la presencia de oxígeno y de los nutrientes necesarios para sostener las necesidades metabólicas de los microorganismos <sup>10,11</sup>.

La formación de biopelículas es un proceso altamente ordenado que se puede resumir en tres etapas: fijación, la maduración y dispersión (Figura 2).

#### i. Fijación:

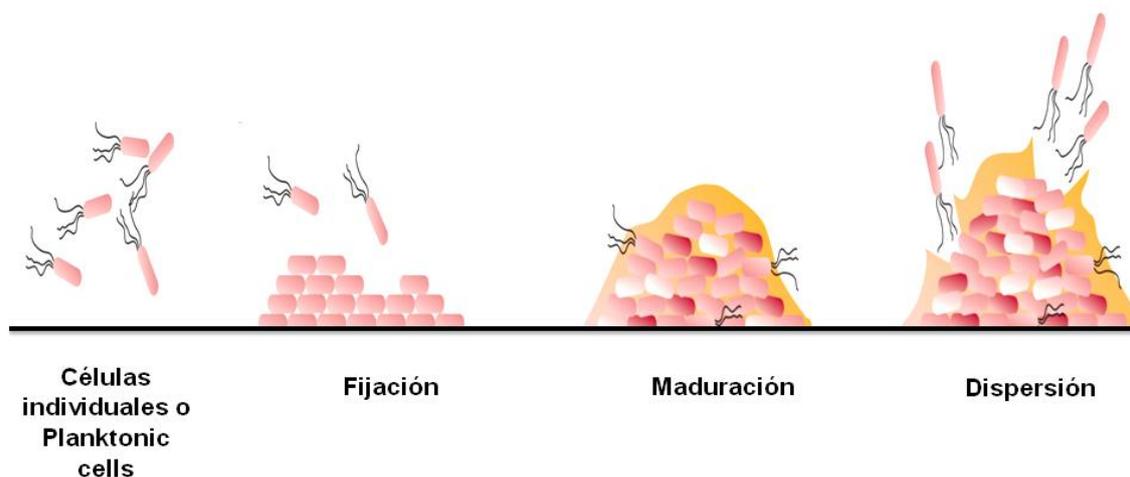
Proceso caracterizado por la colonización de especies iniciales debido a la co-adherencia y co-agregación de varios microorganismos ordenados según su metabolismo y tolerancia aerodinámica. A causa de esto, la biopelícula crece en forma de torre, aumenta su conformación celular y favorece la tolerancia a fuerzas de índole química o física.

## ii. Maduración:

En esta etapa se produce la MPE secretada por las bacterias atrapadas. Al mismo tiempo, éstas funcionan como andamios para el anclaje de otros microorganismos. La comunicación e interacción de la microbiota es mediado por adhesinas (superficie celular bacteriana) que se unen específicamente a moléculas complementarias denominadas receptores (huésped). De manera general, las adhesinas en su mayoría son lectinas que están asociadas a las fimbrias o pilis de las células bacterianas y se unen a receptores sacáridos.

## iii. Dispersión:

Consiste en la separación coordinada de células diferenciadas, móviles y quimiotácticas conocidas como células de dispersión. Este fenómeno es causado por la perturbación del microambiente, por ejemplo: falta de nutrientes, competencia microbiana, crecimiento excesivo de la población entre otras. Estas células pueden colonizar nuevas superficies y reiniciar el ciclo de vida de las biopelículas <sup>10, 12,13</sup>.



**Figura 2.** Formación de Biopelícula bacteriana.

En la etapa de Fijación, células individuales bacterianas realizan co-adherencia sobre una superficie, posteriormente existe co-agregación de varios tipos de microorganismos. Después de alcanzar una densidad celular determinada, se induce la síntesis de moléculas que permiten la comunicación celular y con ello la secreción de MPE hasta conseguir la maduración de la biopelícula. Por último, si el microambiente es perturbado se inicia la dispersión de componentes de la biopelícula.

Adaptada de Raghavan Mekhala. *New Strategies Needed in Infection & Contamination Control: Spotlight on Anti-Biofilm Technologies*. 4INNO COPYRIGHT © .2013.

### 3.2.3 Biopelícula Dental

La cavidad oral consiste de más de 700 especies microbianas diferentes, de las cuales aproximadamente de 100 a 200 especies se encuentran en tejidos sanos. Esto sitúa a la cavidad bucal como un complejo ecosistema estructural y dinámico <sup>9,13</sup>.

Además, la boca es un microambiente dinámico que se caracteriza por constantes fluctuaciones de saliva, cambios de temperatura y entrada de nutrientes. La totalidad de estos elementos provoca que la composición bacteriana presente en la biopelícula esté relacionada con los cambios en el ambiente local <sup>10</sup>.

En la cavidad oral los microorganismos se pueden adherir a tejidos blandos y duros. Los tejidos blandos están compuestos por células epiteliales que recubren la mucosa oral. Éstas tienen tasas de rotación rápida, lo que ocasiona que las bacterias adheridas se eliminen junto con las células epiteliales muertas. Sin embargo, los dientes no poseen estructuras de recambio, por tanto, la superficie de los mismos es predominantemente colonizada<sup>13</sup>. La superficie del esmalte está cubierta por una delgada capa denominada “película adquirida”. Esta película tiene menos de 1 micra de espesor y se forma por la adsorción selectiva de los componentes de fluidos orales a la superficie apatítica mineral (HA) del esmalte. Uno de los principales componentes de la biopelícula adquirida son las proteínas ricas en prolina o PRP. Estas proteínas son principalmente responsables de la adhesión de cierto tipo de bacterias al diente <sup>15</sup>.

En una biopelícula oral se distinguen dos grupos de microorganismos, los colonizadores tempranos o primarios y los colonizadores tardíos o secundarios, en función del tiempo en el que colonizan los dientes. Los colonizadores tempranos son predominantemente bacterias aerobias cocáceas y bacilares Gram-positivas, como *Streptococcus* y *Actinomyces* (Figura 3). El proceso de adherencia de una bacteria a la superficie del diente se conoce como co-adherencia. Este fenómeno es mediado por moléculas de adhesión bacteriana que interactúan con receptores presentes en la superficie dental principalmente PRP. Una vez que se ha establecido la unión de bacterias a la superficie dental, es necesaria la unión célula-célula de microorganismos genéticamente diferentes, esta fase se denomina co-agregación. Es un proceso altamente específico e involucra el reconocimiento de receptores presentes en una célula y por adhesinas afines en la célula vecina.

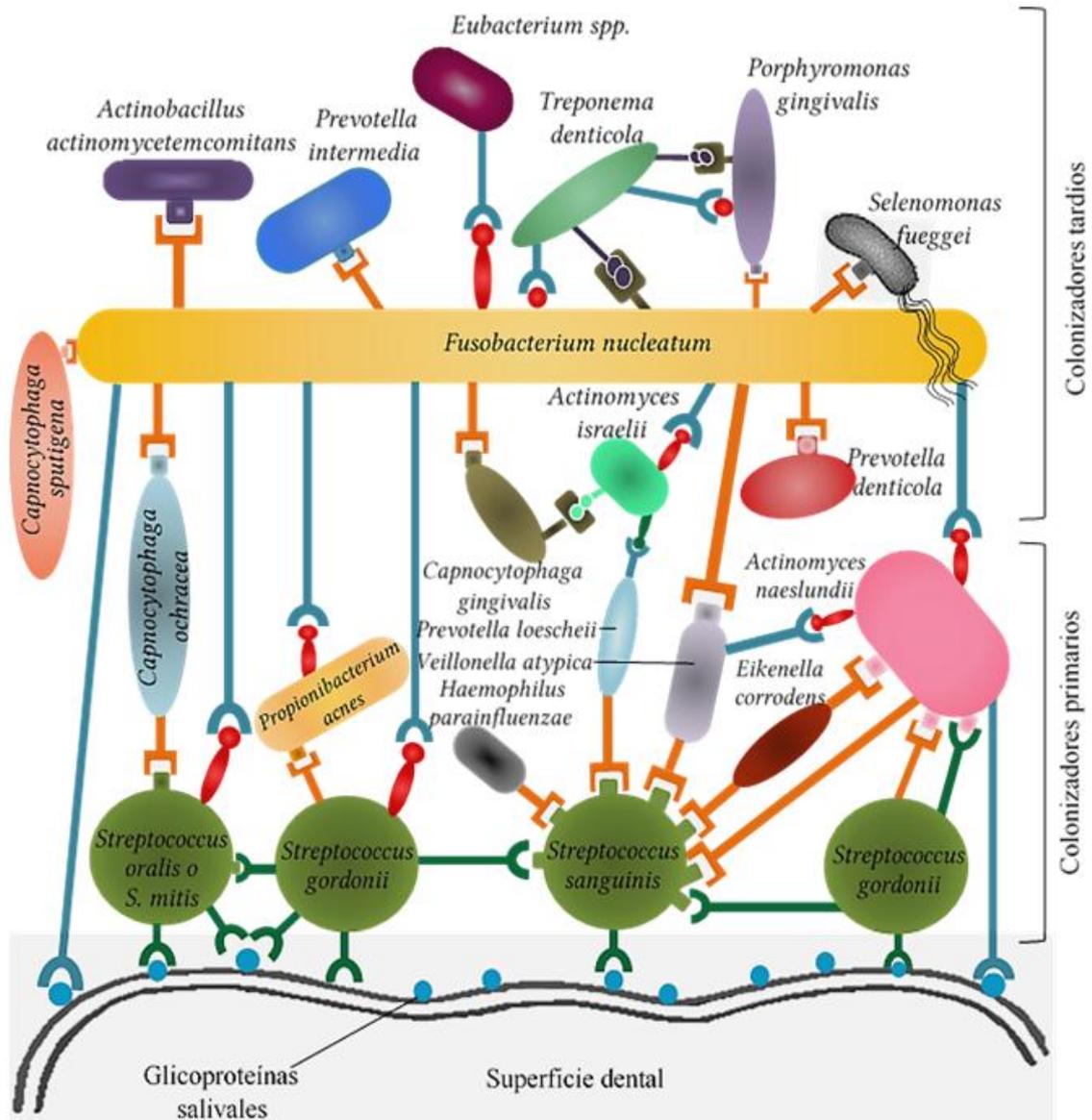
En su mayoría, estas interacciones consisten en la unión de una adhesina de tipo proteico y un receptor de tipo carbohidrato<sup>13-16</sup>. Debido a que los colonizadores primarios requieren el consumo de oxígeno, provocan una reducción en el potencial redox, lo que favorece un medio ambiente anaerobio para los colonizadores tardíos. Algunas especies pueden realizar co-agregación bacteriana con una gran diversidad de microorganismos. Tal es el caso de *Fusobacterium nucleatum*, bacteria anaerobia facultativa Gram-negativa, que actúa como “puente” para la co-agregación de colonizadores tardíos.

Los colonizadores secundarios son un grupo de microorganismos anaerobios estrictos. Esta formado esencialmente por especies pertenecientes a los géneros *Campylobacter*, *Capnocytophaga*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Treponema* y *Tannerella*, entre otras. (Figura 3)<sup>13,16</sup>. Por el contrario de los colonizadores primarios, las bacterias que predominan en la biopelícula madura son anaerobias y su metabolismo emplea aminoácidos y péptidos como fuente de energía<sup>14</sup>.

### 3.2.4 Placa Supragingival y Subgingival

De acuerdo a su localización los microorganismos en la cavidad oral forman dos tipos de biopelícula en la superficie dental: La placa supragingival y la placa subgingival. Estas difieren de manera significativa en la composición de la flora bacteriana. La placa supragingival constituye la biopelícula que recubre la zona descubierta del diente. Se pueden encontrar microorganismos aerobios Gram-positivos sacarolíticos, incluyendo *Streptococcus*, *Actinomyces*, y *Lactobacillus*. La principal fuente de nutrientes para la placa supragingival es la saliva, ya que contiene glicoproteínas que pueden ser degradados por glicosidasas en moléculas de azúcar y proteínas<sup>8,13</sup>.

La placa subgingival, integrada por la biopelícula del surco gingival o bolsa periodontal, se localiza por debajo del margen gingival (entre superficie de la encía y el diente). En condiciones normales en este surco habitan bacterias anaerobias facultativas y estrictas en diferentes proporciones. Las especies que sobresalen son: *F. nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *V. dispar*, *A. oris*, *S. anginosus*, *P. intermedia*, *S. oralis*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola* (éstos tres últimos en cantidades menores al 3%)<sup>8,13</sup>.



**Figura 3.** Modelo de biopelícula oral.

La superficie de los dientes está cubierta por una película adquirida rica en PRPs. Estos receptores son reconocidos por las bacterias que funcionan como colonizadores primarios (*Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus gordonii* y *Streptococcus sanguis*). Otras bacterias se unen a los colonizadores primarios mediante adhesinas y receptores correspondientes. Destaca la participación de *Fusobacterium nucleatum*, que funciona como plataforma para la co-agregación de los colonizadores tardíos.

Adaptado de Bakaletz Lauren O. Developing animal models for polymicrobial diseases. Nature Reviews Microbiology 2. 2004

La biopelícula subgingival está rodeada por el fluido crevicular gingival, el cual es un exudado inflamatorio que proviene del tejido conectivo, y fluye hacia el surco gingival y el epitelio descamado. Este fluido contiene glicoproteínas, proteínas, péptidos y aminoácidos. Los compuestos nitrogenados de estas moléculas pueden ser metabolizados por la placa subgingival en ácidos grasos de cadena corta, amoníaco,

compuestos de azufre, los cuales inducen inflamación a través de la modulación del sistema inmune. Estos procesos contribuyen con el inicio y promoción de afecciones en el periodonto, como la gingivitis y la periodontitis. Cabe mencionar que la eliminación de la biopelícula supragingival demuestra un efecto mínimo sobre la composición de la placa subgingival<sup>13</sup>.

### **3.3 PERIODONTITIS**

La enfermedad periodontal, afección inflamatoria de tipo crónico, involucra la destrucción progresiva del tejido de soporte del diente y puede causar la pérdida del órgano dentario<sup>17</sup>.

Se considera como una etiología de origen multifactorial. En los últimos años se ha demostrado que la inflamación causada por la comunidad bacteriana presente en la biopelícula oral y la respuesta inmune del huésped, son los factores preponderantes de esta patología. A consecuencia de esta interacción, existe inflamación de tejidos blandos y liberación de mediadores de la inflamación<sup>18</sup>.

El inicio, desarrollo y progresión de la enfermedad periodontal en un individuo se determina por factores de riesgo presentes en el huésped. Éstos abarcan desde elementos genéticos hasta factores de riesgo ambientales<sup>19</sup>. A continuación se describen los más relevantes:

- i. Género, Fumar, el alcohol (Estilo de vida).
- ii. Diabetes.
- iii. Obesidad y síndrome metabólico.
- iv. Estrés.
- v. Factores genéticos.
- vi. Hábitos higiénicos.

En cuanto a las etapas clínicas de la enfermedad, en un inicio se forman la placa supragingival y subgingival. Si la placa se elimina o es posible mantenerla en homeostasis con el huésped no se presenta daño al periodonto, sin embargo, si la lesión persiste se convierte en patología (Figura 4)<sup>19</sup>. La lesión periodontal se puede dividir en cuatro etapas: la lesión inicial, la lesión temprana, la lesión establecida y la lesión avanzada.

i. Lesión inicial.

Inmunológicamente se presenta la respuesta de las células endoteliales y los leucocitos residentes a la biopelícula bacteriana, además se estimula la diapédesis de neutrófilos en respuesta a las quimiocinas secretadas. En esta etapa, no hay signos de inflamación, pero se observan cambios en la morfología de los tejidos.

ii. Lesión temprana.

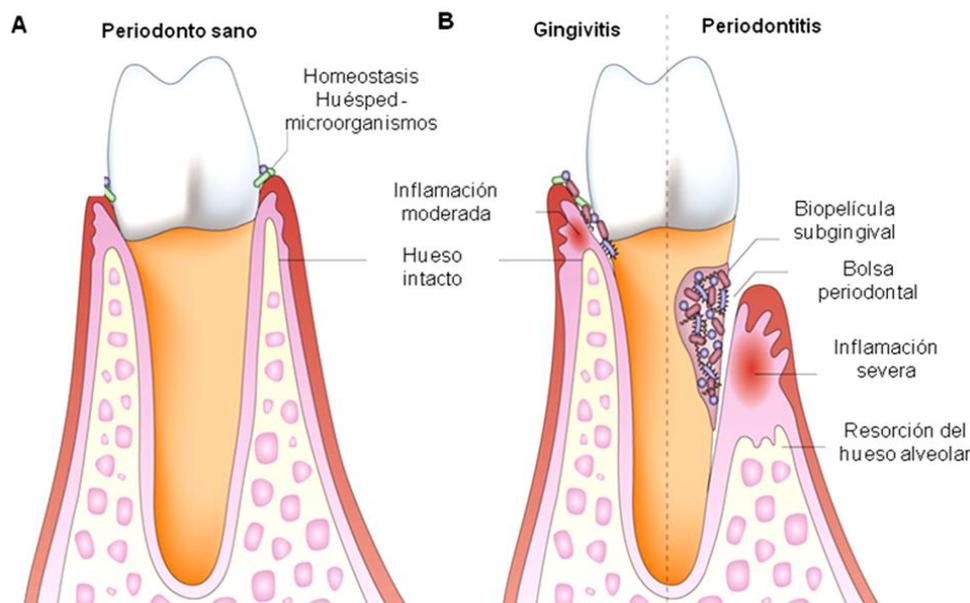
En el sitio afectado incrementa la cantidad de células de defensa y son activadas las proteínas del complemento. En el tejido epitelial prolifera hasta extender el tamaño de la lesión. Como signos clínicos de inflamación gingival destacan: el sangrado y aumenta la secreción de fluido en el surco gingival.

iii. Lesión establecida.

Es el periodo de transición de la respuesta inmune innata a la respuesta inmune adaptativa. Existe presencia de células plasmáticas, linfocitos T y B además de isoformas de los Anticuerpos IgG (IgG1 e IgG3). Por otra parte, los fibroblastos gingivales aumentan la producción de colágeno y el flujo de sangre decrece. Clínicamente, se manifiesta sangrado gingival, cambio en el color y la forma de la encía. Este periodo se considera una gingivitis moderada a severa.

iv. Lesión avanzada.

Esta última etapa también se llama fase destructiva, ya que representa la transición de la gingivitis a la periodontitis<sup>20</sup>. Existe pérdida de inserción irreversible, la lesión se extiende con mayor profundidad hasta afectar el hueso alveolar, lo que clínica e histológicamente se manifiesta como pérdida del hueso. El tratamiento de la enfermedad periodontal tiene como fin eliminar la biopelícula bacteriana, resolviendo de esta manera la inflamación gingival y permitiendo la curación del tejido.



**Figura 4.** Transición del periodonto sano a periodontitis.

**A** Tejido periodontal sano. Se muestra un tejido periodontal sano. En el surco gingival existe colonización de microorganismos comensales en homeostasis con el huésped. El hueso alveolar se observa intacto y sin inflamación del periodonto. **B** Transición de una gingivitis a una periodontitis. El panel izquierdo muestra un surco gingival  $\leq 3$  mm de profundidad que corresponde a una gingivitis. Existe crecimiento de bacterias comensales y algunas patógenas, con inflamación moderada pero se conserva el hueso alveolar intacto. Del lado derecho, se desarrolla una periodontitis. La grieta gingival o bolsa periodontal es  $\geq 4$  mm de profundidad. Constituye un nicho ecológico para la colonización de bacterias de la placa subgingival que inducen la respuesta inflamatoria crónica, que contribuye con la ulceración del aparato de inserción.

Adaptado de Hajishengallis George. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. Nature Reviews Immunology.2015.

### 3.3.1 Clasificación de la Enfermedad Periodontal

Además de la periodontitis, existen otras enfermedades que en menor grado afectan la estructura y funcionalidad del periodonto. En la gingivitis, segunda enfermedad periodontal de importancia, existe inflamación de la encía, lo que causa que éstas se enrojecen y sangren fácilmente. Es reversible con un tratamiento adecuado, sin embargo, una gingivitis no tratada es causa de periodontitis. En esta patología, la placa dentobacteriana puede crecer por debajo de la línea de las encías, en donde, las toxinas liberadas por las bacterias estimulan una respuesta inflamatoria crónica. Se forman bolsas periodontales, surco gingival  $\geq 4$  mm de profundidad, que se infectan y profundizan hasta penetrar tejidos y parte del hueso alveolar (Figura 4). A medida que progresa la enfermedad, el tejido que soporta el diente es destruido y con ello los dientes pueden aflojarse <sup>21</sup>.

