



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE CIRUJANO DENTISTA

TESIS

Presenta:

Rosas Martínez Marisol

**Efecto de miricetina en la línea celular H9c2 en la estimulación del
peptidoglicano obtenido de *Streptococcus sanguinis*.**

Directora:

Dra. Gloria Gutiérrez Venegas

Asesor:

C.D. Gilberto Onorio Farías

Ciudad de México, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A DIOS:

Gracias por acompañarme en el transcurso de mi vida personal y profesional, por cada uno de los dones que me brindaste; los cuales me permitieron continuar y culminar con ésta meta.

MIS PADRES:

Por su amor, apoyo y confianza incondicional en éste camino; por ser mi ejemplo a seguir de perseverancia, educación, trabajo y esfuerzo.

MIS HERMANAS:

Karina y Fabiola; por su mediación, comprensión y sobre todo; por creer en mí.

MIS MAESTROS:

Que me acompañaron en mi formación académica, por sus enseñanzas y el valor de educar a la sociedad mexicana.

AGRADECIMIENTOS

A LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA:

Por darme la oportunidad de formar parte de la Universidad Nacional Autónoma de México; máxima casa de estudios superiores; al otorgarme educación, conocimientos, espacios físicos, acervo cultural; identidad y responsabilidad social.

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA. DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRAGADO E INVESTIGACIÓN: LABORATORIO DE BIOQUÍMICA.

Por permitirme aprender, conocer y desarrollarme profesionalmente en el campo de la investigación; durante mi estancia del servicio social y en particular durante el desarrollo de éste proyecto de tesis.

A mi directora de tesis, Gloria Gutiérrez Venegas, por darme la oportunidad de aprender, compartir y desarrollar nuevos conocimientos, habilidades y proyectos; por su disciplina, enseñanzas, amistad, apoyo y confianza.

A mi asesor de tesis, Gilberto Onorio Farías, por enseñarme, apoyarme, instruirme y ayudarme a discernir durante el camino de mi formación profesional.

A MIS AMIGOS:

Dra. Berenice Fernández, Juan Arturo Gómez, Sr. Antonio González (Toño), Sra. Lulú Palma, Sr. Plácido Sánchez, Noémie Bonneau, Francisco Ochoa, Abril Padilla, Antonio Serrano, Tom Rousseau, León Contreras; y todos los compañeros que formaron parte del laboratorio de Bioquímica; gracias por compartir su conocimiento, confianza, apoyo, enseñanzas y amistad.

A todos mis compañeros y amigos que formaron parte de mi formación académica; especialmente Maryan Santillán, Erandi Cabrera, Nelly Juárez, Montserrat Cerqueda y Alan Garcés; por su motivación, experiencias, invaluable amistad y aprendizajes de vida; profesional y personal.

*“Cuando el objetivo te parezca difícil,
no cambies de objetivo;
busca un nuevo camino para llegar a él.”*

Confucio

INDICE

Introducción.....	1
1- Antecedentes	
-Multicausalidad de la enfermedad periodontal y endocarditis bacteriana.....	3
- Estructura periodontal saludable.....	6
-Enfermedad periodontal.....	9
- Clasificación de las enfermedades periodontales.....	10
- Características histopatológicas de la gingivitis y periodontitis.....	10
- Gingivitis inducida por placa.....	11
- Periodontitis crónica.....	11
- Fisiopatología de la endocarditis infecciosa.....	12
- Factores de riesgo en la enfermedad periodontal y endocarditis bacteriana.....	13
- Higiene bucal deficiente y desarrollo de la placa dentobacteriana.....	14
- Formación de la placa.....	15
- Fases de colonización.....	16
- Sistema inmunológico.....	16
- Inmunidad innata.....	17

- Biofilm periodontal.....	17
- Periodontitis como causalidad de endocarditis infecciosa.....	18
- Características clínicas de la endocarditis infecciosa.....	19
- Criterios de Duke modificados.....	19
- Tratamiento de endocarditis infecciosa.....	20
2. <i>Streptococcus sanguinis</i>: Enfermedad periodontal y endocarditis bacteriana.....	22
- Patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs).....	25
- Receptor tipo TOLL.....	26
- Vías de señalización celular.....	29
- Proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs).....	29
3. Tratamiento de las infecciones ocasionadas por <i>Streptococcus sanguinis</i>	
- Flavonoides.....	31
- Miricetina.....	33
-Efecto preventivo.....	35
- Epidemiología de la enfermedad periodontal y endocarditis infecciosa; e importancia de esta investigación.....	36

- Eficacia de los estudios.....	38
-Planteamiento del problema.....	41
- Hipótesis.....	43
-Objetivo general y específicos.....	43
- Material y métodos.....	44
- Variables de estudio.....	45
- Técnica.....	46
- Recursos.....	49
- Diseño estadístico.....	50
- Resultados.....	51
- Discusión.....	62
- Conclusión.....	66
- Cronograma.....	67
- Bibliografía.....	68
-Anexo.....	77

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades periodontales ocupan el segundo problema de salud pública que afecta la salud bucal en México; siendo de origen multifactorial que deteriora los tejidos de soporte de los órganos dentarios.

Estudios epidemiológicos han establecido una asociación de la enfermedad periodontal crónica y endocarditis infecciosa, ya que la ulceración de las bolsas periodontales; facilitan la entrada de bacterias al torrente sanguíneo.

Cabe destacar que una de las bacterias gram positivas de mayor interés es *Streptococcus sanguinis*, éste microorganismo está relacionado con la periodontitis crónica y la endocarditis infecciosa, ya que es capaz de activar la respuesta inmune del huésped por medio de sus factores de patogenicidad y virulencia; hay que tener en cuenta que el peptiglicano (PGN); componente de la pared celular de bacterias gram positivas; forma parte de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) que son detectados por las células de defensa del sistema inmune del ser humano; receptores tipo Toll (TLR) que en conjunto inducen la respuesta inflamatoria.