En 1999, la Academia Americana de Periodontología (AAP), formó un comité con el fin de unificar los parámetros para la clasificación de la enfermedad periodontal. Este listado se ha renovado en varias ocasiones con base en la aparición de nuevos criterios, por ejemplo, la extensión de la lesión, la gravedad del mismo y el nivel de inserción clínica (grado de soporte periodontal que se ha destruido alrededor de un diente) <sup>22</sup>. La clasificación de la enfermedad periodontal que aprobó *The International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions*, marca en la actualidad los parámetros clínicos (Tabla 1).

Es importante destacar que algunas de las afecciones gingivales son independientes de la placa dentobacteriana. Esto conlleva a que se exhiban otros parámetros asociados, por ejemplo: cambios endocrinos, medicamentos, reacciones alérgicas, traumatismos, infecciones virales y/o fúngicas en la cavidad oral <sup>22</sup>.

### **3.4. MICROORGANISMOS PERIODONTOPATOGENOS**

Como se mencionó anteriormente, la placa subgingival está relacionada con el desarrollo de enfermedades periodontales como la gingivitis o periodontitis. En condiciones saludables la placa subgingival mantiene la homeostasis metabólica con bacterias anaerobias facultativas Gram-positivas. No obstante, factores del microambiente bucal, por ejemplo aumento de secreción del fluido crevicular gingival, y condiciones del huésped, pueden alterar la proporción de ciertas cepas en la biopelícula subgingival <sup>11,14</sup>.

*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* (anteriormente *Bacteroides forsythus*) y *Treponema denticola*, pertenecen a “El complejo rojo”, clasificado por Sigmund Socransky, que refiere los microorganismos periodontopatogénicos involucrados en la iniciación y propagación de la enfermedad periodontal. Cabe destacar que estas bacterias se encuentran presentes cantidades menores en sujetos sanos <sup>7, 14</sup> (Tabla 1).

**Tabla 1.** Clasificación de las Enfermedades Periodontales

|      | <b>Clasificación</b>  | <b>Sub-clasificación</b>   |
|------|---|--|
| I    | Enfermedades Gingivales                                     | Enfermedades inducidas por placa.  |
|      |   | Lesiones gingivales no inducidas por placa.  |
| II   | Periodontitis crónica                                       | Localizada   |
|      |   | Generalizada   |
| III  | Periodontitis agresiva                                      | Localizada   |
|      |   | Generalizada   |
| IV   | Periodontitis como manifestación de Enfermedades Sistémicas | Asociada con desordenes hematológicos  |
|      |   | Asociada con desordenes genéticos  |
|      |   | No específica  |
| V    | Enfermedad Periodontal Necrosante                           | Gingivitis ulcerativa Necrosante (GUN)   |
|      |   | Periodontitis Ulcerativa Necrosante (PUN)  |
| VI   | Abscesos en el Periodonto                                   | Abscesos gingivales  |
|      |   | Abscesos Periodontales   |
|      |   | Abscesos Pericoronales   |
| VII  | Periodontitis asociada con lesiones endodónticas            | Lesiones combinadas Endo-perio   |
| VIII | Deformidades y condiciones adquiridas o del desarrollo      | Factores dentarios que modifican o predisponen a enfermedades gingivales o periodontales |
|      |   | Deformidades mucogingivales alrededor de los dientes                                     |
|      |   | Deformidades mucogingivales en brechas edéntulas   |
|      |   | Trauma oclusal   |

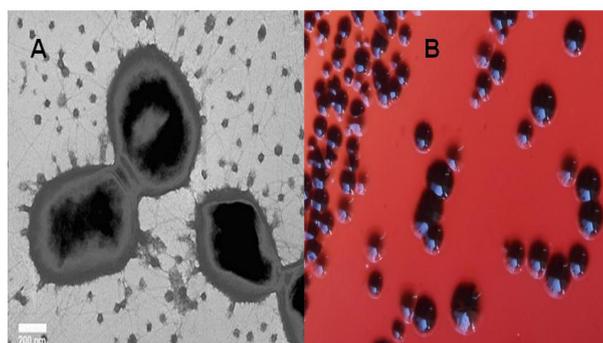
Fuente: C. Armitage Gary et al. Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. Ann Periodontol .1999.

### **3.4.1 *Porphyromonas gingivalis***

*Porphyromonas gingivalis* se ha descrito como uno de los agentes etiológicos principales en la patogénesis y la progresión en los eventos inflamatorios en la enfermedad periodontal. Esta bacteria ha sido encontrada en el 85.75 % de muestras periodontopáticas provenientes de la placa subgingival de pacientes con periodontitis crónica <sup>23</sup>.

### 3.4.2 Características Bacterianas y Factores de Virulencia

*Porphyromonas gingivalis*, clasificada anteriormente como *Bacteroides gingivalis*, es un bacilo corto Gram-negativo anaerobio estricto, que se encuentra en la biopelícula subgingival como un colonizador tardío. No posee motilidad y se caracteriza por ser asacarolítica (su metabolismo se basa en la fermentación de aminoácidos). Puede formar colonias pigmentadas de color negro en placas de agar sangre suplementadas con hemina (nombre farmacológico para el grupo hemo), dado que para su crecimiento requiere de Hierro (Figura 5)<sup>23</sup>.



**Figura 5.** Características microbiológicas de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277

**A** Micrografía electrónica de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. La micrografía electrónica muestra las vesículas, cápsulas y fimbrias de *P. gingivalis* ATCC 33277. **B** Pigmentación de colonias de *P. gingivalis* en agar sangre. Muestra el crecimiento macroscópico de las colonias de *P. gingivalis* cultivadas en condiciones anaeróbicas durante 7 días.

**A** Recuperado de Chen Tsute. Electron micrograph shows the budding vesicles and fimbriae of the strain ATCC 33277. *Porphyromonas gingivalis* Genome Project .2002.

**B** Recuperado de Nakayama K. *Porphyromonas gingivalis* and related bacteria: from colonial pigmentation to the type IX secretion system and gliding motility. J Periodont Res. 2014.

El principal hábitat de *P. gingivalis* es el surco subgingival de la cavidad oral humana, en donde se desempeña como colonizador tardío. Esta bacteria se caracteriza por asociarse con *T. denticola* y *T. forsythia* para formar el complejo rojo de Socransky<sup>23</sup>.

Se ha demostrado que la proporción de *P. gingivalis* en la biopelícula subgingival aumenta sustancialmente en los sitios con periodontitis en comparación de los sitios sanos. Igualmente esta bacteria, de manera solitaria o en conjunto con otros microorganismos presentes en la placa subgingival, favorece la destrucción progresiva de los tejidos periodontales. Para que este proceso se lleve a cabo es necesaria la liberación de factores de virulencia y la evasión de la respuesta inmune del hospedero.

En un huésped susceptible, los factores de virulencia pueden provocar la destrucción rápida y significativa del tejido periodontal, resorción del hueso alveolar e inducción de la respuesta inmune del hospedero. Esto último desemboca en la producción de mediadores de inflamación<sup>23,24</sup>.

*P. gingivalis* expresa diversos factores de virulencia y adherencia requeridos para la colonización inicial, retención y crecimiento en las bolsas periodontales. Las fimbrias, la cápsula y las proteasas desempeñan un papel primario en la infección. A pesar de ello, este microorganismo cuenta con otra clase de factores de virulencia como: Proteínas de membrana externa y endotoxinas, por ejemplo, el Lipopolisacárido (LPS). Estos factores de virulencia le permiten a este periodontopatógeno interactuar y unirse a bacterias presentes en cavidad oral, células del hospedero y componentes de la saliva<sup>23,24</sup>. Los factores de virulencia más importantes de *P. gingivalis* se describen a continuación.

#### **Cápsula bacteriana:**

Es una cubierta de grosor variable presente en la capa externa de algunas bacterias, está formada habitualmente por unidades de polisacáridos, proteínas o ambos. Las cepas de *P. gingivalis* pueden o no tener cápsula, sin embargo, diversos estudios apuntan que la cápsula incrementa la virulencia de la cepa<sup>23</sup>. Esto debido a que la cápsula participa en procesos de evasión de la respuesta inmune como: la resistencia a la fagocitosis, reducción en la respuesta de las defensinas, disminución en la producción de leucocitos y de citocinas (IL-1, IL-6 e IL-8). Asimismo, esta estructura puede fungir como factor principal en la adhesión de la bacteria en las bolsas periodontales del tejido gingival e influye en los niveles de co-agregación con otros periodontopatógenos<sup>23,24</sup>.

#### **Fimbria:**

Son estructuras filamentosas que se extienden fuera de la superficie celular. Están compuestas de proteínas que median la adhesión de sustratos orales, proteínas de matriz extracelular, epitelios orales y bacterias comensales (*Streptococcus* y *Actinomyces*). *P. gingivalis* cuenta con dos fimbrias, que difieren en cuanto a composición de aminoácidos y antigenicidad, Fim-A (fimbria principal) y fimbria Mfa (fimbria menor) codificadas por los genes fimA y mfa, respectivamente. Además de fenómenos de adhesión, las fimbrias de esta bacteria, se encuentran involucradas en

la producción de Interleucinas y citocinas como TNF- $\alpha$ , invasión a osteoblastos, resorción del hueso alveolar y en la progresión de la Aterosclerosis<sup>22</sup>.

### **Proteasas:**

Uno de los factores de virulencia que permiten el desarrollo de *P. gingivalis* en la cavidad oral, es la gran cantidad de enzimas con capacidad hidrolítica, proteolítica, lipolíticas que puede liberar. En general, existen dos familias distintas de las proteasas producidas por *P. gingivalis*. La primera familia está constituida por las proteasas de cisteína, “tipo tripsina”, o “gingipains”; estas enzimas escinden polipéptidos en el extremo C-terminal después de Arginina (R) o Lisina (K). La otra familia corresponde a las proteasas de serina. En conjunto representan el 85% de la actividad proteolítica que ejerce este periodontopatógeno y representa uno de los factores principales en la destrucción del tejido de soporte del diente. Los procesos que median las proteasas están relacionados con la degradación de componentes de matriz extracelular como colágeno e inactivación de los inhibidores de las proteasas. Datos recientes apuntan que las “gingipains” modifican receptores de superficie celular y son factores de crecimiento para *T. forsythia* y *A. actinomycetemcomitans*<sup>23,24</sup>.

### **3.4.3 Lipopolisacárido (LPS)**

El Lipopolisacárido es el principal componente de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, por ello desempeña un papel clave en la interacción huésped-patógeno. Es un glicolípido conformado por una región hidrofóbica que se encuentra unida a una larga cadena de carbohidratos<sup>23</sup>.

Estructuralmente el LPS está conformado en la parte interna por un resto lipídico, mientras que las otras dos porciones presentes en el exterior, corresponden a Oligosacáridos y el antígeno O (Figura 6)<sup>25,26</sup>.

- i. Antígeno O, también denominado cadena-O específica.

Se compone de varias copias de repetición de unidades de oligosacáridos, en contacto directo con el medio externo, que pueden ser lineales o ramificados<sup>25</sup>. El antígeno O tiene un alto grado de variabilidad estructural y presenta un gran número de unidades que se repiten. Además es utilizado para identificar y asignar grupos

serológicos a bacterias como *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Vibrio cholerae*<sup>26,27</sup>.

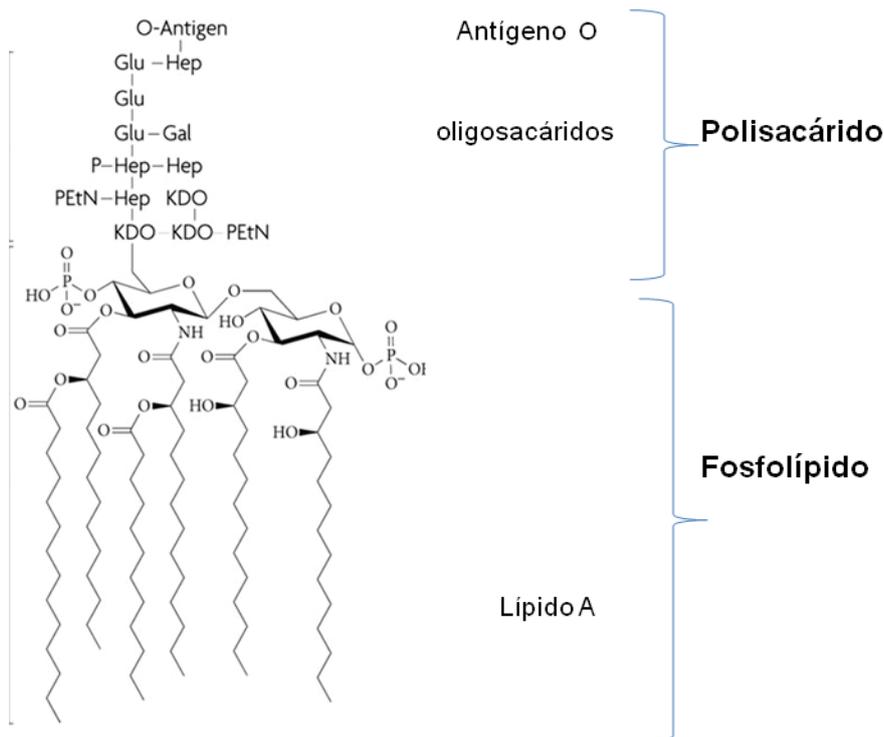
ii. Oligosacárido o núcleo.

Está dividido en núcleo interno y externo. El primero consiste en moléculas de Ácido 3-desoxi-D-manooctulosónico (KDO) y de residuos inusuales de carbohidratos como heptosa. Por otra parte, el núcleo externo (se une directamente con el antígeno O) cambia en la composición y disposición de carbohidratos. En conjunto con el lípido A, mantiene la integridad de la membrana externa<sup>26,27</sup>.

iii. Lípido A.

El lípido A es la región más conservada, biológicamente activa y tóxica del LPS. Está incrustado en cara exterior de la membrana externa de las bacterias y se encuentra unido al resto de la estructura mediante dos residuos de KDO. Se compone de una cadena principal de diglucosamina fosforilada asociado con grupos acilo a través de enlaces éster y/o amida<sup>25,26</sup>. El lípido A puede sufrir alteraciones después de su síntesis, que tienen como objetivo remover o adicionar constituyentes (grupos acilo, fosfato, aminoácidos, entre otros) que le permitan a la molécula adaptarse de manera más efectiva al huésped. Esto provoca que el Lípido A varíe entre especies y con ello que el sistema inmune innato del huésped sea incapaz de reconocer al LPS como endotoxina<sup>25, 26,27</sup>. El lípido A provoca respuestas inflamatorias, ya que participa en la desregulación del sistema inmune innato a través del reconocimiento por parte del complejo receptor tipo Toll (TLR), en concreto de TLR2 y TLR-4 en conjunto con el factor de diferenciación mieloide 2 (TLR4-MD2)<sup>26</sup>.

Es importante mencionar que la eliminación de toda la cadena de oligosacáridos, por hidrólisis ácida, tiene un efecto mínimo sobre la actividad inflamatoria del LPS. Esto demuestra que los hidratos de carbono presentes en el núcleo y el Antígeno O desempeñan un papel menor en el reconocimiento ejercido por los receptores del huésped<sup>25</sup>. Este ligando, desempeña un papel crítico en el mantenimiento de la integridad celular y estructural de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, además de participar en la entrada de moléculas hidrófobas y productos tóxicos.



**Figura 6.** Estructura química del Lipopolisacárido

**KDO**; ácido 3-desoxi-D-manoctulosónico; **Hep**, heptosa; **Glu**, glucosa; **Gal**, galactosa. El LPS está compuesto de Lípido A, núcleo de Oligosacáridos y el Antígeno O. La primera región anclada a la membrana externa bacteriana, lípido A, es una región hidrófoba que consiste en una unión  $\beta$ -(1, 6) ligado a un disacárido de glucosamina unido a 6 grupos acilo. Por otra parte el oligosacárido, se divide en núcleo interno y externo, el primero consta de 1- 4 unidades de KDO (ácido 3-desoxi-D-manoctulosónico) que se asocian con el Lípido A, además contiene carbohidratos tipo heptosa, que pueden ser modificados por grupos fosfatos. En lo que respecta al núcleo externo del Oligosacáridos, está formado por hexosas, como glucosa, galactosa y N-acetilglucosamina. Finalmente el Antígeno O es una unidad de oligosacáridos repetidos.

Adaptada de Ruiz Natividad *et al.* Transport of lipopolysaccharide across the cell envelope: the long road of discovery. *Nature Reviews Microbiology*.2009.

### 3.4.4 Mecanismos de evasión de la Respuesta Inmune

Dentro de los mecanismos de evasión del sistema inmune que ejerce *P. gingivalis*, sobresale su capacidad para degradar defensinas humanas, resistencia al estallido respiratorio y la capacidad de inhibir selectivamente la producción de algunas citocinas pro-inflamatorias como IL-8. Este periodontopatógeno es capaz de suprimir la activación del complemento, al degradar el segmento de C3 y el arresto de la proteína de unión C4. Igualmente, se ha descrito que pueden regular diversas vías de señalización, por ejemplo, las fimbrias de *P. gingivalis* interactúan con el complejo TLR-2, que a través de la vía de la Fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K) inhibe la producción de IL-12, principal citocina involucrada en la eliminación de patógenos<sup>28</sup>.

### **3.5 ENFERMEDAD PERIODONTAL Y SALUD SISTÉMICA**

Durante mucho tiempo se ha reconocido que una infección localizada puede tener efectos sobre tejidos y órganos distantes al sitio de infección original. Esto como parte de procesos inflamatorios iniciados en un sitio primario, que pueden disiparse y causar enfermedades sistémicas o lesiones específicas en un órgano distante. En el caso de la enfermedad Periodontal, generada en la cavidad oral, se presentan a nivel sistémico marcadores biológicos que denotan inflamación, por ejemplo, la proteína C reactiva<sup>29,30</sup>. Existen dos principios por los que las enfermedades periodontales pueden inducir una respuesta inflamatoria a distancia:

#### **Bacteremia transitoria**

Como se había mencionado, la formación y ulceración de bolsas periodontales por la colonización de patógenos periodontales desemboca en procesos inflamatorios. Esto incrementa la producción de citocinas pro-inflamatorias como la Interleucina I beta (IL-1 $\beta$ ), Factor de necrosis tumoral-alpha (TNF- $\alpha$ ), IL-6, entre otros mediadores. Sin el tratamiento adecuado, el resultado es la degradación de tejidos de soporte del diente. Lo que permite la entrada de bacterias orales y productos bacterianos de la biopelícula supragingival y subgingival al torrente sanguíneo durante actividades cotidianas. Entre las más comunes destacan la higiene bucal, la masticación de alimentos y en procedimientos invasivos (la limpieza subgingival o extracciones dentales).

Es importante mencionar que el sistema inmunológico de una persona sana puede hacer frente a la bacteremia transitoria. Sin embargo, si el sistema inmunológico es deficiente, debido a patologías u otros factores, la bacteremia puede dar lugar a infecciones sistémicas<sup>29, 31</sup>.

#### **Respuesta inmune a la presencia de patógenos orales**

Marcadores estándar para la inflamación como el TNF- $\alpha$ , la interleucina-6, la proteína C reactiva y el fibrinógeno, son encontrados a nivel sistémico en respuesta a la enfermedad periodontal. Las afecciones Periodontales son consideradas como factores de riesgo que pueden afectar o agravar el inicio, el desarrollo y la progresión de otras patologías<sup>31,32</sup>.

De acuerdo a la AAP, los padecimientos que tienen evidencia robusta y consistente en relación con las afecciones periodontales son:

- i. Enfermedades cardiovasculares (Aterosclerosis, endocarditis infecciosa).
- ii. Afecciones Pulmonares (algunas formas de Pneumonía).
- iii. Artritis reumatoide.
- iv. Obesidad.
- v. Diabetes (esta condición favorece la aparición de periodontitis).
- vi. Osteoporosis (pérdida en la densidad ósea de la mandíbula).
- vii. Cáncer (oro-faríngeo).

### **3.5.1 Enfermedad periodontal y el riesgo cardiovascular**

Desde 1980 estudios epidemiológicos documentaron la relación que existe entre la periodontitis y las enfermedades cardiovasculares, de tal manera que, actualmente es una de las principales áreas de investigación periodontal.

La enfermedad cardiovascular (ECV) es un grupo de alteraciones que afectan el corazón y los vasos sanguíneos. La cardiopatía coronaria, reumática y congénita, las enfermedades cerebrovasculares, las arteriopatías periféricas, las trombosis venosas profundas y embolias pulmonares, son los ejemplos más representativos <sup>33</sup>. Tanto la enfermedad periodontal como las enfermedades del corazón son de origen multifactorial, de alta prevalencia y comparten varios factores de riesgo.

Generalmente, las enfermedades cardiovasculares son causadas por “factores de riesgo clásicos” como la dislipidemia, la hipertensión, el tabaquismo, el exceso de peso, el sedentarismo y la diabetes <sup>33</sup>. A pesar de la prevalencia de los factores clásicos, hoy día, se atribuyen nuevas causas de riesgo con base en estudios clínicos, epidemiológicos y de laboratorio, los cuales exponen la relación los procesos de inflamación crónica con enfermedades cardiovasculares <sup>33</sup>.

Un ejemplo de ello es la aterosclerosis, padecimiento en el que se deposita una placa de material graso dentro de los vasos sanguíneos y ocasiona un deterioro progresivo y una reducción del flujo sanguíneo. Típicamente la causa más conocida es la hiperlipidemia, sin embargo, se ha demostrado que la bacteremia de origen periodontal provoca la dispersión de citocinas inflamatorias a nivel sistémico.

Una vez en torrente sanguíneo, estas moléculas causan un aumento de la actividad inflamatoria o reactividad cruzada de Anticuerpos dirigidos contra

periodontopatógenos. Estos eventos producen cambios en la fisiología en las arterias, específicamente en las células endoteliales de las mismas. Por consiguiente, se favorece la formación de células espumosas que liberan mediadores inflamatorios que perpetúan y propagan el daño en la lesión y con ello, eventualmente, se desencadena el desarrollo de futuros eventos cardiacos agudos <sup>29,33</sup>.

En lo que respecta a *P. gingivalis*, colonizador tardío de la placa subgingival, se ha encontrado que produce disfunción endotelial de los vasos sanguíneos, invade células de la arteria coronaria y se aloja dentro de las placas ateroscleróticas <sup>29,34</sup>.

### **3.5.2 Periodontitis como causa de la Endocarditis Infecciosa**

#### **Etiología**

El endocardio es una membrana delgada que cubre la superficie interna del corazón. La endocarditis infecciosa o endocarditis bacteriana, se produce como resultado de la inflamación del endocardio. Frecuentemente, la inflamación es causada por bacterias que ingresan al torrente sanguíneo y se establecen en el revestimiento interno de las cámaras y en las válvulas cardiacas. La infección es más común cuando las válvulas cardiacas han sido dañadas previamente <sup>34</sup>. Este padecimiento está relacionado con otras enfermedades cardiacas subyacentes como la insuficiencia cardíaca congestiva.

En casos extremos, la proliferación bacteriana permite la formación de coágulos infectados, que se desprenden y se asientan en otros órganos <sup>34</sup>.

#### **Patogenia**

Los organismos que comúnmente causan la endocarditis, son miembros de la flora normal de la piel, la orofaringe, los sistemas gastrointestinal y del sistema genitourinario. En la gran mayoría de los casos de endocarditis, los agentes etiológicos son *Staphylococcus* (principalmente *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*), *Streptococcus* y *Enterococcus*, incluyendo *Streptococcus mitis* y *Streptococcus sanguinis*, los cuales son típicamente asociados con la placa dental y caries.

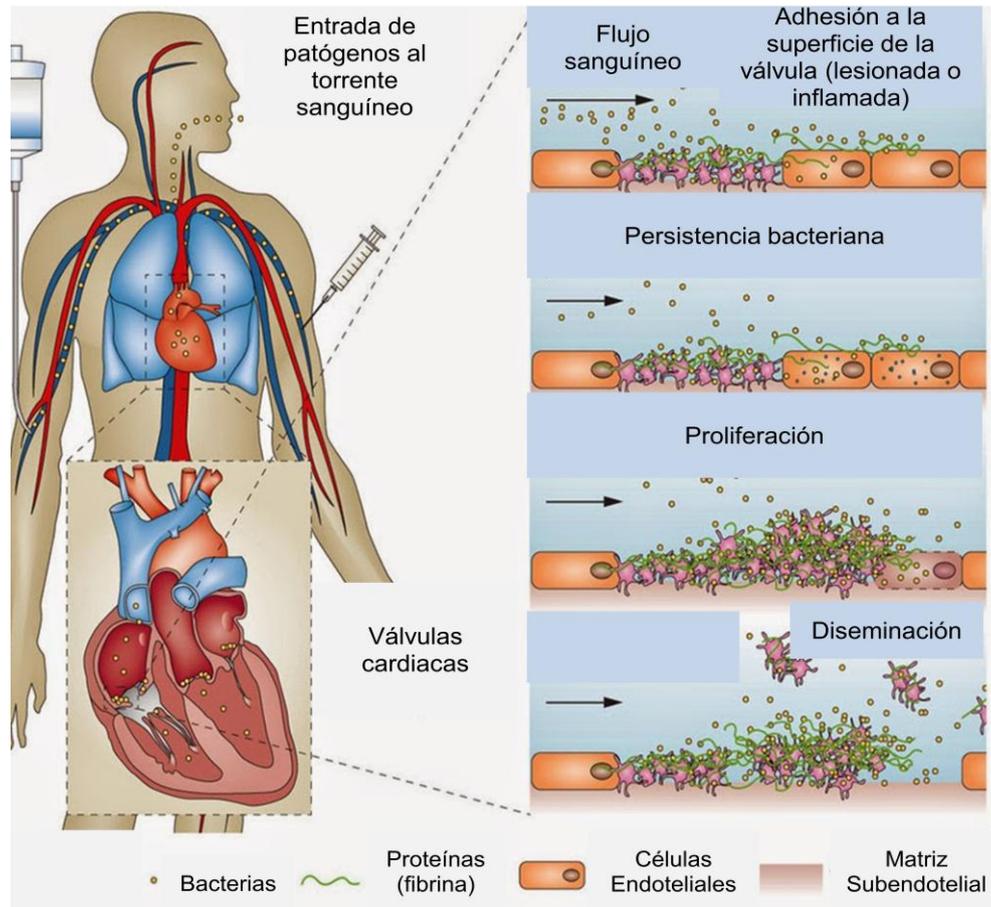
Aunque la etiología principal de la endocarditis es de origen bacteriano, en algunos casos los hongos fungen como agentes etiológicos importantes. En otras ocasiones es imposible identificar el microorganismo responsable de la endocarditis <sup>35,36</sup>.

Para que se establezca una endocarditis infecciosa, los microorganismos presentes en el torrente sanguíneo deben colonizar la superficie de las válvulas cardíacas. Para ello, los patógenos bacterianos pueden implementar estrategias de virulencia que van desde la adhesión bacteriana, formación de biopelículas hasta invasión intracelular <sup>36</sup>. Una vez instalados dentro de la célula huésped, los microorganismos favorecen la liberación de mediadores pro-inflamatorios y moléculas citotóxicas que causan la destrucción del tejido y permiten la entrada de más patógenos. Por otra parte, la localización intracelular brinda refugio contra el sistema inmune del huésped y contra los tratamientos antimicrobianos, hecho que podría explicar las infecciones crónicas y la terapia refractaria <sup>36</sup>.

La bacteremia transitoria no representa un problema si el sistema inmune es capaz de combatirlo. No obstante, si el endotelio cardíaco está dañado, el cuerpo forma capas compuestas de fibrinógeno-fibrina, fibronectina, proteínas de plasma, plaquetas para reparar la lesión. Si durante este proceso quedan atrapados microorganismos presentes en el torrente sanguíneo, se puede originar una endocarditis infecciosa. Los microorganismos adheridos dan lugar a la formación de cúmulos, denominadas vegetaciones, dentro del corazón. A su vez, las bacterias favorecen la activación de células del sistema inmune, en particular monocitos. Como resultado de la estimulación del sistema inmune se producen mediadores de inflamación capaces de provocar ulceración, ruptura y perforación de las cúspides valvulares, y en algunos casos necrosis y destrucción del tejido endotelial (Figura 7) <sup>35,36</sup>.

Las vegetaciones se pueden desprender y desplazar, proceso llamado embolización, al cerebro, riñones, pulmones o abdomen lo que puede ocasionar accidentes cerebrovasculares. Formas de entrada de microorganismos al torrente sanguíneo:

- i. Catéteres venosos centrales.
- ii. Uso de drogas inyectadas, por la utilización de agujas sucias (sin esterilizar).
- iii. Cirugía dental reciente.
- iv. Cirugías o procedimientos menores en las vías respiratorias, las vías urinarias, piel infectada, o huesos y músculos.
- v. Infecciones nosocomiales.
- vi. Hemodiálisis crónica.



**Figura 7.** Proceso de formación de vegetaciones en la Endocarditis Infecciosa.

Entrada de microorganismos al torrente sanguíneo y alojamiento en las válvulas cardíacas. Esto como resultado de cirugías, procedimientos dentales y uso de agujas (catéteres o abuso de drogas). Una vez instalados en las válvulas cardíacas, las bacterias se adhieren en el endotelio cardíaco lesionado o inflamado, el cual tiene restos de fibrina y plaquetas. La adherencia de más patógenos provoca que éstos invadan intracelularmente el endotelio y se genere destrucción del mismo. A mayor número de microorganismos adheridos se favorece la maduración de las vegetaciones cardíacas, para su posterior disgregación y diseminación.

Adaptado de Löffler Bettina et al. Mechanisms of infective endocarditis: pathogen–host interaction and risk states. Nature Review Cardiology. 2013.

## Manifestaciones clínicas

Entre los síntomas asociados a la enfermedad se encuentran: fatiga, escalofríos, fiebre, soplo cardíaco, pérdida de peso, dolores musculares, dolores articulares. Destaca presencia de sangre en orina, inflamación de extremidades inferiores, lesiones de Janeway, (manchas cutáneas rojas e indoloras, localizadas en las palmas de las manos y en las plantas de los pies), ganglios rojos y dolorosos en las yemas de los dedos de la manos y de los pies (llamados nódulos de Osler), anomalías en las uñas<sup>35,37</sup>. En la endocarditis, estos síntomas pueden generarse de un modo lento (sub-agudo) o de modo repentino (agudo).

La confirmación del padecimiento se incrementa en el momento en el que existen antecedentes de una cardiopatía congénita, fiebre reumática o la presencia de algún factor que permita la entrada de microorganismos al torrente sanguíneo <sup>37</sup>.

### **Diagnóstico**

En primera instancia, el médico puede auscultar el pecho para detectar el sonido característico de un nuevo soplo cardíaco. Los soplos cardíacos son causados por el sonido de válvulas cardíacas defectuosas y por ciertos defectos del corazón. Sin embargo, para tener un diagnóstico certero se debe examinar si existe presencia de microorganismos en el torrente sanguíneo. Para ello, las muestras se cultivan en un medio que contenga sangre del paciente (hemocultivo), además de realizarse pruebas de sensibilidad (para identificar el agente patológico principal). Los métodos más fiables para diagnosticar una endocarditis infecciosa, son las técnicas imagenológicas, como los ecocardiogramas.

Las técnicas basadas en imagenología permiten visualizar la estructura y función de las válvulas, el movimiento de la pared del corazón y el tamaño general del corazón. Como métodos adicionales se tienen la Radiografía de tórax, la ecocardiografía transesofágica (ETE), la tomografía computada (TC) y la resonancia magnética (RM), que pueden emplearse para realizar un diagnóstico más completo o averiguar si hay otras complicaciones <sup>37</sup>.

### **Tratamiento**

Los antibióticos son la primera línea de tratamiento para la endocarditis infecciosa. Como resultado de las pruebas de sensibilidad bacteriana, se identifica el agente etiológico principal y con ello se implementa una terapia específica. Si las válvulas cardíacas han sido dañadas por vegetaciones y se sospecha de embolización, es necesario realizarse una intervención quirúrgica para reemplazar la válvula cardíaca <sup>37</sup>.

## **3.6 SISTEMA INMUNOLÓGICO**

Es una red compleja de células, tejidos y órganos que brindan protección al cuerpo contra sustancias, moléculas y organismos nocivos. La inmunidad es conferida por dos sistemas de defensa que cooperan mutuamente. El primero corresponde a la respuesta no específica o inmunidad innata, y el segundo a una respuesta específica o inmunidad adquirida.

La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa del huésped, la cual combate varios tipos de microorganismos. Se caracteriza por actuar de manera instantánea, esto debido, a la extensa gama de mecanismos de defensa que posee. Éstos abarcan en primera instancia, las barreras de físicas, químicas y biológicas, seguidos de efectores enzimáticos y celulares, por último, procesos cuyo fin es eliminar el agente dañino. Por otro lado, la respuesta inmune adaptativa está dirigida en contra de agentes invasores específicos, y es mediada por linfocitos T y B, no obstante tarda días en desarrollarse. Otra propiedad de las células del sistema inmune adaptativo es la capacidad de los linfocitos B de tener memoria contra agentes previamente reconocidos y desarrollar tolerancia a componentes del propio organismo<sup>38</sup>. Es importante destacar que la activación de la inmunidad innata estimula la respuesta inmune adaptativa, de manera que polariza la respuesta adaptativa para hacerla efectiva contra cierta clase de patógenos.

Aunque la respuesta inmune innata y adaptativa tienen diferentes mecanismos de acción, existe una amplia interacción entre ellas con el fin de brindar protección al hospedero.

### **3.6.1 La inflamación**

La inflamación es un mecanismo complejo y coordinado que tiene como finalidad restaurar la integridad y función del tejido, es decir recuperar la homeostasis. Sin embargo, en ausencia de regulación, el proceso de inflamación es perjudicial para el organismo. Este proceso incluye reacciones de naturaleza nerviosa, vascular, humoral y celular en el sitio lesionado. Como factores causales se encuentran factores endógenos (necrosis) y factores exógenos (agentes químicos, físicos y biológicos). Clínicamente se manifiesta como calor, rubor, edema y dolor, estos puntos cardinales del dolor son producto de la liberación de mediadores pro-inflamatorios que causan vasodilatación, aumento de permeabilidad vascular y el movimiento de leucocitos en el sitio afectado<sup>39</sup>.

Diversos mediadores pro-inflamatorios participan en la inflamación. Primordialmente mediadores lipídicos (prostaglandinas, leucotrienos, y factor activador de plaquetas), proteasas del plasma (complemento, quininas, y fibrinógeno), péptidos (sustancia P, péptido vasoactivo intestinal, somatostatina, aminas (histamina y serotonina), y óxido nítrico. También incrementa la secreción de interleucinas-1 (IL-1) , IL-4, IL-6, IL-8, IL-

12 , así como el Factor de necrosis tumoral (TNF), Interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ) y el factor de crecimiento transformante (TGF) <sup>39</sup>. Estos promotores de la inflamación ocasionan el reclutamiento de leucocitos, síntesis de proteínas de fase aguda y la amplificación de la respuesta inflamatoria. Si la fuente de irritación no se elimina correctamente, inflamación aguda puede convertirse en una inflamación crónica <sup>39</sup>.

### 3.6.2 Inmunidad Innata

Representa la primera línea de defensa del cuerpo. Es el mecanismo filogenéticamente más antiguo en contra de patógenos y está presente en todos los organismos multicelulares. Se caracteriza por ser una respuesta rápida e ilimitada a un gran número de estímulos. La inmunidad innata está conformada por barreras de tipo físicas (la piel y el epitelio de la mucosa), químicos (factores dotados de propiedades antibacterianas) y biológicas, además de células especializadas y moléculas solubles. Estas moléculas están presentes en diversos tejidos o células. A diferencia de la inmunidad adaptativa, en la respuesta primaria estas moléculas se encuentran presentes en todos los individuos, independientemente de su contacto previo con inmunógenos. Las principales células implicadas en la inmunidad innata son los leucocitos polimorfonucleares (PMN) (neutrófilos, eosinófilos, basófilos), monocitos, macrófagos, células cebadas, células dendríticas, células asesinas naturales (NKs), células T  $\gamma/\delta$  y células B-1. Estas células son capaces de eliminar los microbios o las toxinas del cuerpo y secretar citocinas, que forman una red funcional, con el fin de permitir la interacción entre las células que median la inmunidad innata y adaptativa. Los principales mecanismos de la inmunidad innata están enfocados en la eliminación de los microorganismos. Tal es el caso del Sistema del Complemento, el cual está basado en la fagocitosis de las bacterias y la liberación de distintos mediadores de la inflamación, que inician la activación de células del sistema inmune. Otros factores incluyen lisinas, aglutininas, péptidos antibacterianos y proteínas de fase aguda <sup>38</sup>.

Aunque la inmunidad innata es incapaz de hacer distinciones estructurales particulares como el sistema inmune adaptativo, está dotado con una considerable especificidad. Esta especificidad se produce debido a una colección de receptores y sus respectivos ligandos, que han evolucionado con el fin de permitir la identificación y respuesta óptima. Los ligandos provienen de las estructuras moleculares

presentes en la superficie de los microorganismos. Destacan estructuras microbianas como el LPS, la flagelina, el peptidoglicano, la manosa y los ácidos teicoicos. Éstos constituyen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), que interactúan con receptores de reconocimiento de patrones (PRRs). Estos receptores desencadenan rutas de señalización que resultan en la activación de genes involucrados en procesos inmunes. Se encuentran presentes principalmente en macrófagos, neutrófilos y células dendríticas (CD) <sup>38</sup>.

### **3.6.3 El Reconocimiento por el Sistema Inmune Innato: PRR**

El sistema inmune innato detecta moléculas dañinas a través de PRRs que reconocen específicamente moléculas conservadas denominadas PAMPs. En la actualidad se han identificado y caracterizado varias clases de PRRs:

- i. Receptores tipo Toll (TLR).
- ii. Dominio de oligomerización de unión de a nucleótidos (NOD).
- iii. Receptores de lectina tipo C (CLR).
- iv. Receptores tipo RIG-I (RLR).
- v. Receptores tipo AIM2 (ALRS).

Destacan también una familia de enzimas que funcionan como sensores intracelulares de ácidos nucleicos. Comúnmente los PRRs se expresan en células del sistema inmune innato, sin embargo, existe evidencia de que estos receptores instruyen la respuesta inmune adaptativa, específicamente determinando el tipo de polarización y el origen de los antígenos expresados sobre células T y células B <sup>40</sup>. Fisiológicamente, los PRR, son altamente conservados y reconocen componentes moleculares de patógenos invasores denominados. El reconocimiento de las estructuras es diverso e incluye polisacáridos complejos, glicolípidos, lipoproteínas, nucleótidos y ácidos nucleótidos. Varias familias de PRRs detectan estas estructuras mediante el uso de dominios de ligando de reconocimiento <sup>40</sup>.

Por lo que respecta a su localización, los PRRs se encuentran en distintos compartimentos celulares que incluyen la membrana plasmática, endosomas, lisosomas y citosol, sin embargo, también se expresan en tejidos. Las diferencias en los patrones de expresión varían en función del reconocimiento por el sistema inmune innato y por la respuesta inmune en general. Éstos se dividen en PRRs de

reconocimiento intrínseco y PRRs de reconocimiento extrínseco. El reconocimiento intrínseco, está mediado por sensores citosólicos que operan en células susceptibles a infección, por ejemplo, sensores acoplados para el reconocimiento de ácidos nucleicos virales. Por otra parte, en el reconocimiento extrínseco, los PRRs se expresan en células especializadas en la detección de patógenos, que no requieren que la célula esté infectada. Profundizando en este aspecto, la detección de patógenos extracelulares está mediada principalmente por TLRs y CLRAs expresados en las membranas plasmáticas de los macrófagos, DC y otros tipos de células.

Es importante destacar que su reconocimiento no depende de la viabilidad, invasividad o la replicación microbiana, lo que sugiere que se pueden detectar un amplio espectro de PAMPs independientemente de su origen <sup>40</sup>.

### **3.6.4 Receptores Tipo Toll**

Desde su identificación en *Drosophila melanogaster* en 1985 por Christiane Nüsslein-Volhard, los receptores tipo Toll (TLRs) son los principales PRRs del sistema inmunitario. A la fecha, la familia de receptores tipo Toll se compone de trece miembros, de los cuales, los TLRs 1 al 9 se encuentran en ratones y humanos, el TLR 10 solo ha sido identificado en humanos, mientras que los TLR 11 al 13 se presentan sólo en ratón. La localización celular de éstos receptores está en función del ligando que reconocen y puede dividirse en dos grupos. En el primero abarca, los TLR 1, 2, 4, 5, 6 y 11. Éstos residen en la membrana plasmática de la célula y reconocen PAMPs expresados en la superficie de los microorganismos como lípidos, lipoproteínas y proteínas. El otro grupo integrado por los TLR 3, 7, 8 y 9, se encuentran en la membrana de las vesículas intracelulares, principalmente retículo endoplásmico y endosomas. Reconocen primordialmente componentes microbianos internos expuestos por mecanismos intracelulares como la endocitosis, por ejemplo, ácidos nucleicos. Los blancos característicos reconocidos por TLRs presentes en el humano<sup>41</sup> (Tabla 2).