Se ha demostrado que el tratamiento de infecciones causadas por el *Streptococcus sanguinis*, no sólo reduciría el riesgo de complicaciones sistémicas, sino también la conservación de las estructuras que integran el periodonto.

Por otra parte, estudios recientes demuestran que el uso de algunos polifenoles de origen natural, ha presentado utilidad clínica en el manejo y control de algunas bacterias; la miricetina es un flavonoide que pertenece a este grupo de compuestos; se deriva de vegetales, nueces, frutas y té; así con propiedades anti-inflamatorias, anti-cancerígenas y antioxidantes. En resumen, éste flavonoide podría ser una nueva alternativa de tratamiento preventivo en pacientes con periodontitis crónica, disminuyendo la probabilidad de riesgo para endocarditis infecciosa.

De ahí que, surge el interés de realizar la investigación titulada: Efecto de miricetina en la línea celular H9c2 en la estimulación del peptiglicano obtenido de *Streptococcus sanguinis*, cuyo objetivo es determinar el efecto de miricetina en la línea celular H9c2 en la estimulación del peptidoglicano obtenido de *Streptococcus sanguinis*.

En resumen, de acuerdo a la frecuencia y porcentaje del efecto de miricetina a diferentes concentraciones; en la fosforilación de las MAPKs y expresión de COX-2, en la línea celular H9c2 en la estimulación del peptidoglicano obtenido de *Streptococcus sanguinis*; en el grupo 1 la frecuencia de actividad anti-inflamatoria fué de (4) 22.22%, el grupo dos de (12) 66.66%, grupo 3 de (15) 83.33% y en el grupo 4 de (16) 88.88%.

MARCO TEÓRICO

1. ANTECEDENTES

MULTICAUSALIDAD DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL Y ENDOCARDITIS BACTERIANA.

La medicina científica a lo largo de su historia, ha transitado por diferentes etapas y/o modelos conceptuales para explicar y abordar el proceso salud-enfermedad. En primer orden, tenemos al paradigma unicausal que describe la enfermedad desde el punto de vista biológico; surgiendo así la teoría del Miasma, durante la revolución industrial; y la teoría del germen; segunda mitad del siglo XIX; en donde los descubrimientos de agentes bacterianos formaron el principal aporte a la investigación epidemiológica.¹

En segundo orden, tenemos al paradigma multicausal, que establece como objeto de estudio la salud; surge al término de la segunda guerra mundial (1945) y se consolida en la década de los sesentas y culmina hasta 1980; se manifiesta ante la capacidad insuficiente de la teoría unicausal para dar una explicación de la realidad, ya que al evolucionar la organización de los grupos sociales se perdió la capacidad de dar respuestas adecuadas y resolver los problemas salud.

Por otra parte, al emerger la multicausalidad se fue consolidando con el desarrollo del paradigma de la historia natural de la enfermedad, el paradigma ecológico, es decir, la triada ecológica (Huésped, agente y medio ambiente); además de la teoría del riesgo con la estimación de la probabilidad estadística y los determinantes de la salud propuestos por Mark Lalonde y Julio Frenk. Así mismo

éste cambio paradigmático es resultado del trabajo multi e interdisciplinario con interés común; por ejemplo: el biólogo Von Bertalanffy, el economista Kenneth Boulding, el biomatemático Anatol Rapoport y el fisiólogo Ralph Gerard.²

Finalmente tenemos el paradigma histórico social, sistematizado por Noam Chomsky (1992); surge como una propuesta alternativa opuesta al modelo multicausal; considerando que el proceso salud-enfermedad tiene diferentes perfiles que se relacionan con el contexto histórico, modo de producción y las clases sociales; investigando la distribución desigual de enfermedades entre los diversos grupos de la sociedad.³ Además, éste modelo es holístico en su concepción, científico, dialéctico, humanista, considera el sentir y realiza diagnósticos situacionales para devolver al ser humano sus capacidades de autocuración.

En resumen, para efecto de esta investigación, partimos del paradigma multicausal, ya que el desarrollo de la enfermedad periodontal es resultado de una combinación de factores causales; la causalidad describe la propiedad de ser causal, la presencia de la causa o las ideas sobre la naturaleza de las relaciones de la causa y efecto.

Por lo cual es importante diferenciar entre causa suficiente y causa necesaria; en el primero, si el factor causa está presente el efecto enfermedad siempre ocurre; y en el segundo, si el factor causa está ausente, el efecto enfermedad no puede ocurrir.

Así mismo, los modelos de causalidad han variado a lo largo de la historia, con el unicausal; la epidemiología adoptó un solo efecto como resultado de una sola causa; con el multicausal propone que una enfermedad puede ser causada por más de un mecanismo causal; noción de riesgo y los modelos teóricos que tienen como antecedentes los movimientos de la medicina oficial y epidemiología social.

En cuanto a la teoría del factor de riesgo, se sustenta en un concepto probabilístico; estableciendo una diferencia entre causa, factor de riesgo y determinante. Por un lado, el riesgo es toda probabilidad de que ocurra un evento relacionado con la salud; por otra parte el factor de riesgo, es aquella condición que potencializa la aparición de la enfermedad; en cambio un determinante es un evento, condición o característica que desempeña una función esencial en la ocurrencia de una enfermedad (Rothman, 1986).