Es de notar que, además de los ligandos microbianos exógenos, los TLR también son activados por una serie de moléculas endógenas liberadas como resultado de lesión celular. Estos son denominados patrones moleculares asociados daño (DAMPs). Entre los DAMPs identificados como ligandos para TLRs destacan la matriz

extracelular de ácido hialurónico, la HMGB1 (una proteína nuclear), las proteínas de choque térmico (HSPs) 60 y 70, la LDL oxidada, el fibrinógeno y la fibronectina <sup>41, 42</sup>.

**Tabla 2.** Localización celular, origen y principales ligandos para los TLRs presentes en el ser humano.

| TLRs   | Localización     | Ligandos   | Origen de ligandos   |
|--------|------------------|--|--|
| TLR1/2 | Membrana celular | Lipopeptidos triacilados (Pam <sub>3</sub> CSK <sub>4</sub> )<br>Factores solubles<br>Porina PorB  | Bacterias<br>Micobacterias   |
| TLR2   | Membrana celular | Lipoproteínas/ Lipopeptidos<br>Diacil lipopeptidos ( Pam <sub>2</sub> CSK <sub>4</sub> and MALP2SK <sub>4</sub> ), Peptidoglicano, ácido lipoteicoico, Lipoarabinomananas , glucolípidos, LPS Atípico( P. gingivalis)<br>Zyosan , Hsp70, Hemaglutinina | Bacterias (Gram positivas)<br>Ligandos sintéticos<br>Micobacterias<br>Hongos<br>Virus<br>Hospedero |
| TLR3   | Endosoma         | ARN de cadena doble (dsRNA)  | Virus  |
| TLR4   | Membrana celular | LPS, Mananas, ,Glicosilinositol, Fosfolípidos, Fibrinógeno, Fibronectina ,Proteínas de fusión<br>HSP60 y 70 , Taxol  | Bacterias (Gram negativas)<br>Hospedero<br>Plantas   |
| TLR5   | Membrana celular | Flagelina  | Bacteria   |
| TLR6/2 | Membrana celular | Lipopeptidos diacilados  | Micoplasma   |
| TLR7   | Endosoma         | ARN de cadena sencilla<br>Imidazoquinolines (imiquimod, R-848)   | Virus<br>Compuestos sintéticos   |
| TLR8   | Endosoma         | ARN de cadena sencilla<br>R-848  | Bacterias , Virus ,<br>Compuestos sintéticos   |
| TLR9   | Endosoma         | Sitios CpG no metilados de ADN   | Bacteria , virus ,<br>levaduras , insectos   |
| TLR10  | Membrana celular | Desconocido  | Desconocido  |

Fuente Gay Nicholas J., Structure and function of Toll Receptors and their ligands. Annual Review of Biochemistry. 2007.

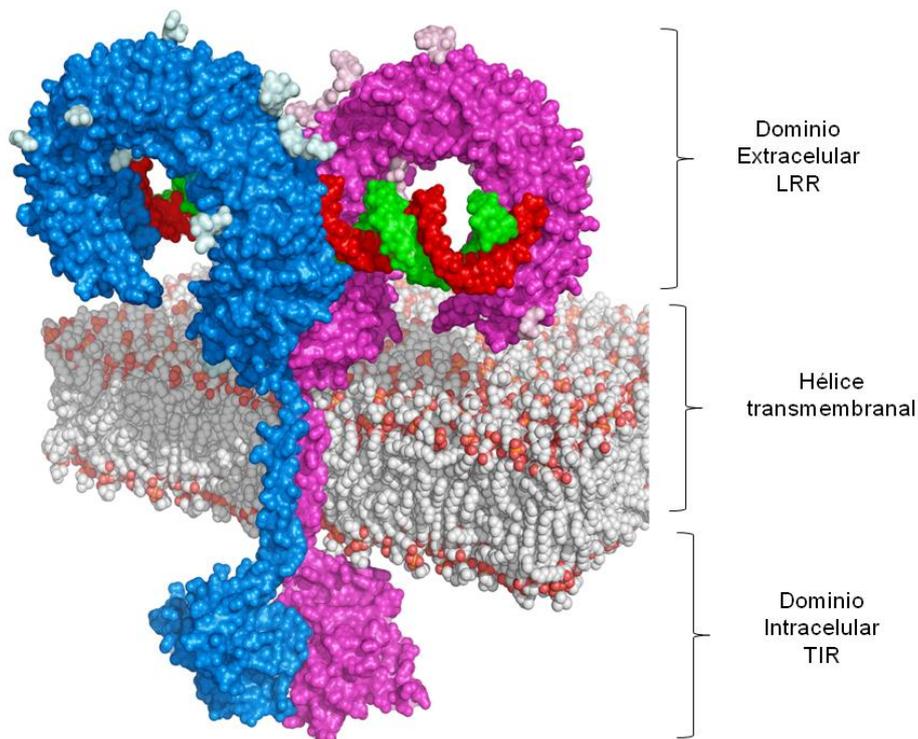
Por otra parte, la presencia de una gran variedad de PAMPs presentes en los microorganismos ocasiona la activación de numerosas moléculas del sistema inmune. Destaca la liberación de moléculas coestimuladoras, la producción de citocinas y quimiocinas, fagocitosis, inflamación y presentación de antígenos. Esto ocasiona la activación de vías de señalización intracelulares.

De esta manera, las principales vías de señalización son: la fosforilación de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) y la translocación del factor de transcripción nuclear-kB (NF-kB) <sup>43,44</sup>.

La respuesta inmunitaria innata mediada por TLR también es crítica para la activación de la inmunidad adaptativa.

### 3.6.5 Estructura de receptores Tipo Toll

Los TLRs son glicoproteínas membranales que poseen región extracelular N-terminal con repeticiones ricas en leucina (LRR) necesarias para el reconocimiento de ligando, seguido de una hélice transmembranal rica en cisteína y por último, un dominio de señalización intracelular C-terminal (Figura 8) <sup>44</sup>.



**Figura 8.** Estructura tridimensional de TLRs.

Modelo estructural del TLR3. En la porción extracelular o LRR, se aprecian los dímeros orientados a extremos opuestos. Seguido de una hélice transmembranal. Y por último el dominio intracelular o TIR, orientado al centro. Adaptado de Botos Istvan *et al.* The Structural Biology of Toll-like Receptors. Structure. 2011

El dominio citoplasmático representa una región conservada del receptor Toll/IL-1R, TIR, denominado así, porque comparte homología con los dominios de la familia IL-1R. La porción intracelular TIR funge como sitio de unión para proteínas adaptadoras de localización citosólica <sup>44</sup>.

En tres dimensiones, los TLRs adoptan una conformación característica en forma de “m”, en el cual, la porción extracelular se forma de dímeros que se despliegan en extremos opuestos, mientras que, los dímeros citosólicos convergen en el centro. Cuando los TLRs se unen a sus respectivos ligandos por medio de los LRR, se induce su dimerización y por ende la dimerización de TIR. Esto inicia una cascada de señalización, resultado del reclutamiento de proteínas adaptadoras intracelulares<sup>45</sup>. La mayoría de los TLRs forman homodímeros, con excepción de TLR2 que forma heterodímeros con el TLR1 y el TLR6.

### **3.6.6 Vías de señalización activadas por TLR**

Después de la detección de algún PAMP por un TLR, la señalización se inicia por el reclutamiento de proteínas adaptadoras en el dominio intracelular TIR. Las proteínas que se pueden unir son el Factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88), la proteína adaptadora con dominio TIR (TIRAP), proteína adaptadora asociada al dominio TIR inductora de interferón- $\beta$  (TRIF) y la molécula adaptadora relacionada con TRIF (TRAM). En función del tipo de TLR que se active se emplearán los diferentes adaptadores. No obstante, la transducción de señales intracelulares, mediado por TLRs, obedece principalmente a dos vías: la dependiente de MyD88, que utiliza la mayoría de los TLR, y la otra, independiente de MyD88 y dependiente de la proteína adaptadora TRIF, exclusiva de TLR3.

Cabe mencionar que el TLR4 recluta a MyD88 y TRIF como sus adaptadores<sup>43,44</sup>. De igual manera, la interleuquina-1 (IL-1) y los receptores de IL-18 contienen dominios TIR y su vía de señalización es dependiente de MyD88 de una manera similar a TLRs<sup>46</sup>.

### **3.6.7 Vía dependiente de MyD88.**

En la vía dependiente de MyD88, la señalización del TLR está mediada por la molécula adaptadora MyD88, que se recluta y se asocia a su dominio TIR, este hecho permite que la proteína adaptadora se una a la cinasa 1 asociada al receptor de IL-1 o IRAK 1, IRAK 2 y IRAK 4. Ésta última fosforila a IRAK 1, lo que permite que ésta se una con la proteína TRAF6 (Factor asociado al receptor de TNF). Posteriormente, ambas moléculas se disocian del receptor e interactúan con TAK1

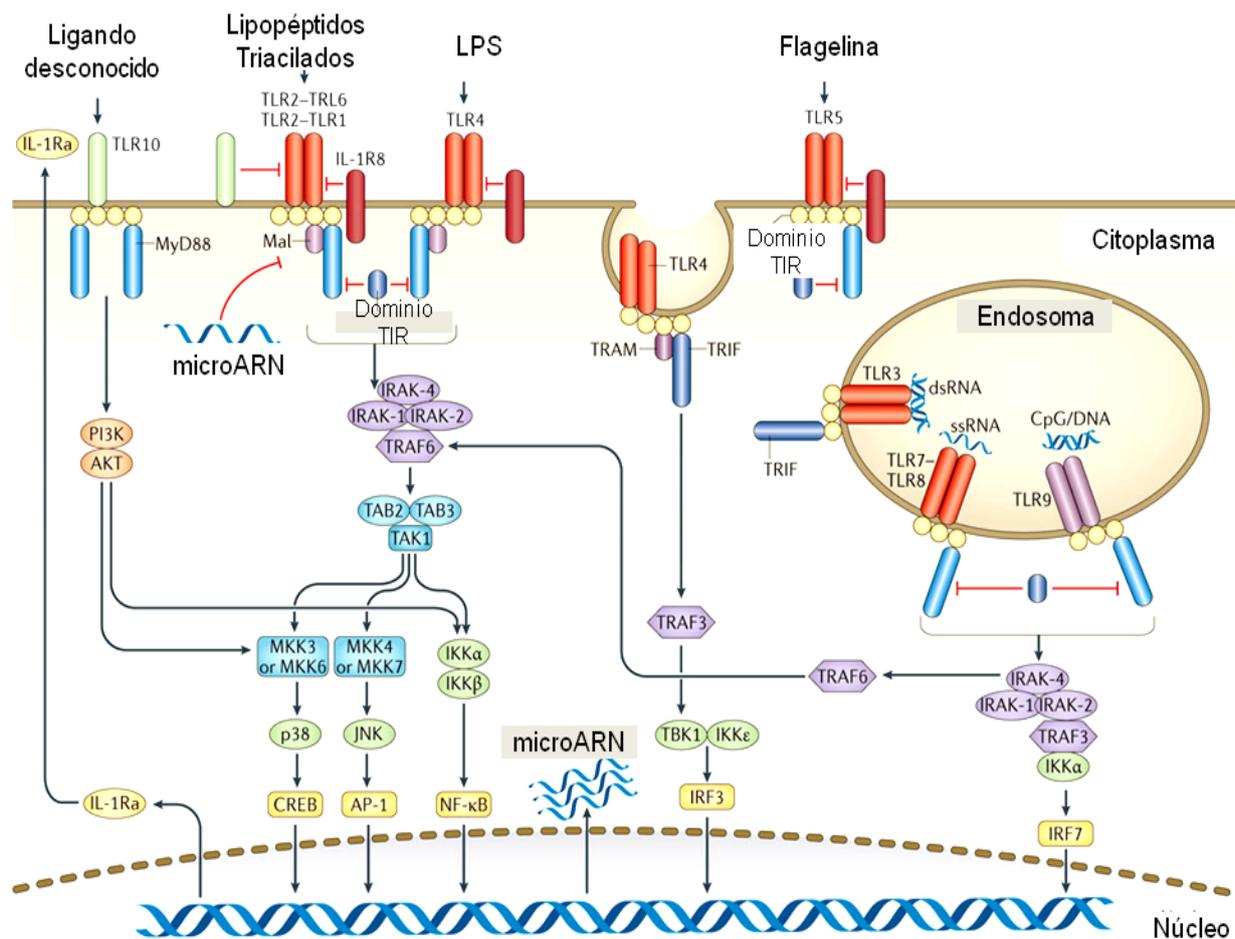
(cinasa activada de TGF) y TAB1 - 2 (proteínas de unión a TAK1). Este último evento permite que existan dos vías de señalización distintas. En la primera vía, TAK puede fosforilar las MAPKs y en consecuencia promover la activación de la proteína activadora 1 (AP-1). Este factor de transcripción contribuye en la producción de citocinas y quimiocinas inflamatorias, así como, en procesos celulares de proliferación y supervivencia <sup>44,47</sup>.

En la otra vía TAK1 es el encargado de fosforilar y activar al complejo IKK, esencialmente formado por las cinasas (IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ ) y la subunidad reguladora NEMO/IKK $\gamma$ .

Una vez activado, el complejo IKK fosforila la fracción inhibitoria de NF $\kappa$ B, conocido como I $\kappa$ B, lo que resulta en su poliubiquitinación y posterior degradación proteosomal. La pérdida de la porción I $\kappa$ B libera la subunidades p50 y p65 del factor de transcripción NF $\kappa$ B lo que permite se transloque al núcleo y se una a la región promotora de los genes de respuesta inflamatoria (Figura 9) <sup>43,44</sup>.

### **3.6.8 Vía independiente de MyD88.**

También llamada vía dependiente de TRIF, es empleada únicamente por TLR3 y TLR4, aunque éste último también necesita la vía dependiente de MyD88. La proteína acopladora TRIF recluta al complejo proteico TRAF6, que al igual que la vía dependiente de MyD88, activa a IKKs lo que permite la liberación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Por medio de otra ruta, la molécula TRIF ocasiona la translocación del factor nuclear IRF- 3 (Factor regulador de IFN-3), provocando la síntesis de interferón de tipo I (IFN $\alpha/\beta$ ) (Figura 9) <sup>47</sup>.



**Figura 9.** Localización y las vías de señalización activadas por los receptores tipo Toll (TLRs).

Los TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 y TLR6 se localizan en la superficie celular, mientras que los TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 son intracelulares. La vía de señalización de TLR se activa por la dimerización de su respectivo ligando en el dominio extracelular o LRR, seguido de la unión de moléculas adaptadoras en el dominio intracelular o TIR. MyD88 es la proteína adaptadora para todos los TLRs, con excepción de TLR 3. Por otro lado TRIF es empleada por TLR4 y TLR3. La unión de las proteínas adaptadoras causa la transcripción de factores de transcripción como NF-kappa B, CREB y AP-1 a sus regiones promotoras y con ello la transcripción de citocinas inflamatorias. La activación de TLRs endosmales conduce a la producción de los interferones de tipo I.

Adaptado de Joosten, L. A. B. *et al.* Toll-like receptors and chronic inflammation in rheumatic diseases: new developments. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2016.

### 3.6.9 MAPK (Proteína Cinasas Activadas por Mitógenos)

Las MAPK constituyen una familia de serín/treonín cinasas activadas por factores de crecimiento y estrés. Señales derivadas de la superficie celular, el estado metabólico y el microambiente celular, son estímulos capaces de regular diversos procesos celulares. Como ejemplo se tienen los procesos implicados en la homeostasis del organismo, la embriogénesis, la proliferación, la diferenciación y la apoptosis. En los mamíferos, se han identificado más de una docena de genes relacionados con las

proteínas de MAPK. Las más conocidas son: la cinasa regulada por señales extracelulares 1 y 2 (ERK1 / 2), la cinasa c-Jun N-terminal (JNK (1-3)) y la MAPK p38 (alfa, beta, gamma y delta) <sup>48</sup>. Las cinasas ERK, JNK y p38, son en su mayoría, responsables de la fosforilación de sus propios blancos, esto incluye distintas proteínas cascada arriba, así como, la activación de otras cascada abajo <sup>46</sup>.

Con respecto a la señalización celular, la cascada de MAPK está integrada por tres elementos consecutivos de acuerdo a su activación por reacciones de fosforilación, el primero es MAPK cinasa cinasa (MAPKKK o MEKK), seguido de MAPK cinasa (MAPKK o MEK) y por ultimo MAPK. La cascada comienza cuando una señal extracelular es captada por un receptor membranal. A través de componentes intermediarios, como la cinasa de proteína C (PKC) o proteínas de unión a GTP (familia Ras/Rho), que regulan la activación (mediante fosforilación) de MAPKKK. Las MAPKKK activadas fosforilan corriente abajo los residuos serin/treonin catalíticos de las MAPKK, lo que determina su estado activo y la subsecuente activación de MAPK. Esto por medio de la fosforilación dual en residuos de treonina y tirosina (motivo Thr-X-Tyr, donde x representa cualquier aminoácido).

Una vez activada MAPK puede fosforilar directamente proteínas (que contengan residuos de serina/treonina-prolina), ya que, puede trasladarse al núcleo en donde activa factores de transcripción o proteínas ubicadas en el citoplasma. Cabe destacar que, la fidelidad en la transmisión de la señal es determinada por la correcta activación de proteínas adaptadoras específicas, la compartimentalización celular de moléculas implicadas en la ruta, así como, la activación de fosfatasas (tipo Ser/Thr, Tyr o de doble especificidad) que silencian la ruta <sup>49</sup>.

En la vía de señalización dependiente de MyD88, para que se presente la activación de la vía de MAPK es necesaria la activación de MAPKKK; por ello TAK1 actúa como MAPKKK (específicamente para las cinasas p38 y JNK) que directamente activa MAPKK. De acuerdo a la cinasa que se desee activar se fosforilan las MAPKK, de tal manera que, para la cinasa p38 se fosforilan las MAPKK MKK3 y MKK6, mientras que, para la cinasa JNK son activadas las MKK4 y MKK7 <sup>46,49</sup>.

A través de IKK se pueden controlar dos procesos, el primero regido por la fosforilación y degradación de la subunidad p105 de NFκB (subunidad de IκB) y la consecuente translocación al núcleo del factor de transcripción. En el segundo caso,

la fosforilación de p105 por el complejo IKK, permite a TLR2 (un tipo de MAPKKK para ERK) fosforilar a MKK1 y MKK2, que a su vez activan a la vía de ERK <sup>43,49</sup>.

### **3.6.10 TLR 2**

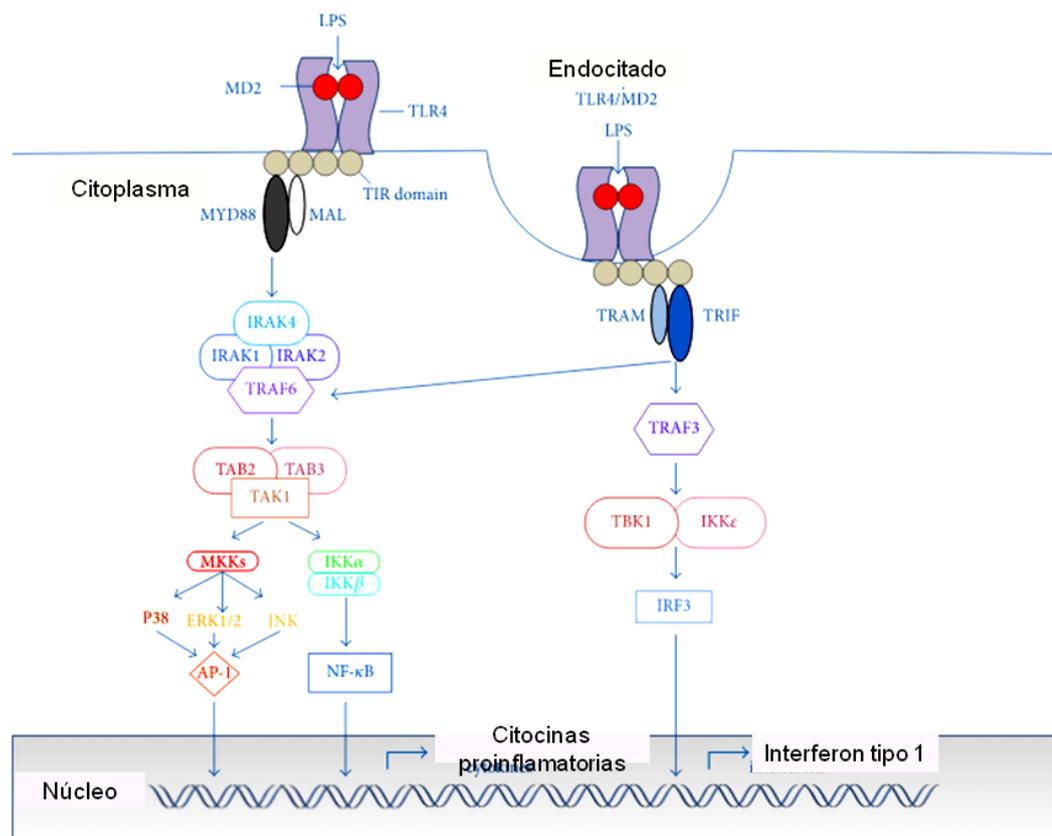
TLR2 reside en la membrana celular donde está implicado en el reconocimiento de una amplia gama de PAMPs derivados de bacterias, hongos, parásitos y virus. De manera clásica, se ha asociado este PRR con la detección de componentes de pared celular de bacterias gram positivas como el ácido lipoteicoico y el peptidoglicano (PGN). No obstante, el TLR2 es capaz de reconocer lipoproteínas de bacterias Gram-negativas. Es el único TLR que forma heterodímeros con el TLR1 y TLR6 para detectar y responder a estructuras de lipopeptidos tri-acilados. Además de la discriminación entre las lipoproteínas, TLR2 tiene la capacidad de actuar junto con el co-receptor (CD36), con el fin de mediar la detección de los agonistas de TLR2 que inducen internalización <sup>50</sup>. A pesar de que TLR2 se expresa en superficie celular, y sigue una señalización dependiente de MyD88, en algunos casos, se puede activar a NFκB a través de la internalización de sus componentes. Por ello, es primordial la acción conjunta del TLR2, su co-receptor CD36 y los TLR1 y 6.

### **3.6.11 TLR 4**

La asociación de los TLRs con la inmunidad innata fue reconocida con el descubrimiento del TLR4 de ratón en 1997. La primera función que se describe para el TLR4 es el reconocimiento del Lipopolisacárido (Lípido A, región biológicamente activa del ligando) <sup>44,51</sup>. No obstante, se ha demostrado que el TLR4 también está involucrado en el reconocimiento de moléculas endógenas (DAMPs) liberados por tejidos lesionados y células necróticas. El TLR4 se expresa en la superficie células endoteliales, hematopoyéticas, cardiomiocitos, entre otras <sup>51</sup>.

Estructuralmente, el TLR4 es un homodímero, que se compone de 608 residuos de aminoácidos en el dominio extracelular LRR y de 187 residuos de aminoácidos en el dominio intracelular TIR. Para la correcta activación de TLR4 a través del LPS, es necesaria la participación de moléculas adaptadoras tanto para el PRR como para el ligando. Una de las moléculas más destacadas es la glicoproteína MD2 que se ancla a los dominios extracelulares del TLR4, para formar el complejo TLR4/MD2, el principal componente de unión a LPS. Para el caso del ligando, se conocen dos

moléculas accesorias. La primera es la proteína de unión a LPS (LBP) y por el cluster de diferenciación 14 (CD14). Ésta última presente en la membrana celular pero carente de un dominio intracelular. Por esta razón, CD14 se asocia con los TLR2 y TLR4 lo que resulta en la formación de los complejos: CD14-TLR2 y CD14-TLR4, respectivamente (Figura 10) <sup>51</sup>.



**Figura 10.** Cascada de señalización para TLR4.

TLR 4 lleva a cabo la transducción de señales a través de dos proteínas adaptadoras. En la primera, se emplea la proteína MyD88. Una vez que se ha unido al dominio TIR del receptor, se recluta y activa la cinasa citoplásmica IRAK1, IRAK2 e IRAK4, después de una serie de fosforilaciones, IRAK 1 recluta a TRAF6, TAK1 y TAB1-2. El complejo activado TRAF6, TAK1 y TAB1-2 fosforila a IκB (inhibidor del factor de transcripción NFκB), lo cual libera a NFκB de su inhibidor para que éste se transloque al núcleo y se una a la región promotora de los genes de respuesta inflamatoria. Además TAK, también activa la vía MAPK que conduce la translocación al núcleo del factor de transcripción AP-1. Para el caso de la vía dependiente de TRIF, se lleva a cabo en el compartimento endosomal, después de la internalización del complejo de TLR4-MD2. A los dominios TIR se unen las proteínas adaptadoras, TRIF y TRAM, que activan a TRAF3, ésta promueve la translocación al núcleo de IRF3, mediada por la TBK e IKKε. El factor de transcripción IRF3 promueve la producción de interferón de tipo I. Adaptado de Molteni Monica *et al.* The Role of Toll-Like Receptor 4 in Infectious and Noninfectious Inflammation. Mediators of Inflammation.2016.

El reconocimiento extracelular del ligando por el TLR comienza cuando el LPS se acompleja con LBP e inmediatamente después CD14 se acopla a TLR4. Por otra parte, el LPS también se une al complejo TLR4/MD2 a través de sus grupos acilo, lo que ocasiona la dimerización del complejo TLR4/MD2 y con ello una serie de cambios

conformacionales del homodímero de TLR4 que provocan la activación de sus dominios intracelulares TIR<sup>51,52</sup>.

El inicio de una cascada de señalización, dependerá del reclutamiento de proteínas adaptadoras citosolicas. Dado que TLR4 usa tanto la vía dependiente de MyD88 como la dependiente de la proteína adaptadora TRIF (independiente de MyD88) se siguen dos mecanismos de transducción diferentes<sup>51</sup>.

### **3.7 FLAVONOIDES**

Los flavonoides son el grupo más ampliamente distribuido de compuestos polifenólicos de origen vegetal. Se encuentran en las plantas, flores, frutos, semillas y vegetales, en donde regulan de factores de crecimiento, pigmentación y protección contra agentes fitopatógenos como hongos o bacterias<sup>53</sup>. Hasta la fecha se han identificado más de 10,000 estructuras diferentes<sup>54</sup>. Recientemente, los polifenoles se han convertido en objeto de investigación debido a su potencial preventivo y de tratamiento en algunas enfermedades.

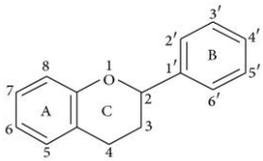
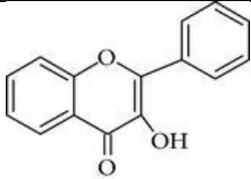
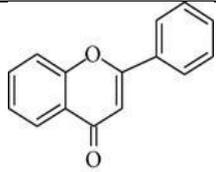
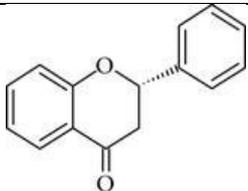
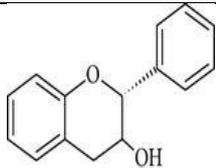
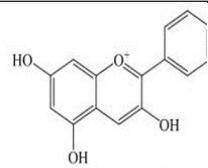
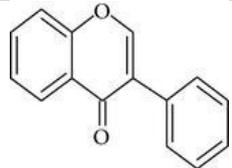
A grandes rasgos, entre las propiedades benéficas para la salud predominan: la actividad antioxidante, anti-inflamatoria, anti-cancerígena, y recientemente, la actividad antimicrobiana<sup>53</sup>.

#### **3.7.1 Estructura química y clasificación**

Químicamente los flavonoides poseen un esqueleto de quince de átomos de carbono, que en conjunto forman dos anillos aromáticos de benceno (A y B), ligados por un puente de tres carbonos a un anillo pirano (C). Por tanto, la estructura base de los flavonoides constituye la relación C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, también denominado como difenilpirano<sup>53</sup>. Las diversas clases de flavonoides se distinguen por el nivel de oxidación y el patrón de sustitución del anillo C; mientras que los compuestos individuales dentro de una clasificación difieren en el patrón de sustitución de los anillos A y B. Por tanto, con base en la variación del anillo central de pirano se clasifican en: flavonol, flavonas, flavononas, flavo3-les, antocianidinas e isoflavonoas<sup>55</sup>. En la Tabla 3, se muestran los principales grupos de flavonoides, la estructura química, los principales representantes de cada grupo y la fuente alimenticia de obtención. En la naturaleza, los flavonoides se encuentran glicosilados, en forma de agliconas, o metilados, estos

cambios contribuyen en la estabilidad, la solubilidad, la biodisponibilidad y la bioactividad del compuesto.

**Tabla 3.** Clasificación de Flavonoides, estructura y fuente alimenticia.

| Estructura base   |   |  |   |
|---|---|--|---|
|  |   |  |   |
| Clasificación   | Estructura  | Ejemplos   | Fuente alimenticia  |
| Flavonol  |    | Quercetina<br>Kaempferol<br>Miricetina<br>Tamarixetina<br>Galagina | Cebolla , vino tinto ,<br>aceite de oliva ,<br>bayas y uvas                 |
| Flavonas  |   | Apigenina<br>Luteolina<br>Glucósidos de Luteolina<br>Rutina        | Cascara de frutas ,<br>vino tinto , pimiento<br>rojo y cascara de<br>tomate |
| Flavononas  |  | Naringina<br>Naringenina<br>Taxifolina<br>Hesperina                | Citricos (naranja ,<br>limón) , uvas  |
| Flavo3-les  |  | (+)-Catequina<br>(-)-Epicatequina<br>Epigallocatequina             | Te  |
| Antocianinas  |  | Apigenina<br>Cianidina   | Cereza , frambuesa y<br>fresas  |
| Isoflavononas   |  | Genisteina<br>Daidzenina   | Haba de soja  |

Fuente: Kumar Shashank et al. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. The ScientificWorld Journal.2013.

### 3.7.2 Propiedades biológicas

Evidencia epidemiológica considerable indica que una dieta abundante en flavonoides disminuye el desarrollo y progresión de enfermedades crónicas como Diabetes tipo II, enfermedades neurodegenerativas, afecciones cardiacas y el cáncer. Entre las múltiples propiedades que poseen estos polifenoles destacan:

#### **Actividad antioxidante**

Una de las características más estudiadas de estos compuestos reside en su capacidad antioxidante, fundamentalmente al suprimir el estrés oxidativo, retrasar el proceso de oxidación y al elevar las defensas antioxidantes. Se conoce que los sustituyentes OH, participan en la quelación de iones metálicos, así como, en la captación de especies reactivas de oxígeno (ROS), especies reactivas de nitrógeno (NOS). Además, participan en la eliminación de las enzimas implicadas en la generación de radicales libres <sup>53, 56,57</sup>.

Sí bien los grupos OH, son los compuestos primordiales en la actividad antioxidante de los flavonoides, la configuración estructural de la molécula también funge un papel primordial. Esto al permitir que la estructura heterocíclica se conjugue con los anillos aromáticos a grupos hidroxilo libres <sup>53</sup>.

#### **Actividad anti-inflamatoria**

Como ya se mencionó la inflamación es un proceso biológico en respuesta a cualquier agente que perturbe la homeostasis del organismo. Cuando la inflamación se torna exacerbada, resulta en una lesión crónica que causa varios desordenes en el huésped. Con respecto a esto, los flavonoides son capaces de mitigar la respuesta inflamatoria, al regular la activación en la transducción de señales y los procesos de inmunidad innata. Uno de los mecanismos documentados por el cual los polifenoles ejercen su actividad anti-inflamatoria es a través su unión competitiva al sitio catalítico de las enzimas dependientes del trifosfato de adenosina (ATP). De igual manera, gran parte del efecto anti-inflamatorio de los polifenoles está relacionado con la inhibición de la expresión de las enzimas iNOS, COX2; al igual que mediadores inflamatorios como citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión celular <sup>53</sup>.

### **Actividad anti-cancerígena.**

El consumo de ciertos alimentos favorece o disminuye la posibilidad de aparición y progresión de ciertos tipos de cánceres. Actualmente, algunas frutas y vegetales han sido estudiados por su rol preventivo en la carcinogénesis. En este aspecto se conoce que los flavonoides actúan en la regulación de las mutaciones de la proteína p53, arresto del ciclo celular, inhibición de proteínas de estrés (Hsp) y de tirosin cinasas, modificaciones en la unión del estrógeno a su receptor, e incluso en la inhibición de la expresión de proteínas de Ras<sup>53</sup>.

### **Actividad antibacteriana.**

En las plantas, los flavonoides, son sintetizados en respuesta a fitopatógenos, por tanto, se reconoce su amplio el espectro antimicrobiano. Estos compuestos forman complejos con las proteínas bacterianas a través de enlaces covalentes y de hidrogeno. Su modo de acción está relacionado con su capacidad para inactivar adhesinas microbianas, inhibir enzimas y perturbar la fluidez de las membranas celulares<sup>53</sup>.

### **3.7.3 Síntesis, Absorción y Metabolismo.**

En las plantas la síntesis de flavonoides se lleva a cabo en la cara citosòlica del retículo endoplásmico por acción de complejos enzimáticos. La estructura base se forma de tres moléculas de malonil-CoA y una molécula de fenilpropanoil-CoA. Las enzimas características implicadas en la ruta de biosíntesis son L-fenilalanina y L-tirosina, estos aminoácidos se condensan con unidades de acetato para dar lugar a los ácidos cinámico y parahidroxicinámico respectivamente, por último, estos componentes se condensan con acetatos para dar origen a la estructura base de los flavonoides<sup>56,58</sup>.

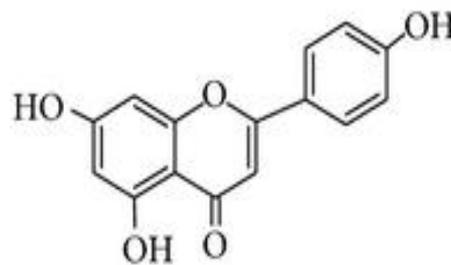
La absorción de los flavonoides en el cuerpo humano depende de las propiedades fisicoquímicas como el tamaño molecular, estructura, lipofilia, solubilidad y el pka. La mayoría de los flavonoides, a excepción de las catequinas, están presentes en plantas y alimentos en forma de  $\beta$ -glucósidos.

Una vez que son absorbidos, los flavonoides pueden sufrir hidrólisis predominantemente en el lumen intestinal por acción de la lactasa phloridzina hidrolasa (LPH) ubicada en la membrana de los enterocitos y por la enzima  $\beta$ -

glucocidasa citosólica no específica (CBG) presente en el citosol de los enterocitos. Por otra parte, los glicósidos que no son sustratos para estas enzimas, son transportados hacia el colon, donde son hidrolizados (transformados en agliconas) por la microbiota. Después de la absorción, los flavonoides son metabolizados en el hígado por una serie de reacciones de fase I y posteriormente de fase II. Por último, se excretan primordialmente en orina o heces fecales<sup>56</sup>.

### 3.8 APIGENINA

Apigenina es un flavonoide que se utiliza la medicina tradicional por su actividad farmacológica. Dentro de la clasificación antes mencionada Apigenina es una flavona cuyo nombre químico es 4', 5, 7-trihidroxi-flavona, con la fórmula  $C_{15}H_{10}O_5$  (Figura 11).



**Figura 11.** Estructura química de la Apigenina.

Apigenina pertenece al grupo de las flavonas. Cuenta con tres anillos en su esqueleto, además en su estructura presenta un grupo carbonilo y un doble enlace conjugado en el anillo C. Por otra parte, posee grupos hidroxilo (OH), en la posición 7,5 del anillo A y otro en anillo B posición 4'.

Recuperado de Kumar Shashank *et al.* Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. The ScientificWorld Journal.2013

#### 3.8.1 Localización

El consumo de Apigenina se produce de manera importante a través del consumo de manzanilla, no obstante, es aislada principalmente en los brotes y flores de *Hypericum perforatum*. Las principales fuentes de este flavonoide incluyen gran variedad de frutas y verduras, como las naranjas, pomelo, el apio, el perejil y la cebolla. En la naturaleza se encuentran como dímero, biapigenina, además de estar unido a glicósidos<sup>59</sup>.

### 3.8.2 Propiedades Biológicas

Se conoce que Apigenina posee propiedades antioxidantes, anti-inflamatorias y anti-cancerígenas. A continuación se enlistan los mecanismos más relevantes por los cuales ejerce su acción.

#### **Actividad antioxidante**

Promueve la quelación de metales, la captación de radicales libres y estimula la fase II de detoxificación de enzimas en cultivo celular en *in vivo* en modelos tumorales.

#### **Actividad anticarcinogénica**

Recientemente Apigenina se ha destacado como un agente quimiopreventivo a través de varios mecanismos de regulación. Éstos incluyen la inhibición de enzimas que promocionan el crecimiento tumoral, la regulación de proliferación celular mediante las vías MAPK y PI3K-Akt en cáncer de próstata humano. En células epidermales y fibroblastos, Apigenina promueve un arresto celular en las fases G2/M y G0/G1 por la inhibición de la actividad de la cinasa p34 (cdc2) y el incremento de la proteína p53. Además altera la proporción de las proteínas Bax/Bcl-2 a favor de la apoptosis<sup>60</sup>.

#### **Actividad anti-inflamatoria**

Diversos estudios señalan que promueven la supresión de mediadores de la inflamación como la isoenzima COX2 y el óxido nítrico sintasa inducidos por LPS en macrófagos de ratón. Destaca también la supresión de varias vías de señalización del factor de transcripción NF-κB en las células endoteliales de la vena umbilical humana. Además de regular la actividad de PCK y de la MAPK en hepatocitos aislados<sup>59</sup>.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto anti-inflamatorio de apigenina en la fosforilación de las cinasas de la vía MAPK sobre la línea celular H9c2 estimulada con Lipopolisacárido (LPS) de *Porphyromonas gingivalis*.

### **4.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

- I. Analizar el efecto de apigenina y el Lipopolisacárido sobre la viabilidad celular en cardiomiocitos de ratón, a través de un ensayo de MTT.
- II. Determinar el efecto de apigenina en la fosforilación de las cinasas de la vía MAPK (p38, ERK 1/2, JNK) en cardiomiocitos de ratón tratados con Lipopolisacárido, por medio de Western blot.
- III. Determinar el efecto de apigenina en la expresión de COX-2 a nivel de transducción y traducción de la enzima en cardiomiocitos de ratón tratados con Lipopolisacárido, a través de RT-PCR y Western blot respectivamente.

## 5. HIPÓTESIS

Sí el flavonoide apigenina tiene efecto anti-inflamatorio sobre la línea celular H9c2, entonces regulará la activación de vías de señalización intracelular y mediadores involucrados en la respuesta inflamatoria en cardiomiocitos estimulados con LPS de *Porphyromonas gingivalis*.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO:

Línea celular H9c2 derivada de cardiomiocitos de ratón. ATCC (CRL1446).

Tamaño de la muestra: 1, 000,000 células ( $1 \times 10^6$  células).

### 6.2 CRITERIOS CONSIDERADOS:

Criterios de inclusión: Cultivo celular del 70 al 80% de confluencia. Medio Translúcido.

Criterios de exclusión: Cultivo celular al 100 % de confluencia. Medio ácido.

Criterios de eliminación: Medio de cultivo contaminado.

### 6.3 MATERIAL Y EQUIPO:

- Agitador magnético (Thermolyne)
- Balanza (Sartorius)
- Baño (Riossa)
- Baño seco (Bio-dynamics)
- Biofotómetro ( Eppendorf)
- Cajas de cultivo celular de 6 y de 96 pozos (Corning)
- Cajas Falco de  $75\text{cm}^2$  (Corning)
- Cámara de electroforesis horizontal (Life Technologies, GIBCO)
- Cámara de electroforesis vertical (Bio-Rad)
- Cámara de transferencia horizontal (Bio-Rad)
- Campana de Flujo Laminar (The Baker Company)
- Celdas UV-VIS (Eppendorf)
- Centrifuga MICROCL 21R (Thermo Scientific)
- Espectrofotómetro UV/Vis ( Optizen )
- Fuente de poder para la cámara de electroforesis (OWL)
- Fuente de poder para la cámara de transferencia (Bio-Rad)
- Gendarme (Costar)
- Gradillas
- Incubadora (Nuaire)
- Lector de placas (Biotek)
- Microscopio de objetivos invertidos (Olympus CK2)
- Orbit Shaker (LAB-LINE)
- Pipetas de 10,100, 1000  $\mu\text{L}$  (Eppendorf)
- Potenciometro (Science Med)
- Sonicador (Ultrasonic Processor)
- Termociclador N803001 (Perkin Elmer 2400)
- Tubos clínicos estériles (Corning)

- Tubos de microcentrifuga (Eppendorf)
- Vórtex

## **6.4 METODOLOGÍA**

### **6.4.1 Cultivo celular**

La línea celular H9c2 derivada de cardiomiocitos de ratón se obtuvo de ATCC (CRL-1446). Se creció en medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 2 mL de L-glutamina, penicilina (100 U/m L), Estreptomicina (100mg/m L), fungizona (1 mg/m L) y 10 % de suero bovino fetal. Las células se incubaron a 37° C en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>.