Por su parte, la Academia Americana de Periodoncia define un factor de riesgo como cualquier característica del individuo, aspecto de comportamiento o exposición ambiental que cuando están presentes; incrementan la probabilidad de que ocurra una enfermedad, y si están ausentes, removidos o controlados reducen la probabilidad de que se conviertan en un elemento más de la cadena causal.⁴

ESTRUCTURA PERIODONTAL SALUDABLE

El periodonto es un componente fisiológico del sistema estomatognático que tiene como principal función, la unión del órgano dentario al tejido óseo y por lo tanto se encarga de mantener la integridad de la superficie de la mucosa masticatoria de la cavidad bucal. Además, funcionalmente se divide en dos componentes: *Periodonto de protección*; conformado por encía que recubre y protege el resto de las estructuras; y el *periodonto de inserción*; constituido por el ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar. ⁵

ENCÍA

La encía es aquella parte de la mucosa que recubre el proceso alveolar, compuesta por un epitelio y tejido conjuntivo gingival; el primero se divide en tres: *epitelio oral*; plano pluriestratificado; *epitelio de unión*; simple no queratinizado; y *el col*; epitelio no queratinizado. El segundo es densamente colagenizado; conformado por fibras de colágeno, nervios, vasos sanguíneos y linfáticos; el fibroblasto es la principal célula y predominante del tejido conectivo; ⁶ no obstante se divide en libre, adherida e interdental; encarga de soportar las fuerzas friccionales de masticación, defender el espacio entre el diente y los tejidos blandos de invasores externos como microorganismos, permite la reparación y cicatrización de heridas. ⁵

LIGAMENTO PERIODONTAL

Es un tejido conectivo denso especializado que rodea las raíces de los dientes, interponiéndose con la pared interna del hueso alveolar; en conjunto estas fibras de colágeno mantienen suspendido al diente en su alvéolo. Así mismo está formado por elementos celulares como son los fibroblastos, cementoblastos, osteoblastos, osteoclastos y restos epiteliales de Malassez;⁷ además sus funciones se dividen en físicas, formativas, nutricionales y sensitivas; en primer orden proporciona la inserción de los órganos dentarios, resistencia, transmisión y amortiguación de las fuerzas oclusales; después participa en la formación, reabsorción de cemento y hueso; y finalmente aporta nutrientes al cemento, hueso y encía por medio de los vasos sanguíneos y el drenaje linfático; en particular es innervado por fibras nerviosas capaces de transmitir sensaciones táctiles de presión y dolor. ⁸

CEMENTO RADICULAR

Es un tejido mineralizado especializado que contiene fibras de colágeno inducidas en la matriz orgánica, siendo su principal componente mineral la hidroxiapatita; se inserta en el ligamento periodontal y contribuye en la reparación de la superficie radicular dañada. ⁹ Así mismo se divide en cemento *acelular*, encargado de cubrir el tercio cervical o hasta la mitad de la raíz, conformado por las fibras de Sharpey que desempeñan un papel importante en el apoyo del diente; y cemento *celular* que contiene cementocitos en espacios individuales, llamados lagunas. ⁶

En cuanto a las proteínas específicas del cemento como son la proteína de adhesión al cemento (CAP), relacionada y derivada del cementoblastoma humano (CP), además se ha reportado la caracterización de un factor de crecimiento derivado del cemento radicular (CGF), en donde su principal función consiste en aumentar la proliferación de fibroblastos gingivales y células del ligamento periodontal.^{10,11}

PROCESO ALVEOLAR

Es aquella porción de los maxilares y mandíbula encargada de sostener los dientes en su alveolo, se clasifica en el *hueso alveolar propiamente dicho*; conformado por una lámina delgada de hueso que rodea las raíces interdientarias en la cual se insertan las fibras del ligamento periodontal; y el *hueso de soporte*, compuesto por corticales vestibulares y linguales de los procesos alveolares; y por el hueso esponjoso; ubicado entre las corticales y el hueso alveolar.¹² En conjunto, las células que lo conforman son los osteoblastos, encargados de formar hueso; sintetizando, secretando y mineralizando las proteínas de la matriz extracelular; y los osteoclastos, segregan enzimas que degradan la sustancia orgánica del hueso.¹³

Recapitulando, el hueso alveolar junto con el cemento radicular y el ligamento periodontal constituyen el aparato de inserción del diente; teniendo como principal función la distribución y absorción de las fuerzas de masticación⁹. En efecto, cualquier alteración en alguno de los componentes de las estructuras de soporte de los órganos dentarios pueden conducir al establecimiento y desarrollo de la enfermedad periodontal.⁵

ENFERMEDAD PERIODONTAL

La **enfermedad periodontal** es una patología que afecta a los tejidos que soportan a los dientes, es una patología infecciosa causada por bacterias presentes en la boca; existen dos tipos de enfermedades periodontales: **gingivitis y periodontitis**.

La enfermedad periodontal es una patología que afecta los tejidos de soporte de los dientes (Hueso, ligamento periodontal y encía); es una patología infecciosa de origen multifactorial, clasificándose en dos tipos, gingivitis y periodontitis. La gingivitis implica solo la inflamación de la encía sin la afectación de los tejidos de inserción del diente, hay que destacar que cuando la gingivitis no es tratada a tiempo evoluciona a periodontitis, que es un proceso inflamatorio e infeccioso que lesiona los tejidos de sostén (periodonto) de los dientes. ¹⁴

CLASIFICACIÓN DE LAS ENFERMEDADES PERIODONTALES

Para poder entender las causas, patogénesis y lesiones de las enfermedades periodontales, la Academia Americana de Periodoncia, ha establecido una clasificación para el conocimiento de estas mismas:

1. Enfermedades de las encías:
 - Enfermedades gingivales inducidas por placa
 - Lesiones gingivales no inducidas por placa
2. Periodontitis crónica
 - Localizada
 - Generalizada ⁶

CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS DE LA GINGIVITIS Y PERIODONTITIS

Es necesario enfatizar que la gingivitis no siempre precede a la periodontitis, sugiriendo que estas condiciones no siempre representan los cuatro diferentes estadios histopatológicos de la enfermedad.¹⁵

Primeramente tenemos a la lesión inicial, corresponde a los tejidos gingivales clínicamente saludables; vasodilatación, permeabilidad vascular ligeramente elevada y migración de leucocitos, especialmente neutrófilos a través del tejido conjuntivo; luego la lesión temprana o también llamada gingivitis temprana; existe un aumento en la permeabilidad vascular, vasodilatación, fluido crevicular, infiltración de leucocitos; neutrófilos y linfocitos; degeneración de fibroblastos y

destrucción de colágeno; después es la lesión establecida, presencia de infiltrado celular inflamatorio (células plasmáticas, linfocitos y neutrófilos), acumulación de células inflamatorias en el tejido conjuntivo, elevada liberación de metaloproteinasas de la matriz, agotamiento de colágeno y formación de epitelio de la bolsa que contiene gran número de neutrófilos; finalmente la lesión avanzada, es la transición de gingivitis a periodontitis, se ha identificado predominio de neutrófilos en el epitelio de la bolsa, infiltrado celular inflamatorio de los tejidos conjuntivos, migración apical del epitelio de unión, degradación de colágeno y reabsorción osteoclástica del hueso alveolar.⁶

GINGIVITIS INDUCIDA POR PLACA

La gingivitis inducida por placa es la inflamación de la encía debido a los efectos de los depósitos de biofilm que la irritan e inflaman; las bacterias y sus toxinas afectan los tejidos blandos, es reversible, pero si no es tratada puede evolucionar a periodontitis crónica.¹⁶ Así mismo sus signos incluyen inflamación, sangrado y agrandamiento gingival.¹⁷

PERIODONTITIS CRÓNICA

La periodontitis crónica es una enfermedad infecciosa de origen multifactorial que causa la inflamación de los dientes, pérdida de inserción periodontal y de hueso alveolar; y formación de bolsas periodontales. Por otra parte, de acuerdo a su distribución se describe como *localizada*, cuando menos del 30% de los sitios valorados en boca muestran pérdida ósea o de inserción; y se considera

generalizada cuando más del 30% de las superficies en boca se encuentran afectadas.

La gravedad de la periodontitis crónica se describe como leve cuando no hay más de 1 a 2 mm de pérdida de inserción, moderada cuando existe más de 2 a 4 mm de pérdida de inserción y severa cuando hay destrucción periodontal de 5 mm o más de inserción clínica. ⁶

FISIOPATOLOGÍA DE LA ENDOCARDITIS INFECCIOSA

La endocarditis infecciosa se ha relacionado con dos mecanismos; el primero consiste en la presencia de una lesión en el endotelio vascular, posteriormente por la adherencia de bacterias y su desarrollo. La lesión vascular inicia cuando el subendotelio se pone en contacto con la sangre, activando la cascada de coagulación, quedando expuesta fibrina, fibrinógeno y otras proteínas plasmáticas que favorecen la unión de bacterias transitorias; que desencadenan la activación de monocitos con liberación de citocinas que llevan a mayor daño tisular.

Respecto de la asociación de producción de coágulos infectados y la respuesta de citocinas, producen la colonización bacteriana y producción de vegetaciones; el crecimiento de éstas se relaciona con la extensión local y a los tejidos; la afectación a órganos de distancia como el riñón, bazo y cerebro, es secundario al desprendimiento de vegetaciones sépticas. ¹⁸

FACTORES DE RIESGO EN LA ENFERMEDAD PERIODONTAL Y ENDOCARDITIS BACTERIANA

MEDIO AMBIENTE. Los diversos microambientes de la boca, tales como superficies mucosas, surco gingival, saliva y la estructura dentaria presentan las condiciones de humedad, temperaturas, ph y disponibilidad de nutrientes, óptimas para que diversas especies microbianas puedan empezar a colonizar. En particular el esmalte es cubierto por glicoproteínas, glicolípidos, proteínas y lípidos que permiten la adherencia y el inicio del proceso de colonización. ¹⁹

ESTILOS DE VIDA. El modelo de vida se compone de comportamientos y hábitos que hacen referencia a las costumbres; algunos pueden ser factores protectores, promotores de la salud o de riesgo. Una deficiente higiene bucal trae como consecuencia acumulaciones de placa dentobacteriana; relacionada con el desarrollo de gingivitis y periodontitis; nutrición inadecuada, el hábito de fumar, pobreza y cultura de la salud bucal son variables relacionadas con el estilo de vida. Así mismo influye la limitada disponibilidad y accesibilidad de los servicios de salud en cuanto a cantidad y calidad de los recursos utilizados para satisfacer las demandas y necesidades de la población ^{4, 20}

BIOLOGÍA HUMANA. Incluye los aspectos físicos y mentales que conforman el comportamiento humano, tales como la herencia genética, maduración y envejecimiento; junto con las características de los diferentes sistemas del cuerpo (nervioso, endócrino, digestivo). ²¹

Actualmente, se ha encontrado que el conocimiento de la existencia de polimorfismos genéticos en el sistema inmune del huésped, actúan como genes codificadores de la enfermedad y por lo tanto como factor de riesgo para la enfermedad periodontal crónica; los polimorfismos de los genes que lo codifican son la interleucina 1 (IL-1) y factor de necrosis tumoral ($TNF-\alpha$); esto es que en el tejido periodontal se encuentra en niveles elevados a diferencia del sano; actúan como mediadores inmunológicos con propiedades pro-inflamatorias; estimulando la resorción ósea y proliferación de fibroblastos gingivales y del ligamento periodontal.²²