### **6.4.2 Tratamiento celular**

Las células H9c2 fueron crecidas en cajas de 6 pozos en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de SBF, hasta obtener una confluencia del 70% al 80%. Posteriormente, las células fueron ayunadas con DMEM al 2% de Suero Bovino Fetal (SBF) durante 24h. Las células se trataron con el flavonoide Apigenina (Sigma) a la concentración indicada en los pies de figura durante 30 min. Finalmente, se adicionó LPS (Invitrogen) a la concentración y tiempos mencionados en los pies de figura.

### **6.4.3 Ensayo de Western blot**

Los cardiomiocitos H9c2 se crecieron en cajas de 6 pozos. Después del tratamiento, el medio se aspiró y las células se desprendieron con un gendarme en buffer de fosfatos salinos (PBS) + 1mM de ortovanadato de sodio. Las células se recuperaron y el homogenizado se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min. Las células se lisaron en 30 µL de buffer de lisis (0.05 M Tris-HCl, pH 7.4 ,0.15 M de NaCl, 1% de Nonidet P-40, 1 mM de PMSF, 50 µg/ mL de Aprotinina ,10 µg/mL de Leupeptina, 4 mM de ortovanadato de sodio, 1 M de fluoruro de sodio y 250 mM de pirofosfato de sodio). Sobre hielo, las muestras se sonicaron por 30 segundos a 30 hertz. La proteína total se cuantificó por el método de Bradford a 595nm. Las muestras de proteína (30 µg) se mezclaron 1:1 con buffer de muestra SDS-PAGE (15% glicerol, 10% SDS, 1% 2-mercaptoetanol 0.1% azul de bromofenol y 0.5 M Tris-HCl, p H 6.8) y se desnaturalizaron en baño seco a 70°C durante 5 min. La separación de proteínas se

realizó en geles SDS-PAGE al 10% a 100 V. Se realizó la electrotransferencia a una membrana de difloruro de polivinilideno (PVDF) a 15 V por 1 h en una cámara de transferencia semi-seca Bio-Rad. Para verificar que se realizó la correcta transferencia de las proteínas, las membranas se tiñeron con Rojo de Ponceau (Sigma). Posteriormente, la membrana se bloqueó con una solución al 5% de leche libre de grasa durante 1 h a temperatura ambiente. Se lavaron 3 veces por 10 min con solución salina Tris (TBS) Tween pH7.8 (NaCl 20 mM, Tris 137 mM). La membrana de PVDF fue incubada durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario de elección en dilución 1:1000, anti-ratón monoclonal fosfo-ERK, (1:1000) o anti-conejo policlonal ERK1/2 (1:1000); anti-ratón monoclonal fosfo-p38 (1:1000) o anti-p38 (1:1000); anti-ratón monoclonal fosfo-JNK (1:1000) o anti-conejo policlonal JNK (1:1000) y anti-COX-2. Se realizaron lavados con 3 veces con TBS-Tween y se incubaron 1 h a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios anti-ratón IgG o anti-conejo IgG conjugados con Peroxidasa en dilución (1:10000). Para la detección de bandas se utilizó el kit de quimio-luminiscencia. La radiografía se obtuvo después de exponer la película por 10 min. Los experimentos se realizaron en 3 ocasiones por separado.

#### **6.4.4 Ensayo de RT-PCR**

El RNA total se aisló de las células H9c2, tratados con Apigenina y LPS, a través el método de Chomczynski y Sacchi, con el uso de Trizol (Invitrogen). Se extrajo el medio de las cajas de 6 pozos, a cada pozo se adicionaron 500 µL de Trizol durante 5 min. El trizol con las células desprendidas se transfirió a tubos Eppendorf, se adicionaron 200 µL de cloroformo, las muestras fueron incubadas por 5 min a Temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugaron a 12,000 rpm durante 15 min a 4°C. Se extrajo la fase acuosa y se colocó en tubos Eppendorf, el RNA se precipitó agregando 200 µL de isopropanol a cada muestra. Las muestras fueron centrifugadas a 12,000 rpm durante 15 min a 4°C. El sobrenadante se decantó, y las pastillas se dejaron secar. El material genético fue re-suspendido en 20 µL de agua tratada con dietilpircarbonato (DEPC). Se cuantificó el RNA mediante espectroscopia a 260nm.

El RNA total (1 µg /ml) se transcribió en forma inversa (RT) utilizando el reactivo One-Step RT-PCR (Invitrogen). La reacción de la polimerasa en cadena (PCR) se realizó utilizando oligonucleótidos COX-2, sentido codificante 5'-TTC AAA TGA GAT TGT

GGG AAA ATT GCT-3' y sentido anti-codificante 5'-AGA TCA TCT CTG CCT GAG TAT CTT-3', con un tamaño de producto 309 pb y 5'- GCC AAA AGG GTC ATC ATCATC TC-3' (sentido anti-codificante) derivado del gen gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GADPH).

Las condiciones de 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 1033 pares de bases para COX-2 y una banda sencilla de 309 pares de bases para GADPH. Los productos de amplificación se caracterizaron por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. El de agarosa se visualizó con un transluminador de UV. Los experimentos se realizaron por triplicado.

#### **6.4.5 Ensayo de MTT**

La viabilidad celular se evaluó por el método de reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Los cardiomiocitos se crecieron en cajas de 96 pozos durante 24h. Se realizó el tratamiento a diferentes dosis de Apigenina por 24, 48 y 72 h. Finalizado el tratamiento, se retiró el medio de los pozos, posteriormente se agregó 50 µL de una solución MTT (5 mg/mL) a cada pozo y se incubó la placa por 4h a 37°C. El medio fue eliminado, y los cristales de formazán fueron solubilizados en 50 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). La placa de 96 pozos se leyó a 540 nm en el Lector de placas (BIOTEK). El experimento se realizó por sextuplicado en tres experimentos independientes.

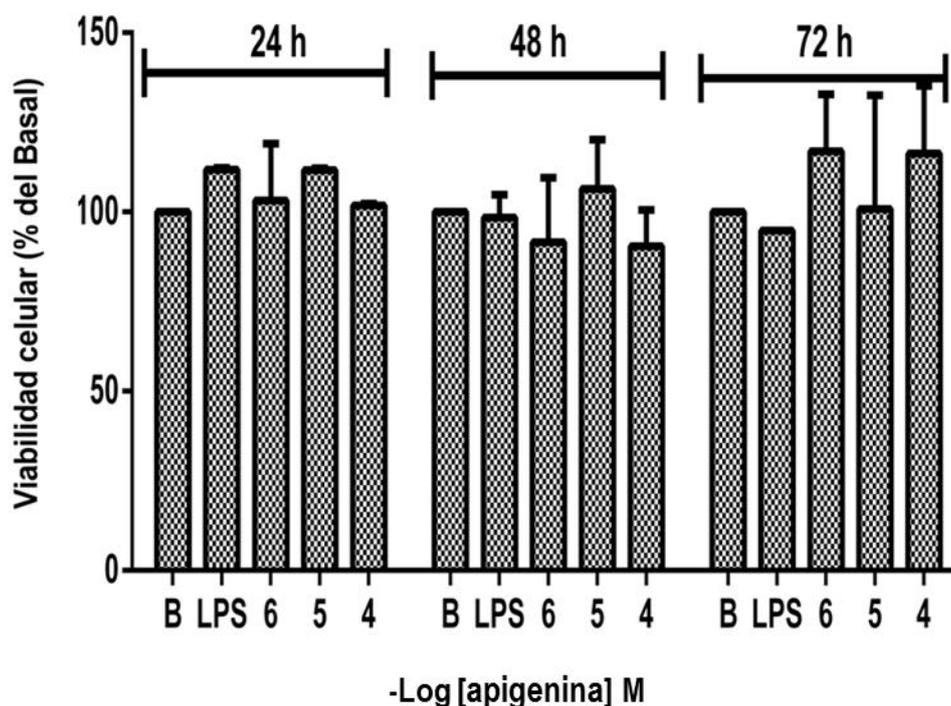
#### **6.4.6 Análisis estadístico.**

Las bandas obtenidas de los ensayos de Western Blot y RT-PCR fueron sometidas a un análisis densitométrico a través del Software Digi it Doc. Posteriormente el análisis estadístico se determinó mediante Anova de una vía con el programa GraphPrism. Un valor a  $p < 0.05$  se consideró como estadísticamente significativo. Los datos se expresaron como la media  $\pm$  E.E. (error estándar).

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Efecto de apigenina en la viabilidad celular de H9c2.

Con el propósito de evaluar si apigenina ejerce efecto citotóxico en la línea celular H9c2, se realizó el ensayo de MTT. Los resultados muestran que en un intervalo de  $-\text{Log}$  de 6 a 4 M, el flavonoide no altera significativamente la viabilidad celular (Figura 12).

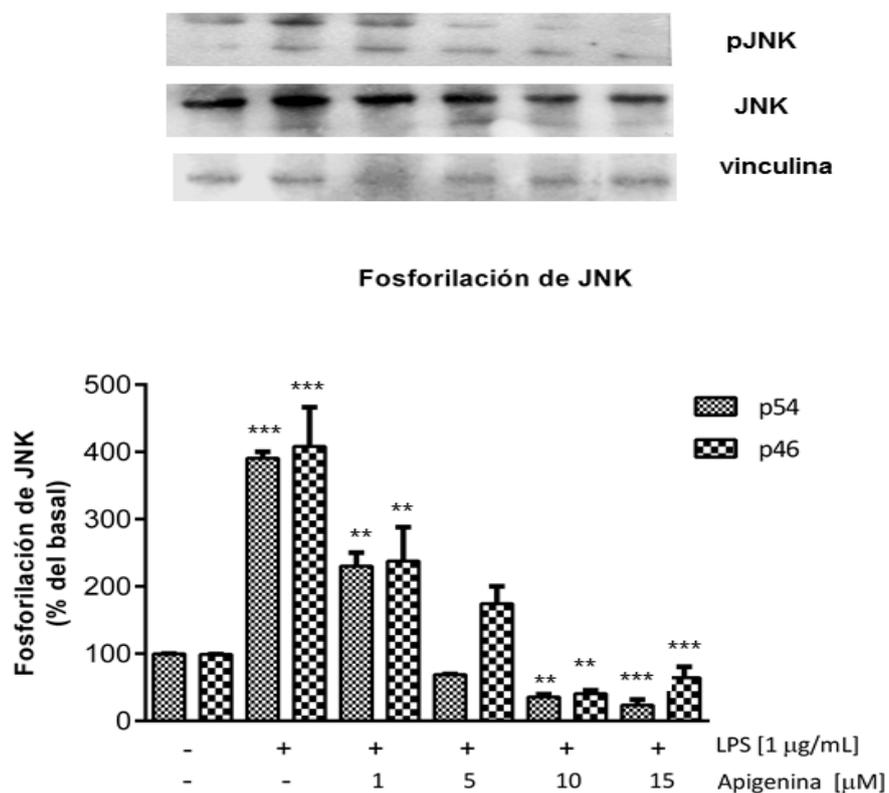


**Figura 12. Efecto de apigenina en la viabilidad celular H9c2.**

Efecto del Lipopolisacárido (LPS) y diferentes concentraciones del flavonoide en células H9c2. La línea celular fue tratada con diferentes concentraciones de apigenina ( $-\text{Log}$  6, 5 y 4 M) o LPS ( $1\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en placas de 96 pozos por 24, 48 y 72 hrs. Las células fueron procesadas para su análisis mediante el ensayo de MTT. Los resultados representan el % de viabilidad de las células comparado con el basal (media  $\pm$  E.E.). Los valores son significativamente diferentes del control si  $*p < 0.05$  mediante Anova de una vía. Los experimentos se realizaron por sextuplicado tres veces.

## 7.2 Efecto de apigenina en la activación de la proteína JNK perteneciente a las MAPKs, inducida por *Porphyromonas gingivalis*.

Con el propósito de evaluar el efecto de apigenina sobre la activación de la proteína JNK perteneciente a la familia MAPKs en células H9c2 tratadas con LPS de *P. gingivalis*, se realizaron ensayos concentración-respuesta del flavonoide. Mediante Western blot, se buscó la forma fosforilada de la proteína de interés. Se muestra que el estímulo con LPS incrementa la fosforilación de JNK casi cuatro veces respecto al basal, y un pre-tratamiento con apigenina inhibe la activación de la cinasa de manera concentración-dependiente, siendo 10  $\mu\text{M}$  la concentración donde se aprecia mayor efecto. La estimulación con LPS presenta diferencia significativa importante comparada con el basal (Figura 13).

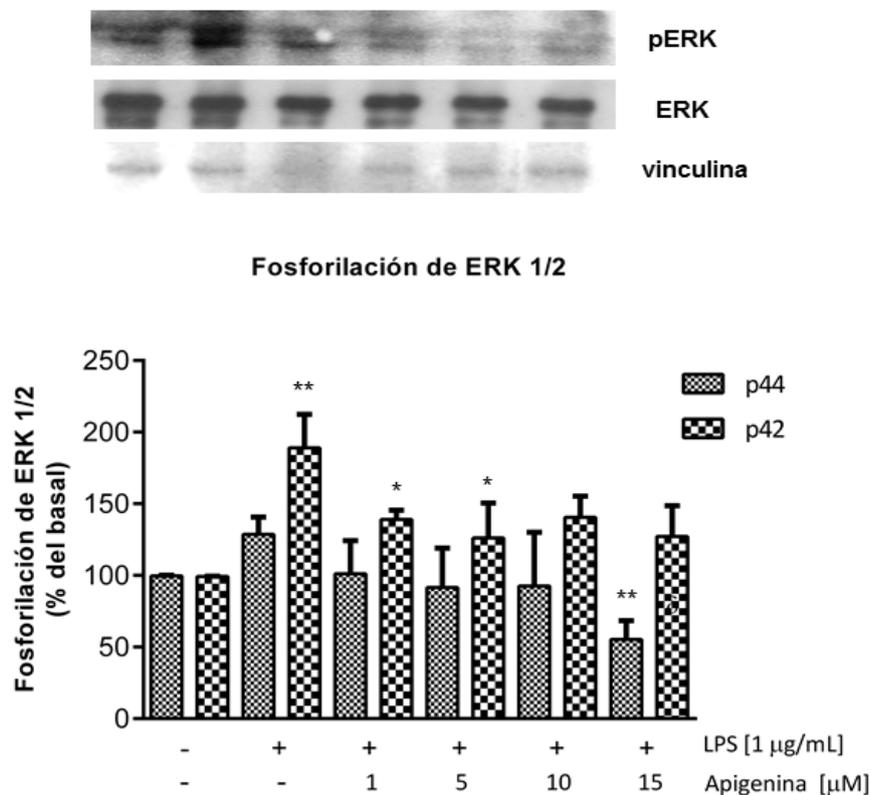


**Figura 13. Efecto de apigenina sobre la acción del LPS en la activación de JNK en células H9c2.**

Las células fueron incubadas con apigenina (1, 5, 10 y 15  $\mu\text{M}$ ) por 30 minutos, seguido por el tratamiento con LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ ) por 30 minutos. Las muestras se procesaron para la técnica de Western blot. Los resultados fueron analizados por densitometría mediante el sistema Lab-Works. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar. Los valores son significativamente diferentes con respecto al basal si presentan  $*p < 0.05$ , mediante Anova de una vía. Los experimentos se realizaron tres veces por separado.

### 7.3 Efecto de apigenina en la activación de la proteína ERK 1/2 perteneciente a las MAPKs, inducida por *Porphyromonas gingivalis*.

Con el propósito de evaluar el efecto de apigenina sobre la activación de las proteína ERK perteneciente a la familia MAPKs en células H9c2 tratadas con LPS de *P. gingivalis*, se realizaron ensayos concentración-respuesta del flavonoide. Mediante Western blot, se buscó la forma fosforilada de la proteína de interés. Se muestra que el estímulo con LPS incrementa la fosforilación de ERK 1/2, y un pre-tratamiento con apigenina inhibe de manera concentración dependiente la activación de la cinasa, siendo 15  $\mu\text{M}$  la dosis (subunidad 44) en la que se observa mejor la disminución en la expresión de la proteína comparada con el estímulo. Las bandas correspondientes al tratamiento con LPS y las concentraciones de apigenina 1  $\mu\text{M}$  y 5  $\mu\text{M}$  de la subunidad 42 presentan diferencia significativa (Figura 14).

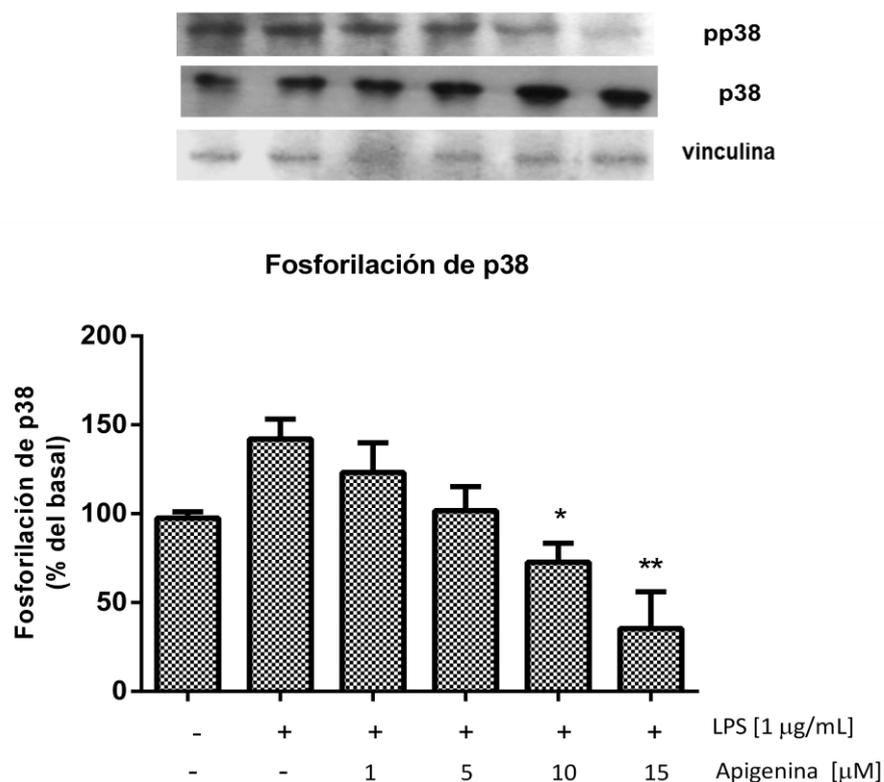


**Figura 14. Efecto de apigenina sobre la acción de LPS en la activación de ERK1/2 en células H9c2.**

Las células fueron incubadas con apigenina (1, 5, 10 y 15  $\mu\text{M}$ ) por 30 minutos, seguido por el tratamiento con LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ ) por 30 minutos. Las muestras se procesaron para la técnica de Western blot. Los resultados se analizaron por densitometría mediante el sistema Lab-Works. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar, los valores son significativamente diferentes con respecto al basal si  $*p < 0.05$ , mediante Anova de una vía. Los experimentos se realizaron tres veces por separado.

#### 7.4 Efecto de apigenina en la activación de la proteína p38 perteneciente a las MAPKs, inducida por *Porphyromonas gingivalis*.

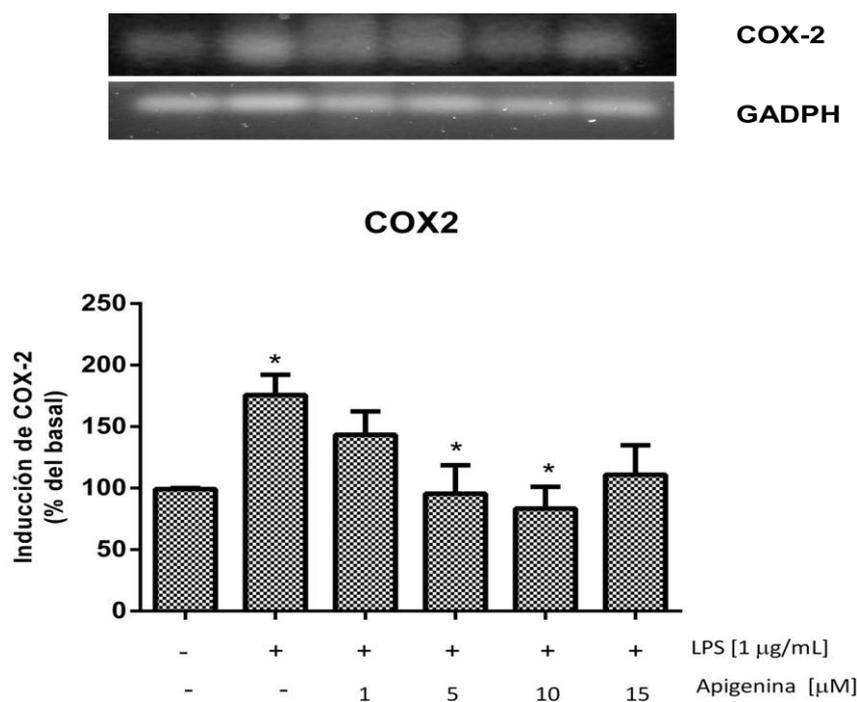
Con el propósito de evaluar el efecto de apigenina sobre la activación de la proteína p38 perteneciente a la familia MAPKs en células H9c2 tratadas con LPS de *P. gingivalis*, se realizaron ensayos concentración-respuesta del flavonoide. Mediante Western blot, se buscó la forma fosforilada de la proteína de interés. El estímulo con LPS incrementa la fosforilación de p38 en un 50% con respecto al basal, y un pre-tratamiento posterior con apigenina disminuye de manera concentración dependiente la activación de la cinasa. A una concentración de 10  $\mu$  M se observa una diferencia significativa con respecto al estímulo. Sin embargo, el mayor efecto se muestra a partir de una concentración de 15  $\mu$  M, en la cual, la fosforilación de la cinasa disminuye una cuarta parte del valor obtenido con respecto al estímulo del PAMP (Figura 15).