HIGIENE BUCAL DEFICIENTE Y DESARROLLO DE LA PLACA DENTOBACTERIANA (VS BIOFILM)

La higiene bucal es el hábito de lavarse los dientes o mantener aseada la cavidad bucal después de consumir cualquier alimento, sin embargo, al llevarse a cabo de forma inadecuada, o simplemente no cepillarse los dientes, determina el desarrollo de placa dentobacteriana; también llamada biopelícula o biofilm; definida como una masa blanda, tenaz y adherente de colonias bacterianas que se encuentran en la superficie de los dientes y otras estructuras bucales; debido a su dureza de la matriz extracelular, hace que sea posible su remoción.²³

Por lo tanto, la placa se diferencia de la materia alba y el cálculo; primeramente comienza con acumulaciones blandas de alimentos y células del tejido que carecen de una estructura organizada, por lo tanto son desplazadas fácilmente

con el agua; sin embargo el cálculo se caracteriza por tener en su estructura un depósito maduro formado por la mineralización de la placa dental.⁶

FORMACIÓN DE LA PLACA

La placa se define como una comunidad microbiana, caracterizada por células adheridas a un sustrato, se divide en tres fases; primero comienza con la formación de la película, compuesta por una capa densa de microorganismos que conforman una matriz de polisacáridos con otros materiales orgánicos e inorgánicos; por lo que las bacterias que se adhieren no entran en contacto con el esmalte, sino que interactúan con la película adquirida; ^{24, 9, 6} después con la adhesión inicial y fijación de bacterias, se lleva a cabo a través de la interacción de “adhesinas” en la superficie de células microbianas y los receptores en la película salival que determinan si una célula bacteriana permanecerá asociada con la superficie; además la colonización bacteriana en el diente debe tener un transporte inicial de la bacteria a la superficie dental, para establecer una adhesión inicial reversible de la bacteria y finalmente la maduración de la placa, estableciendo un anclaje firme entre la bacteria y la superficie; es decir, transita de una forma reversible a irreversible; ⁶

En síntesis, las bacterias colonizadoras primarias adheridas a la superficie del diente proporcionan nuevos receptores de unión a otras bacterias, denominado también como coadhesión; junto con el crecimiento de microorganismos adherentes, la coadhesión lleva al desarrollo de colonias y formación de una película madura. ⁹

FASES DE COLONIZACIÓN

La cavidad bucal es un ecosistema poblado por microorganismos, los cuales tienen mecanismos adaptativos y sitios que facilitan su adhesión; inmediatamente después de la limpieza en boca, las macromoléculas hidrófobas comienzan a adsorberse a la superficie, para formar la película adquirida, compuesta por glucoproteínas salivales (mucinas) y anticuerpos; que a su vez aumentan la adhesión bacteriana.^{25, 9}

En cuanto a la *colonización primaria*, es dominada por cocos gram positivos anaerobios facultativos, compuesta principalmente por estreptococos; *Streptococcus sanguinis, mitis*; posteriormente bacilos del género de los *Actynomyces*; en efecto los receptores de superficie gram positivos permiten la adherencia de microorganismos gram negativos.⁹ Así mismo los colonizadores secundarios tales como *Prevotella intermedia, Prevotella loescheii, Fusobacterium nucleatum*, y *Porphyromonas gingivalis*; se adhieren a las bacterias que se encuentran en la masa de la placa madura.⁶

SISTEMA INMUNOLÓGICO

El término inmunidad se refiere a la protección del hospedero contra una enfermedad infecciosa, incluyendo sustancias extrañas; microorganismos y macromoléculas; tales como proteínas y polisacáridos; que son capaces de provocar lesiones tisulares y enfermedades sistémicas. Además, la defensa frente a los microorganismos esta mediada por las reacciones tempranas de la inmunidad innata y las respuestas tardías de la inmunidad adaptativa.²⁶

INMUNIDAD INNATA

Los microorganismos que conforman la enfermedad periodontal crónica son esenciales para el desarrollo de la endocarditis infecciosa, sin embargo la extensión y la gravedad dependen de las interacciones huésped-microbio; la inmunidad innata juega un papel importante ya que es activado de forma rápida y es responsable de la defensa durante horas y días iniciales de la infección.⁶

El sistema inmune innato representa la primera línea de defensa del huésped, constituye la respuesta a la invasión microbiana; y actúa para contener la infección a través de la fagocitosis, activación de citoquinas y muerte microbiana.²⁷

Por lo que se refiere a las células que interactúan son monocitos/macrófagos, neutrófilos, linfocitos NK y células dendríticas que expresan receptores de reconocimiento de patrones (PRR) como son los receptores tipo toll (TLR) que reconocen estructuras de los microorganismos invasores; denominados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP); que se encuentran en la superficie bacteriana; en particular, la interacción entre sus respectivos ligados inducen la respuesta inflamatoria.²⁸

BIOFILM PERIODONTAL

Las bacterias, como causas necesarias en el modelo multicasual de Rothman, desempeñan un papel importante en la iniciación y perpetuidad de la enfermedad periodontal; que a su vez inducen la destrucción de las estructuras de soporte de los órganos dentarios; este proceso invasivo es propagado en conjunto con la

interacción de las células del huésped.^{29, 30} Así mismo, la placa dental es un biofilm que se encuentra implicado con la enfermedad periodontal; ya que los biofilms no calcificados tienen el potencial de calcificar el cálculo dental.³¹

En la periodontitis podemos identificar microorganismos gram negativos; *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Forsythus*, *Prevotella Intermedia* y *Peptostreptococcus*.

32

PERIODONTITIS COMO CAUSALIDAD DE ENDOCARDITIS INFECCIOSA

La endocarditis infecciosa es una infección endovascular de origen bacteriano que afecta estructuras intracardíacas, la lesión inicial presenta la característica principal de formación de vegetaciones que se localizan en una o más válvulas cardíacas, afectando tejidos adyacentes; tales como cuerdas tendinosas, endocardio, miocardio y pericardio.^{33, 34}

Entre los factores de riesgo asociados a la endocarditis infecciosa se encuentra la enfermedad periodontal crónica, debido a la exacerbación directa de las bacterias de la cavidad oral y la inflamación; representando un foco de infección que incrementan los niveles circulantes de macromoléculas inflamatorias del huésped.³⁵

Por otra parte se considera un riesgo de desarrollar la endocarditis infecciosa a los procedimientos odontológicos invasivos como son la manipulación del tejido gingival, periapical o alteración de la mucosa oral, extracciones dentales, raspado

y curetaje, cirugía periodontal, endodoncias e incluso el uso de implantes dentales; los cuales podrían ser un riesgo debido al material de la interfaz entre la cavidad bucal y la sangre.^{36, 37}

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA ENDOCARDITIS INFECCIOSA

En el transcurso del desarrollo de la endocarditis infecciosa se tienen diversos síntomas y signos, tales como destrucción de la válvula e insuficiencia cardiaca, fiebre, sudoración nocturna, pérdida de peso, daño embólico de órganos (cerebro, pulmones, bazo y riñones) y formación de inmunocomplejos que conduce a vasculitis, artritis y daño renal.

Otros signos que incluyen Petequias; pequeños y rojos con un centro pálido en la faringe y conjuntivas o también conocidas como manchas de Roth, cuando se encuentran en la retina; nódulos de Osler; que son inflamaciones subcutáneas caracterizadas por una consistencia dura y dolorosas en las manos y pies; lesiones de Janeway; máculas pequeñas, planas, rojas, indoloras y palidez debido a la anemia.³⁸

CRITERIOS DE DUKE MODIFICADOS

Criterios mayores: hemocultivos positivos de dos microorganismos separados; *Streptococcus viridans*, *S. bovis*, *S. aureus*, *Staphylococcus aureus* o *Enterococcus*; evidencia de afectación endocárdica; al menos dos hemocultivos positivos de muestras sanguíneas tomadas con un intervalo de >12 horas, ecocardiograma positivo.

Criterios menores: cardiopatía predisponente o adicción a droga parenteral, fiebre >38 C, fenómenos vasculares; émbolos en arterias mayores, infartos pulmonares sépticos, hemorragia conjuntival y lesiones de janeway; e inmunológicos; glomerulonefritis, nódulos de osler, manchas de Roth y factor reumatoide; hemocultivo que no cumplen criterios mayores: positivos, excluyendo un solo hemocultivo con *Staphylococcus coagulasa* negativo y gérmenes no asociados a endocarditis infecciosa.³⁹

Finalmente, para los criterios clínicos de la detección de un diagnóstico definitivo de endocarditis infecciosa se basan en dos mayores, un mayor y tres menores; o cinco menores (Cuadro N. 1).³⁷

TRATAMIENTO DE ENDOCARDITIS INFECCIOSA

El éxito del manejo de la endocarditis infecciosa se basa en la supresión de los microorganismos con fármacos antimicrobianos, actualmente existe evidencia del incremento de la resistencia bacteriana en penicilinas y macrólidos en cepas de *Streptococcus*.

El tratamiento antibiótico en pacientes adultos durante dos semanas: Penicilina G 12-18 millones U/día i.v. en 4-6 dosis o continuamente, Amoxicilina 100-200 mg/kg/día i.v. en 4-6 dosis. En pacientes pediátricos Gentamicina 3 mg/kg/día i.v. o i.m. en 1 dosis o 3 dosis divididas a partes iguales.^{33, 37}

Definición de endocarditis infecciosa según los criterios de Duke modificados

El definida

Criterios patológicos

Microorganismos demostrados por cultivo o en un examen histológico de una vegetación, vegetación que se ha embolizado.

Lesiones patológicas vegetación o absceso intracardiaco, confirmado con examen histológico que muestra endocarditis activa

Criterios clínicos

2 criterios mayores

1 criterio mayor y tres criterios menores o

5 criterios menores

El posible

1 criterio mayor y 1 criterio menor o

3 criterios menores

El descartada

Diagnóstico alternativo firme o

Resolución de los síntomas de EI con tratamiento antibiótico \leq 4 días o

Ausencia de evidencia patológica de EI en la cirugía o necropsia con tratamiento antibiótico \leq 4 días o

No se cumplen los criterios de posible EI ya indicados

EI: endocarditis infecciosa

Fuente Guía ESC 2015 sobre el tratamiento de la endocarditis infecciosa. Rev Esp Cardiol 2016; 69(1):69.e1-e49.

Criterios de Duke modificados, para su clasificación diagnóstica de la endocarditis infecciosa; dividiéndose en definida, posible y descartada.

2. *Streptococcus sanguinis*: enfermedad periodontal y endocarditis bacteriana.

Se considera que las bacterias son la principal causa necesaria de la enfermedad periodontal, se estima que más de 500 especies son capaces de colonizar la boca y en condiciones patológicas pueden causar lesiones en cavidad oral.³⁵ Así mismo la microflora subgingival abarca ciento de especies bacterianas, pero solo una pequeña parte se ha asociado con el progreso de la enfermedad; para fines de esta investigación enfatizaremos en los microorganismos de la periodontitis crónica; conformada por microorganismos gram negativos; especialmente *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Forsythus*, *Prevotella Intermedia* y *Peptostreptococcus*.