**Figura 15. Efecto de apigenina sobre la acción de LPS en la activación de p38 en células H9c2.** Las células fueron incubadas con apigenina (1, 5, 10 y 15  $\mu$ M) por 30 minutos, seguido por el tratamiento con LPS (1  $\mu$ g/mL) por 30 minutos. Las muestras se procesaron para la técnica de Western blot. Los resultados se analizaron por densitometría mediante el sistema Lab-Works. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar, los valores son significativamente diferentes del basal si  $*p < 0.05$ , mediante Anova de una vía. Los experimentos se realizaron tres veces por separado.

## 7.5 Efecto de apigenina en la transcripción y traducción de COX-2 inducido por LPS de *Porphyromonas gingivalis*.

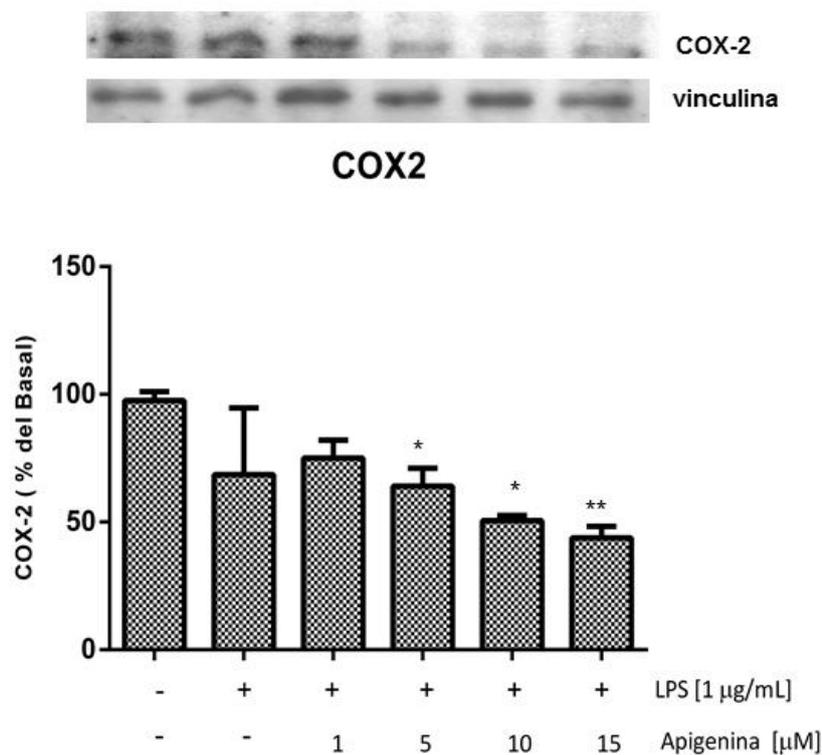
La ciclooxigenasa 2 (COX-2) es la enzima clave en la síntesis de las prostaglandina E2, molécula relacionada con funciones como la inflamación. Por lo tanto, la disminución de la expresión inducible de COX-2 se considera un blanco terapéutico para inflamación. Con el objetivo de determinar qué efecto tiene apigenina en la regulación de COX-2, a nivel de transcripción y traducción, se realizó un ensayo concentración-respuesta medido por dos técnicas diferentes, RT-PCR y Western blot. Para el ensayo del RT-PCR, se observa que el estímulo con LPS incremento la inducción de la enzima COX-2 más de un 50 % con respecto al basal, mientras que el pre-tratamiento con apigenina disminuyó de manera concentración dependiente la inducción de esta enzima. Sin embargo, apigenina 15  $\mu\text{M}$  no exhibe el comportamiento esperado. Se presenta diferencia significativa con respecto al estímulo a una concentración de 5  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  (Figura 16).



**Figura 16. Efecto de apigenina sobre la acción del LPS en la transcripción de la enzima COX-2 en células H9c2.**

Las células  $5 \times 10^6$  células/pozo fueron pre-tratadas con apigenina (1 a 15  $\mu\text{M}$ ) por 30 minutos, después del tratamiento con LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 4 hrs. Posteriormente, se aisló RNA total y se realizó RT-PCR. La expresión de GADPH fue usada como control positivo. Los datos representan la desviación estándar. Las muestras se procesaron para el ensayo de RT-PCR. Los resultados se analizaron por densitometría mediante el sistema Lab-Works. Los resultados representan la media  $\pm$  error estándar, los valores son significativamente diferentes del basal si  $*p < 0.05$ , mediante una Anova de una vía. Los experimentos se realizaron tres veces por separado.

Con respecto al nivel traduccional de la enzima, por medio de Western blot, se observa que el estímulo con LPS no incrementa la expresión de la enzima, y parece que disminuye una cuarta parte con respecto al basal. Sin embargo, a partir de 5  $\mu\text{M}$  la expresión de la proteína de COX-2 decrece de manera dependiente de la concentración. A partir de 5  $\mu\text{M}$  se observa diferencia significativa (Fig. 17).



**Figura 17. Efecto de apigenina sobre la acción del LPS en la traducción de la enzima COX-2 en células H9c2.**

Los cardiomiocitos H9c2 ( $5 \times 10^6$ ) se sembraron fueron pre-tratadas con apigenina (1 a 15  $\mu\text{M}$ ) por 30 minutos seguido del tratamiento con LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 18 hrs. Las muestras se procesaron para el ensayo de Western blot. Los resultados se analizaron por densitometria mediante el sistema Lab-Works. Los resultados representan la media  $\pm$  error estándar, los valores son significativamente diferentes del basal si  $*p < 0.05$ , mediante Anova de una vía. Los experimentos se realizaron tres veces por separado.

## 8 DISCUSIÓN

El objetivo fundamental de este proyecto consistió en evaluar los mecanismos celulares detrás del efecto anti-inflamatorio de apigenina en células cardíacas estimuladas con Lipopolisacárido (LPS) de *Porphyromonas gingivalis*. Los resultados obtenidos mostraron que apigenina inhibe la respuesta inflamatoria inducida por LPS, mediante la disminución en la fosforilación de las cinasas JNK, ERK 1/2 y p38 de forma dependiente de la concentración. Además se encontró que el flavonoide regula la expresión de la isoenzima COX-2 en cardiomiocitos de ratón.

Como se mencionó, la enfermedad periodontal se relaciona con el inicio, desarrollo y progresión de una gran cantidad de padecimientos sistémicos. Cuando el tejido cardíaco es afectado por la migración de componentes bacterianos, productos citotóxicos e incluso microorganismos, se favorece el comienzo de patologías subyacentes a la enfermedad periodontal, por ejemplo la Endocarditis infecciosa. Por otra parte, *Porphyromonas gingivalis* principal microorganismo periodontopatógeno gram-negativo presenta en su membrana externa el Lipopolisacárido (LPS) o endotoxina. Las evidencias confirman que cantidades mínimas de LPS, liberado por patógenos, pueden iniciar una potente respuesta inmune, y con ello, desencadenar principalmente eventos de inflamación. Sin embargo, cuando la respuesta inmune al ligando no se controla adecuadamente y es prolongada, puede conducir a un síndrome de choque séptico fatal o el desarrollo de otras patologías<sup>61</sup>.

Estudios previos en cardiomiocitos, demostraron que la activación del receptor TLR-4, inducido por LPS, desencadena la translocación al núcleo de factores de transcripción como el Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NFκB) y Proteína Activadora 1 (AP-1). Este evento promueve la síntesis de mediadores pro-inflamatorios como interleucinas (IL-1β, IL-6), citocinas (factor de necrosis tumoral-α (TNF-α), y enzimas (iNOS y COX-2). Esta evidencia sugiere que la endotoxina desempeña un papel primordial en la respuesta inflamatoria en células cardíacas<sup>62,63</sup>.

Actualmente en la medicina tradicional el uso de productos de origen natural ha tomado relevancia como alternativa en el tratamiento algunos padecimientos. Apigenina es un flavonoide presente en gran cantidad de frutas y vegetales que

exhibe actividad biológica múltiple. En años recientes, diversos estudios confirman que este flavonoide regula procesos de inflamación, apoptosis, mutagénesis, estrés oxidativo y proliferación celular, tanto en sistemas *in vitro* como en modelos *in vivo* 59,64 .

Con el fin de comprender el mecanismo molecular por el cual apigenina contrarresta el estado de inflamación inducido por LPS en células cardiacas, se decidió utilizar como sistema de estudio el cultivo celular H9c2 derivado de cardiomiocitos de ratón neonatal. Publicaciones previas destacan el uso de células de ligamento periodontal humano (hPDL), monocitos, mastocitos humanos y células de microglía, como ejemplo de modelos *in vitro* para evaluar inflamación celular inducida por diferentes estímulos 64-67 .

Los principales reportes que sustentan esta investigación fueron realizados por Zhang Tianzhu *et al.* 2014 y por nuestro grupo de investigación 68. El primer trabajo reportó los efectos protectores de apigenina [40 µM] en cardiomiocitos de ratón neonatal (H9c2) estimulados con LPS (10 µg/mL), al reducir significativamente la expresión de ERK1/2, JNK y p38, componentes de la vía Proteína Cinasas Activadas por Mitógenos (MAPK), y en la expresión de las proteínas de la cascada de señalización de la esfingosina quinasa 1 / esfingosina 1-fosfato (SphK1/S1P). En el otro ensayo, apigenina [15 µM] inhibió la respuesta inflamatoria inducida por ácido lipoteicoico (LTA) en cardiomiocitos, mediante el bloqueo de la fosforilación en las cinasas de la vía MAPK y en la transcripción del NF-κB a través de la degradación de IκB (inhibidor de NF-κB) 68 .

Con estos precedentes experimentales, nuestro interés se aboco en evaluar el potencial efecto de apigenina como agente anti-inflamatorio en la vía de señalización MAPK, específicamente en la fosforilación de las cinasas JNK, ERK1/2 y p38, y de igual manera en la expresión de COX-2, enzima reconocida por su participación en la respuesta inflamatoria.

En primera instancia para determinar el efecto de apigenina en la viabilidad de las células H9c2, se decidió realizar un ensayo de Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Los datos recopilados sugieren que apigenina no redujo la viabilidad de las células H9c2, incluso a 72 hrs (Fig. 12). Este hecho coincide con los resultados encontrados por Gil-Saeng Jeong *et al.* 2009 en hPDL, y por Kang, O *et*

al. 2010 en mastocitos humanos, en donde las concentraciones del flavonoide fueron 50  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

Una vez establecido que el flavonoide no presentó actividad citotóxica en los cardiomiocitos, se decidió evaluar el efecto de apigenina en la transducción de señales de la vía MAPK. Esta vía de señalización es una familia de serín/treonín cinasas constituida por tres MAP cinasas principales: ERK 1/2 (cinasa relacionada con la señal extracelular), p38 MAPK y JNK (c-Jun NH2 - cinasa terminal) <sup>69</sup>. Una vez activadas, las MAPKs fosforilan moléculas blanco que participan en la regulación de procesos celulares como la embriogénesis, proliferación, diferenciación, apoptosis e inflamación <sup>70</sup>. Esta vía participa en la síntesis de mediadores y enzimas inflamatorias, e igualmente en la modulación de factores de transcripción como AP-1 y NF $\kappa$ B. Diferentes estudios *in vitro* asocian el potencial efecto anti-inflamatorio de los flavonoides con la supresión de éstas cascadas de transducción de señales <sup>68, 70, 71</sup>.

Con la finalidad de investigar si los efectos anti-inflamatorios de apigenina involucran la activación de los tres subtipos de MAPKs, las células H9c2 fueron pre-tratadas con diferentes concentraciones del flavonoide, y posteriormente estimuladas con LPS [1 $\mu\text{M}$ ] de *P. gingivalis*. Para ello se realizó un ensayo de Western blot. Las Figuras 13,14 y 15 muestran que el estímulo con el ligando aumentó la expresión de las proteínas JNK, ERK 1/2 y p38, con respecto al basal; y el pre-tratamiento con apigenina disminuyó significativamente de manera dependiente de la concentración la expresión de las proteínas antes mencionadas, siendo 15  $\mu\text{M}$  la concentración más efectiva. Las gráficas correspondientes a las proteínas de p38 (Fig. 13) y JNK (Fig. 15) exhiben mayor inhibición en su fosforilación.

Estos hallazgos son consistentes con los ensayos realizados en diversas líneas celulares, en donde apigenina bloqueó la activación de p38, JNK y ERK 1/2 <sup>64, 72, 73</sup>. Cabe resaltar que el grado de regulación mediado por el flavonoide sobre la actividad de MAPK varía con respecto al método de inducción y tipo de célula. Un ejemplo de ello es lo reportado por Sang Keun Ha et al. 2008, en donde apigenina [10  $\mu\text{M}$ ] decrece la fosforilación de p38 y JNK, sin afectar significativamente a ERK 1/2, en células de microglia murina. Por otro lado, en células de ligamento periodontal humano, el pre-tratamiento con apigenina [40  $\mu\text{M}$ ] bloquea la expresión inducida por LPS más nicotina de todas las cinasas de la vía MAPK <sup>64</sup>.

Esto nos lleva a sugerir que en células cardíacas, los efectos anti-inflamatorios de apigenina disminuyen la fosforilación de los tres subtipos de MAPKs, pero el efecto se acentúa en las cinasas p38 y JNK. No obstante, para corroborar dicha propuesta es necesario realizar ensayos con inhibidores selectivos para cada vía, con el fin de verificar si el efecto del flavonoide de estudio sigue una cascada determinada.

La ciclooxigenasa (COX), también conocida como prostaglandina-endoperóxido sintasa (PGHS), es la enzima que cataliza a partir del ácido araquidónico libre el paso limitante en la biosíntesis de la Prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>). Este producto es después metabolizado en varios eicosanoides: PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGI<sub>2</sub>, and TXA<sub>2</sub><sup>73</sup>. Las prostaglandinas son importantes mediadores asociados con eventos celulares como la inflamación<sup>73, 74</sup>. La expresión de la isoforma COX-2, forma inducible de la ciclooxigenasa, es regulada por factores de crecimiento, mediadores de inflamación (IL-1β, TNF-α) e inductores de inflamación (LPS, TPA)<sup>69,73</sup>. La literatura existente encontró relación entre la expresión de COX-2 y la activación de los factores de transcripción NFκB y AP-1<sup>69, 71, 73</sup>. Con tales precedentes y los datos recopilados previamente, se decidió evaluar si el flavonoide de estudio interfiere en la expresión de COX-2, y dilucidar el nivel de regulación génica en el que ocurre dicha acción (transcripción o traducción de la enzima). Para ello se emplearon ensayos de RT-PCR y Western blot, que permiten detectar la expresión del mRNA y de la proteína de COX-2, respectivamente.

Los cardiomiocitos fueron tratados bajo condiciones similares al protocolo empleado en la detección de MAPK, lo único que difirió fueron los tiempos de incubación del ligando. Los datos del ensayo de RT-PCR (Fig. 16), revelaron que las células tratadas con LPS incrementaron la expresión del mRNA de la enzima más de un 50% con respecto al basal. Por otra parte, el tratamiento con apigenina bloqueó la expresión del mRNA de COX-2 de manera dependiente de la concentración. Estos resultados confirman lo encontrado por Kang, O et al. 2010; Gutiérrez Venegas et al. 2016 y Weicheng Hu et al 2016, quienes reportan que la expresión del mRNA para COX-2 decrece en presencia de apigenina [50 μM, 15 μM y 100 μM, respectivamente].

En relación con los resultados encontrados, diversos estudios indican que la activación transcripcional de la enzima COX-2 es un mecanismo fundamental en el

incremento de la expresión de la enzima, ya que el promotor de COX-2 está compuesto por una caja TATA y elementos regulatorios que incluyen sitios de unión para factores de transcripción como NF- $\kappa$ B, CREB y AP-1<sup>74</sup>. Si bien es difícil identificar todas y cada una de las vías de señalización involucradas en la transcripción del gen de COX-2, se conoce que factores de crecimiento, endotoxinas y citocinas pro-inflamatorias comparten o convergen cascadas de señalización (NF- $\kappa$ B, cAMP, Protein Kinase K y las MAPKs) vinculadas con la expresión de COX-2<sup>73,74</sup>. Un considerable número de investigaciones refieren que la activación de estas vías es necesaria para una mayor expresión de la enzima<sup>73, 74, 75</sup>. Por ejemplo, en macrófagos RAW 264.7 el ligando estimula la transcripción de la enzima mediante la acción cooperativa de los factores de transcripción CREB, NF- $\kappa$ B y AP-1. Esto sugiere que la transcripción del gen de COX-2 es regulado principalmente, no de manera única, por los componentes regulatorios ubicados en el promotor de la enzima<sup>74,75</sup>.

Con respecto al ensayo de Western blot, la literatura existente indica que el tratamiento con LPS incrementa los niveles de la proteína de COX-2 en diversos estirpes celulares<sup>64,69</sup>. Sorprendentemente, la Figura 17 muestra que las células sin tratamiento (basal) presentaron mayores niveles de la proteína con respecto a las células inducidas sólo con la endotoxina [1 $\mu$ M]. Este resultado difiere de lo encontrado por los grupos de investigación de Kang O et al. 2010 y Sang Keun Ha et al. 2008, en donde se reporta que apigenina [10  $\mu$ M y 50  $\mu$ M] bloquea la expresión de la proteína COX-2 en mastocitos humanos y células de microglia murina, respectivamente.

Esta discrepancia puede explicarse probablemente por el tipo de célula estudiada. La isoforma inducible COX-2 es asociada primordialmente con eventos de inflamación, shock tóxico, cáncer y apoptosis. No obstante, estudios previos demuestran su expresión constitutiva en algunos tejidos (riñón y células endoteliales), hecho que sugiere que la enzima desempeña una función en la homeostasis celular<sup>76,77</sup>. Aunque la expresión de COX-2 participa en procesos inflamatorios asociados con la enfermedad cardíaca, recientes investigaciones señalan que algunos productos enzimáticos de COX-2 cumplen un papel protector (antiinflamación, preconditionamiento isquémico, cardioprotección farmacológica y homeostasis vascular) en algunos padecimientos cardíacos como la lesión por Isquemia/Reperusión<sup>76, 78</sup>. Esta acción principalmente a través de la producción de las prostaglandinas PGE<sub>2</sub> y PGI<sub>2</sub>.

Las acciones citoprotectoras de PGE<sub>2</sub> y PGI<sub>2</sub> se atribuyen al antagonismo en la acción de la adenilato ciclasa, activación de ATP, inhibición del flujo de calcio, mientras que fisiológicamente se manifiesta a través de su potente acción vasodilatadora, anti-inflamatoria y anti-trombotica <sup>76, 79</sup>. Aunado a esto, se ha encontrado que el uso de inhibidores selectivos para COX-2, como celecoxib, decrecen la producción de PGE<sub>2</sub>, lo que aumenta la incidencia de eventos cardiovasculares y empeora la insuficiencia cardiaca <sup>80</sup>.

Lo anterior indica que COX-2 desempeña dos funciones en eventos inflamatorios: primero al inducir el proceso inflamatorio y más tarde promoviendo su resolución <sup>78</sup>. Ésto nos lleva a formular que la enzima exhibe propiedades benéficas o perjudiciales de acuerdo con la intensidad de la inducción, la fisiopatología y la capacidad de las células implicadas para metabolizar la PGH<sub>2</sub>, producida por COX-2, en las prostaglandinas citoprotectoras (PGE<sub>2</sub> y PGI) <sup>76, 80</sup>.

Por otra parte, apigenina inhibe la traducción de la enzima COX-2 de manera gradual desde concentraciones de 5 µM (Fig. 17); no obstante, dado la información recopilada, futuras investigaciones deberían centrarse en investigar si el flavonoide de estudio es selectivo para las células inflamatorias, así como su efecto específico en las prostaglandinas benéficas y perjudiciales en los cardiomiocitos H9c2 <sup>80</sup>.