32

Por otra parte diversas bacterias de la placa dentobacteriana han demostrado su patogenicidad a través de la producción de productos tóxicos que destruyen los tejidos periodontales.⁴⁰ Es precisamente la asociación de estas bacterias con la endocarditis infecciosa como son los cocos gram positivos; particularmente los *Streptococcus* del grupo *viridans* como son *S. sanguis*, *mitis* y *mutans*; y *Staphylococcus aureus*. Dentro de los gram negativos *A. actinomycetemcomitans* y *E. corrodens*; no obstante, el efecto de éstos incrementa en presencia de la enfermedad periodontal crónica.⁴¹

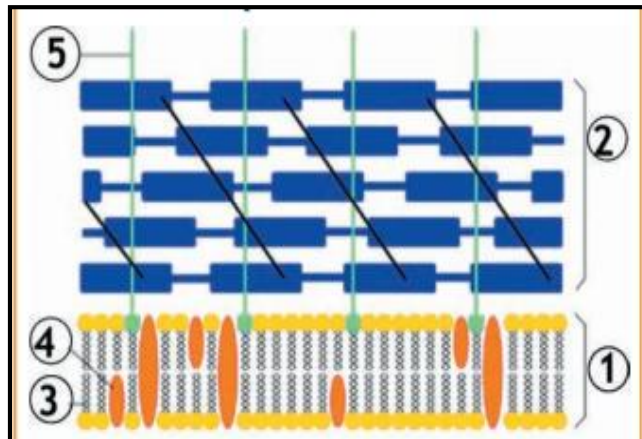
Recientemente, se ha demostrado que los microorganismos presentes en la bolsa periodontal producen mediadores inflamatorios; tales como es el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 β , prostaglandinas E2, interferón y la proteína C reactiva; ⁴² enzimas citolíticas y endotoxinas; peptidoglicano, lipopolisacárido, entre otros. En consecuencia se produce ulceración del epitelio de las bolsas periodontales, permitiendo el paso de bacterias a través de tres mecanismos: En primer lugar la *Infección metastásica o bacteriemia*, los microorganismos entran al torrente sanguíneo y se diseminan; después el *daño metastásico*, por endotoxinas liberadas para las células; y para terminar la *inflamación metastásica*, por las reacciones antígeno-anticuerpo y la liberación de mediadores químicos. ⁴¹

Uno de los microorganismos con mayor interés es ***Streptococcus sanguinis***; inicial colonizador primario de la placa dentobacteriana; relacionándose con la principal causa de la endocarditis infecciosa ya que es capaz de activar la respuesta inmune del huésped por medio de sus factores de patogenicidad y virulencia, ⁴³ la presencia de ácido lipoteicoico y producción de polisacáridos extracelulares favorecen la adherencia a las válvulas cardiacas en la endocarditis.

⁴⁴ Es una bacteria anaerobia facultativa, gram positiva y se conforma por una pared celular; ⁴⁵ esta última característica se encarga de proteger la integridad anatomo-fisiológica y soportar la presión osmótica interna; la ausencia de esta estructura condicionaría a la destrucción del microorganismo. ⁴⁶

La pared celular de *S. sanguinis*; está formada por **peptidoglicanos**, además de ácidos teicoicos que se encuentran conformados por polímeros de ribitol-fosfato, los cuales unirán al N acetil-murámico, estabilizando a la pared celular; por fuera del peptidoglicano existe una cubierta de proteínas y los ácidos lipoteicoicos que por su proporción lipídica se unen de forma hidrófoba a la membrana y la porción glicerol -fosfato de la pared celular (Figura N. 1).⁴⁷

Figura N.1. Composición de la envoltura celular de bacteria gram positiva.



Fuente: Mora X. Diferenciando bacterias gram gram+ y gram -. Selecciones avícolas 2012. Estructura de la pared celular de bacterias gram positivas, 1) membrana citoplasmática, 2) peptidoglicano uno de los principales constituyentes de la pared celular, 3) fosfolípidos, 4) proteínas y 5) ácido lipoteicoico.

PATRONES MOLECULARES ASOCIADOS A PATÓGENOS (PAMPs)

En cuanto a las bacterias de la enfermedad periodontal crónica ingresan al torrente sanguíneo; las células del sistema inmune reconocen su presencia y señalan respuestas inmunes protectoras.⁶ No obstante el primer reconocimiento de los patógenos invasores es mediado por los receptores de reconocimiento de patrón (PRR), se han identificado diferentes clases; siendo los más importantes para el reconocimiento de este microorganismo los receptores tipo Toll, receptores tipo NOD y los sensores de DNA citosólico.

En cuanto a éstos receptores, son activados por moléculas microbianas; los llamados patrones moleculares asociados a microbios (PAMP), factores de virulencia microbiana, moléculas endógenas liberadas después de daño tisular.²⁷

Por lo tanto, los PAMP son carbohidratos bacterianos, tales como el **peptidoglicano** y ácido lipoteicoico en bacterias gram positivas; lipopolisacárido de bacterias gram negativas, ácidos nucleicos de origen bacteriano o viral; ácido desoxirribonucleico y ácido ribonucleico; péptido bacteriano; flagelina; y lipoproteínas. Hay que tener en cuenta que la unión de sus ligandos PRR activa una cascada de señales intracelulares que da como resultado la secreción de citosinas (Cuadro N. 2).⁴⁸

Cuadro 2. Señales de activación intracelular generados por los TLR unidos a sus ligados.