Este hallazgo, aunque preliminar, sugiere que apigenina es capaz de modular la expresión de la enzima, a nivel del transcrito y traducción de la enzima. Como se mencionó en el transcurso de este ensayo, las moléculas de estudio: Proteínas de la cascada de señalización MAPK (JNK, ERK 1/2 y p38) y la isoenzima COX-2, participan, en diferentes grados, en procesos de inflamación en cardiomiocitos de ratón, dando pauta, al desarrollo o progresión de afecciones cardiacas como la Endocarditis Infecciosa. En conjunto, los resultados de este proyecto sugieren que en cardiomiocitos, la reducción e inhibición de moléculas implicadas en procesos inflamatorios, y en las vías de transducción de señales, representa una estrategia viable en el tratamiento de padecimientos cardiovasculares iniciados por una enfermedad bucal.

## 9 CONCLUSIÓN

En la presente investigación se estableció en un modelo *in vitro* que el flavonoide apigenina es capaz de regular la fosforilación, inducida por el Lipopolisacárido de *P. gingivalis*, de las proteínas de la vía de señalización intracelular MAPK, de manera dependiente de la concentración. De igual forma se demostró que este flavonoide modula la expresión de la isoenzima COX-2 a niveles de transcripción y traducción. Con base en los resultados, se puede inferir que apigenina decrece la expresión éstas moléculas, implicadas principalmente en el proceso de inflamación inducido por el Lipopolisacárido de *P. gingivalis* en células H9c2. Estos datos contribuyen en el desarrollo de tratamientos de origen natural para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares originadas por la Enfermedad Periodontal.

## 10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Resultados del Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Patologías Bucales (SIVEPAB) 2013. (2014) (1st ed., pp. 56-57). Ciudad de México. Consultado en [http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/bol\\_sivepab/SIVEPAB-2013.pdf](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/bol_sivepab/SIVEPAB-2013.pdf).
- 2- Newman, M., Takei, H., Klokkevold, P., & Carranza, F. (2010). *Periodontología clínica [de] Carranza*. México, D.F.: McGraw-Hill Interamericana.
- 3- Lindhe, J., Karring, T., & Lang, N. (2009). *Periodontologia clinica e implantologia odontologica*. Buenos Aires: Medica Panamericana.
- 4- Hughes, F. (2015). Chapter 34 – Periodontium and Periodontal Disease. In *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences* (1st ed., pp. 433-444). United Kingdom: Academic Press. <http://dx.doi.org.pbidi.unam.mx:8080/10.1016/B978-0-12-397157-9.00038-2>
- 5- Manzano Flores, E. (2016). "Prevalencia y caracterización clínica periodontal en pacientes hipertensos controlados con bloqueadores de calcio que acuden al centro de salud del distrito 17d06 chilbulolla (Especialidad en Periodoncia). Universidad Central de Ecuador.
- 6- Periodontal Ligament - National Library of Medicine - PubMed Health. (2016). PubMed Health. Consultado 13 Julio 2016, de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMHT0025302/>
- 7- Costalonga, M. & Herzberg, M. (2014). The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. *Immunology Letters*, 162(2), 22-38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2014.08.017>
- 8- Wade, W. (2013). The oral microbiome in health and disease. *Pharmacological Research*, 69(1), 137-143. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2012.11.006>
- 9- Strużycka, I. Z. A. B. E. L. A. (2014). The oral microbiome in dental caries. *Polish Journal of Microbiology*, 63(2), 127-135.
- 10- Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., & Sintim, H. (2015). Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Medicinal Chemistry*, 7(4), 493-512. <http://dx.doi.org/10.4155/fmc.15.6>
- 11- Takahashi, N. (2015). Oral Microbiome Metabolism From “Who Are They?” to “What Are They Doing?”. *Journal of dental research*, 94(12), 1628-1637. <http://dx.doi: 10.1177/0022034515606045>.
- 12- Barraud, N., Kjelleberg, S., & Rice, S. A. (2015). Dispersal from Microbial Biofilms. *Microbiology Spectrum*, 3(6). <http://dx doi: 10.1128/microbiolspec>.
- 13- Sintim, H. O., & Gürsoy, U. K. (2016). Biofilms as “Connectors” for Oral and Systems Medicine: A New Opportunity for Biomarkers, Molecular Targets, and Bacterial Eradication. *Omic: a journal of integrative biology*, 20(1), 3-11. doi: 10.1089/omi.2015.0146
- 14- Aruni, A., Dou, Y., Mishra, A., & Fletcher, H. (2015). The Biofilm Community: Rebels with a Cause. *Current Oral Health Reports*, 2(1), 48-56. <http://dx.doi.org/10.1007/s40496-014-0044-5>
- 15- Gibbons, R. (1989). Bacterial Adhesion to Oral Tissues: A Model for Infectious Diseases. *Journal Of Dental Research*, 68(5), 750-760. <http://dx.doi.org/10.1177/00220345890680050101>

- 16-** Jakubovics, N. (2015). Intermicrobial Interactions as a Driver for Community Composition and Stratification of Oral Biofilms. *Journal Of Molecular Biology*, 427(23), 3662-3675. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2015.09.022>
- 17-** Hajishengallis, G. (2014). Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol*, 15(1), 30-44. <http://dx.doi.org/10.1038/nri3785>
- 18-** Hajishengallis, G., Darveau, R. P., & Curtis, M. A. (2012). The keystone-pathogen hypothesis. *Nature Reviews Microbiology*, 10(10), 717-725.
- 19-** Genco, R. & Borgnakke, W. (2013). Risk factors for periodontal disease. *Periodontology 2000*,62(1), 59-94. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0757.2012.00457.x>
- 20-** Cekici, A., Kantarci, A., Hasturk, H., & Van Dyke, T. (2013). Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology 2000*, 64(1), 57-80. <http://dx.doi.org/10.1111/prd.12002>
- 21-** Perio.org. (2016). Perio.org. Consultado 25 Julio 2016, de <https://www.perio.org/>
- 22-** Armitage, G. (1999). Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. *Annals Of Periodontology*, 4(1), 1-6. <http://dx.doi.org/10.1902/annals.1999.4.1.1>
- 23-** How, K., Song, K., & Chan, K. (2016). Porphyromonas gingivalis: An Overview of Periodontopathic Pathogen below the Gum Line. *Front. Microbiol.*, 7. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.00053>
- 24-** Sakanaka, A., Takeuchi, H., Kuboniwa, M., & Amano, A. (2016). Dual lifestyle of Porphyromonas gingivalis in biofilm and gingival cells. *Microbial Pathogenesis*, 94, 42-47. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2015.10.003>
- 25-** Park, B. & Lee, J. (2013). Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Experimental & Molecular Medicine*, 45(12), e66. <http://dx.doi.org/10.1038/emm.2013.97>
- 26-** Maldonado, R., Sá-Correia, I., & Valvano, M. (2016). Lipopolysaccharide modification in Gram-negative bacteria during chronic infection. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(4), 480-493. <http://dx.doi.org/10.1093/femsre/fuw007>
- 27-** Needham, B. & Trent, M. (2013). Fortifying the barrier: the impact of lipid A remodelling on bacterial pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 11(7), 467-481. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3047>
- 28-** Bostanci, N. & Belibasakis, G. (2012). Porphyromonas gingivalis: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen. *FEMS Microbiol Lett*, 333(1), 1-9. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02579.x>
- 29-** Oppermann, R., Weidlich, P., & Musskopf, M. (2012). Periodontal disease and systemic complications. *Braz. Oral Res.*, 26(spe1), 39-47. <http://dx.doi.org/10.1590/s1806-83242012000700007>
- 30-** Belstrøm, D., Damgaard, C., Nielsen, C., & Holmstrup, P. (2012). Does a causal relation between cardiovascular disease and periodontitis exist?. *Microbes And Infection*, 14(5), 411-418. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2011.12.004>
- 31-** Maddi, Abhiram & Scannapieco, F. A. (2013). Oral biofilms, oral and periodontal infections, and systemic disease. *Am J Dent*, 26(5), 249-254.

- 32-** Linden, G. & Herzberg, M. (2013). Periodontitis and systemic diseases: a record of discussions of working group 4 of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *Journal Of Clinical Periodontology*, 40, S20-S23. <http://dx.doi.org/10.1111/jcpe.12091>
- 33-** Carramolino-Cuellar, E., Tomas, I., & Jimenez-Soriano, Y. (2014). Relationship between the oral cavity and cardiovascular diseases and metabolic syndrome. *Med Oral*, e289-e294. <http://dx.doi.org/10.4317/medoral.19563>
- 34-** Corgel, J., Pucher, J., Rethman, M., & Reynolds, M. (2012). State of the Science: Chronic Periodontitis and Systemic Health. *Journal Of Evidence Based Dental Practice*, 12(3), 20-28. [http://dx.doi.org/10.1016/s1532-3382\(12\)70006-4](http://dx.doi.org/10.1016/s1532-3382(12)70006-4)
- 35-** Leung Chan, K. & M. Embil, J. (2016). *Endocarditis: diagnosis and management* (2nd ed., pp. 49-66). London: Springer. <http://link.springer.com.pbidi.unam.mx:8080/book/10.1007%2F978-1-84628-453-3>
- 36-** Werdan, K., Dietz, S., Löffler, B., Niemann, S., Bushnaq, H., & Silber, R. et al. (2013). Mechanisms of infective endocarditis: pathogen–host interaction and risk states. *Nat Rev Cardiol*, 11(1), 35-50. <http://dx.doi.org/10.1038/nrcardio.2013.174>
- 37-** Endocarditis: MedlinePlus enciclopedia médica. (2016). Medlineplus.gov. Consultado 8 Agosto de 2016, de <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/001098.htm>
- 38-** Murphy, K. & Weaver, C. *Janeway's immunobiology*.
- 39-** H. Daruna, J. (2012). In *Introduction to Psychoneuroimmunology* (2nd ed., pp. 35-36). London: Academic Press. Retrieved from <http://dx.doi.org.pbidi.unam.mx:8080/10.1016/B978-0-12-382049-5.01001-9>
- 40-** Iwasaki, A. & Medzhitov, R. (2015). Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature Immunology*, 16(4), 343-353. <http://dx.doi.org/10.1038/ni.3123>
- 41-** Liu, Q. & Ding, J. (2016). The molecular mechanisms of TLR-signaling cooperation in cytokine regulation. *Immunology And Cell Biology*, 94(6), 538-542. <http://dx.doi.org/10.1038/icb.2016.18>
- 42-** Portou, M., Baker, D., Abraham, D., & Tsui, J. (2015). The innate immune system, toll-like receptors and dermal wound healing: A review. *Vascular Pharmacology*, 71, 31-36. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vph.2015.02.007>
- 43-** McGuire, V. & Arthur, J. (2015). Subverting Toll-Like Receptor Signaling by Bacterial Pathogens. *Front. Immunol.*, 6. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2015.00607>
- 44-** Hans, M. & Hans, V. (2011). Toll-like receptors and their dual role in periodontitis: a review. *J Oral Sci*, 53(3), 263-271. <http://dx.doi.org/10.2334/josnusd.53.263>
- 45-** Botos, I., Segal, D., & Davies, D. (2011). The Structural Biology of Toll-like Receptors. *Structure*, 19(4), 447-459. <http://dx.doi.org/10.1016/j.str.2011.02.004>
- 46-** Arthur, J. & Ley, S. (2013). Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 13(9), 679-692. <http://dx.doi.org/10.1038/nri3495>
- 47-** Nieto, A. D., Dehesa, A. Z., & Rodríguez, J. R. V. (2009). Control molecular de la inflamación: Regulación de los receptores tipo Toll. *Revista de Educación Bioquímica*, 28(4), 125-131.

- 48-** Raman, M., Chen, W., & Cobb, M. (2007). Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*, 26(22), 3100-3112. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1210392>
- 49-** García, M. S., & Ruíz, M. G. (2005). Las MAP cinasas: Elementos de señalización en la defensa de las plantas contra patógenos. *Revista de Educación Bioquímica*, 24(1), 4-11.
- 50-** Mukherjee, S., Karmakar, S., & Babu, S. (2016). TLR2 and TLR4 mediated host immune responses in major infectious diseases: a review. *The Brazilian Journal Of Infectious Diseases*, 20(2), 193-204. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2015.10.011>
- 51-** Molteni, M., Gemma, S., & Rossetti, C. (2016). The Role of Toll-Like Receptor 4 in Infectious and Non infectious Inflammation. *Mediators Of Inflammation*, 2016,1-9. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/6978936>
- 52-** Vadillo, E., & Pelayo, R. (2012). Los receptores tipo Toll en el desarrollo y función del sistema hematopoyético. *Revista de Investigación Clínica*, 64(5), 461-476.
- 53-** Kumar, S. & Pandey, A. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, 2013, 1-16. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/162750>
- 54-** Leyva-López, N., Gutierrez-Grijalva, E., Ambriz-Perez, D., & Heredia, J. (2016). Flavonoids as Cytokine Modulators: A Possible Therapy for Inflammation-Related Diseases. *IJMS*, 17(6), 921. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms17060921>
- 55-** Testai, L. (2015). Flavonoids and mitochondrial pharmacology: A new paradigm for cardioprotection. *Life Sciences*, 135, 68-76. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2015.04.017>
- 56-** Pandey, R., Parajuli, P., Koffas, M., & Sohng, J. (2016). Microbial production of natural and non-natural flavonoids: Pathway engineering, directed evolution and systems/synthetic biology. *Biotechnology Advances*, 34(5), 634-662. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.02.012>
- 57-** Halake, K., Birajdar, M., & Lee, J. (2016). Structural implications of polyphenolic antioxidants. *Journal Of Industrial and Engineering Chemistry*, 35, 1-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiec.2016.01.003>
- 58-** Jiménez, C. I. E., Martínez, E. Y. C., & Fonseca, J. G. (2009). Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Rev Fac Med UNAM*, 52(2), 73-75.
- 59-** Shukla, S. & Gupta, S. (2010). Apigenin: A Promising Molecule for Cancer Prevention. *Pharm Res*, 27(6), 962-978. <http://dx.doi.org/10.1007/s11095-010-0089-7>
- 60-** He, X., Li, C., Wei, Z., Wang, J., Kou, J., & Liu, W. et al. (2016). Protective role of apigenin in cisplatin-induced renal injury. *European Journal Of Pharmacology*, 789, 215-221. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.07.003>
- 61-** Park, B. & Lee, J. (2013). Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Experimental & Molecular Medicine*, 45(12), e66. <http://dx.doi.org/10.1038/emm.2013.97>
- 62-** Li, X., Jiang, L., Lin, S., He, Y., Shen, G., Cai, Z., & Zhang, M. (2014). Inhibition of mTORC1 renders cardiac protection against lipopolysaccharide. *International journal of clinical and experimental pathology*, 7(12), 8432.

- 63-** Jeong, G., Lee, S., Jeong, S., Kim, Y., & Kim, E. (2009). Anti-inflammatory effects of apigenin on nicotine- and lipopolysaccharide-stimulated human periodontal ligament cells via heme oxygenase-1. *International Immunopharmacology*, 9(12), 1374-1380. <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2009.08.015>
- 64-** Nicholas, C., Batra, S., Vargo, M., Voss, O., Gavrilin, M., & Wewers, M. et al. (2007). Apigenin Blocks Lipopolysaccharide-Induced Lethality In Vivo and Proinflammatory Cytokines Expression by Inactivating NF- $\kappa$ B through the Suppression of p65 Phosphorylation. *The Journal Of Immunology*, 179(10), 7121-7127. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.179.10.7121>
- 65-** Kang, O., Lee, J., & Kwon, D. (2010). Apigenin inhibits release of inflammatory mediators by blocking the NF- $\kappa$ B activation pathways in the HMC-1 cells. *Immunopharmacology And Immunotoxicology*, 33(3), 473-479. <http://dx.doi.org/10.3109/08923973.2010.538851>
- 66-** Ha, S., Lee, P., Park, J., Oh, H., Lee, S., & Park, J. et al. (2008). Apigenin inhibits the production of NO and PGE2 in microglia and inhibits neuronal cell death in a middle cerebral artery occlusion-induced focal ischemia mice model. *NeurochemistryInternational*, 52(4-5),878-886. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2007.10.005>
- 67-** Gutiérrez-Venegas, G. & González-Rosas, Z. (2016). Apigenin reduce lipoteichoic acid-induced inflammatory response in rat cardiomyoblast cells. *Archives Of Pharmacal Research*. <http://dx.doi.org/10.1007/s12272-016-0756-2>
- 68-** Vezza, T., Rodríguez-Nogales, A., Algieri, F., Utrilla, M. P., Rodríguez-Cabezas, M. E., & Galvez, J. (2016). Flavonoids in inflammatory bowel disease: a review. *Nutrients*, 8(4), 211.
- 69-** Hu, W., Wang, X., Wu, L., Shen, T., Ji, L., & Zhao, X. et al. (2016). Apigenin-7-O- $\beta$ -d-glucuronide inhibits LPS-induced inflammation through the inactivation of AP-1 and MAPK signaling pathways in RAW 264.7 macrophages and protects mice against endotoxin shock. *Food Funct.*, 7(2), 1002-1013. <http://dx.doi.org/10.1039/c5fo01212k>
- 70-** Leyva-López, N., Gutierrez-Grijalva, E., Ambriz-Perez, D., & Heredia, J. (2016). Flavonoids as Cytokine Modulators: A Possible Therapy for Inflammation-Related Diseases. *International Journal Of Molecular Sciences*, 17(6), 921. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms17060921>
- 71-** Liao, Y., Shen, W., Kong, G., Lv, H., Tao, W., & Bo, P. (2014). Apigenin Induces the Apoptosis and Regulates MAPK Signaling Pathways in Mouse Macrophage ANA-1 Cells. *Plos ONE*, 9(3), e92007. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0092007>
- 72-** Zhang, T., Yan, T., Du, J., Wang, S., & Yang, H. (2015). Apigenin attenuates heart injury in lipopolysaccharide-induced endotoxemic model by suppressing sphingosine kinase 1/sphingosine 1-phosphate signaling pathway. *Chemico-Biological Interactions*, 233, 46-55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2014.12.021>
- 73-** Rumzhum, N., & Ammit, A. (2016). Cyclooxygenase 2: its regulation, role and impact in airway inflammation. *Clinical & Experimental Allergy*, 46(3), 397-410. <http://dx.doi.org/10.1111/cea.12697>
- 74-** Smith, W., & Murphy, R. (2017). Chapter 9 - The Eicosanoids: Cyclooxygenase, Lipoxygenase and Epoxygenase Pathways. In *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* (6th ed., pp. 259-296). USA. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63438-2.00009-2>

- 75-** Kang, Y., Mbonye, U., DeLong, C., Wada, M., & Smith, W. (2007). Regulation of intracellular cyclooxygenase levels by gene transcription and protein degradation. *Progress In Lipid Research*, 46(2), 108-125. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plipres.2007.01.001>
- 76-** Bolli, R. (2002). Discovery of a new function of cyclooxygenase (COX)-2: COX-2 is a cardioprotective protein that alleviates ischemia/reperfusion injury and mediates the late phase of preconditioning. *Cardiovascular Research*, 55(3), 506-519. [http://dx.doi.org/10.1016/s0008-6363\(02\)00414-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0008-6363(02)00414-5)
- 77-** Sakane, K., Monteiro, C., Silva, W., Silva, A., Santos, P., Lima, K., & Moraes, K. (2014). Cellular and molecular studies of the effects of a selective COX-2 inhibitor celecoxib in the cardiac cell line H9c2 and their correlation with death mechanisms. *Brazilian Journal Of Medical And Biological Research*, 47(1), 50-59. <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431x20133028>
- 78-** Salinas, G., Rangasetty, U., Uretsky, B., & Birnbaum, Y. (2007). The Cyclooxygenase 2 (COX-2) Story: It's Time to Explain, Not Inflammation. *Journal Of Cardiovascular Pharmacology And Therapeutics*, 12(2), 98-111. <http://dx.doi.org/10.1177/1074248407301172>
- 79-** Insete, J., Molla, B., Aguilar, R., Través, P., Barba, I., & Martín-Sanz, P. et al. (2009). Constitutive COX-2 activity in cardiomyocytes confers permanent cardioprotection. *Journal Of Molecular And Cellular Cardiology*, 46(2), 160-168. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.11.011>
- 80-** Wu, G., Mannam, A., Wu, J., Kirbis, S., Shie, J., & Chen, C. et al. (2003). Hypoxia induces myocyte-dependent COX-2 regulation in endothelial cells: role of VEGF. *American Journal Of Physiology - Heart And Circulatory Physiology*, 285(6), H2420-H2429. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00187.2003>