RECEPTOR	LIGADO
TLR-1	Lipoproteína bacteriana triacilada
TLR-2	Peptidoglucano (bacterias gram positivas), ácido lipoteicoico
TLR-3	ARN de cadena doble
TLR-4	Lipopolisacárido (bacterias gram negativas)
TLR-5	Flagelina bacteriana
TLR-6	Lipoproteína bacteriana diacilada
TLR-7	ARN de cadena simple
TLR-8	ARN de cadena simple
TLR-9	CpG, ADN bacteriano (no metilado)
TLR-10	Desconocido
TLR-11	Bacterias uropatogénicas

ADN: ácido desoxirribonucleico; ARN: ácido ribonucleico; CpG: oligodesoxinucleótidos con secuencias citosinas fosfodiesterasa- guanina. TLR: receptores tipo Toll.

Fuente Sociedad inmunología comunidad de Madrid 2013. Cada uno de los receptores tipo Toll detectan distintos patrones moleculares asociados a microbios (PAMP), que pueden derivar de bacterias, hongos o parásitos.

RECEPTOR TIPO TOLL

Los receptores semejantes a Toll fueron los primeros PRR identificados; son los más caracterizados y reconocen una amplia gama de PAMPs; son proteínas transmembrana tipo I y comprende un ectodominio rico en Lucina que median el reconocimiento de PAMPs.

Cada TLR detecta distintos PAMPs derivados de virus, bacterias, micobacterias, hongos y parásitos; estas incluyen lipoproteínas (reconocidas por TLR1, TLR2 y TLR6), RNAbicatenario (TLR3), lipopolisacárido (TLR4), flagelina (TLR5), RNA monocatenario (TLR7 y TLR8) y DNA. ⁴⁹

Las bacterias gram negativas han sido microorganismos asociados con mayor frecuencia en la sepsis, sin embargo los gram positivos; ***S. sanguinis***; han aumentado en los últimos años. El lipopolisacárido es el componente mayoritario de la pared celular de bacterias gram negativas, mientras que el **peptidoglicano (PGN)** es el principal componente de las bacterias gram positivas; éstos PAMP son reconocidos en el primero a través del TLR4 y en el segundo; **TLR2** respectivamente. ⁵⁰

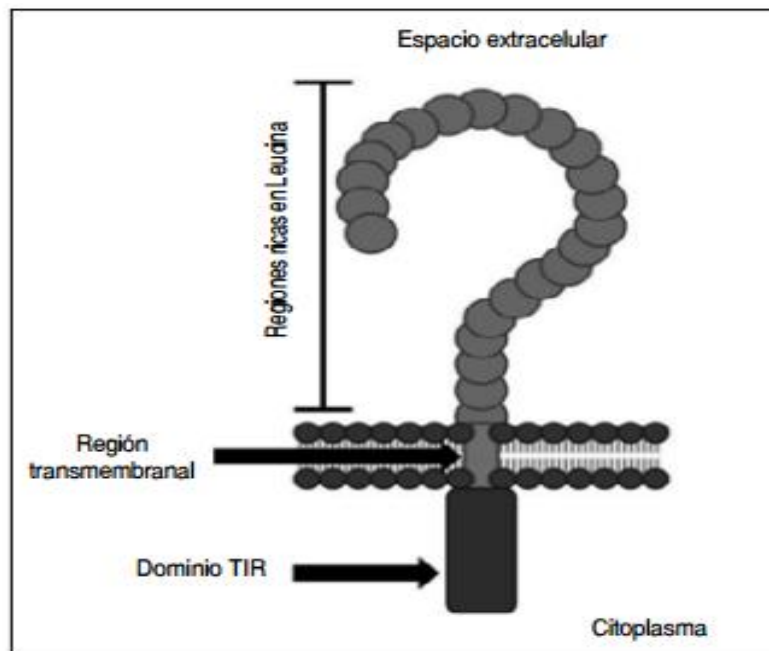
ESTRUCTURA

Los TLRs son proteínas transmembranales tipo 1 que contienen entre 19 y 25 motivos ricos en repeticiones de leucinas (LRRs) en su ectodominio, una región transmembranal y una porción intracitoplasmática con dominios TIR (Toll/receptor de IL1) que inician la señalización intracelular (Figura N. 2).

En cuanto a su localización y el tipo de ligandos estos receptores se dividen en dos grupos: los TLRs de membranas citoplasmáticas (TLRs 1, 2, 4, 5, 6 y 10) y los de membranas endosomales (TLRs 3, 7, 8 y 9). ⁵¹

TLR 2: reside sobre la membrana plasmática donde responde a PAMP que contienen lípidos, tales como **peptidoglicano**, ácido lipoteicoico y lipopéptidos que contienen cisteína di y tri acilados, mediante la formación de complejos con TLR1 ó TLR6 en la membrana del plasma. La estructura TLR2/TLR1 y TLR2/TLR6 con sus ligados lipopeptídicos han estado determinados para facilitar la cristalización y determinación de la estructura de LRR. ⁵

Figura N.2. Estructura general de los receptores tipo Toll



Fuente: Vadillo E. RIC 2012. Los TLRs poseen una región extracelular rica de repeticiones de leucina (LRRs) a través de la cual reconoce sus ligados específicos; una región transmembranal y una región intracelular en donde se localiza el dominio TIR. Dependiendo del ligado reconocido, el dominio TIR reclutará a una proteína adaptadora para la transducción de señal.

VÍAS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR

La señalización de TLR se describe en la activación de la familia IRF (Factor regulador de IFN) de factores de transcripción y NF- κ B, llevando a la expresión de genes inflamatorios de respuesta temprana.⁶

En cuanto a la vía de los TLR, se origina en el dominio TIR como resultado del reclutamiento de sus adaptadores; MyD88, TRIF, Mal/TIRAP Y TRAM; una vez activados proporcionan ramas de transducción de señal, permitiendo la interacción con otras vías; en particular con la vía de la MAP quinasa.⁴⁸

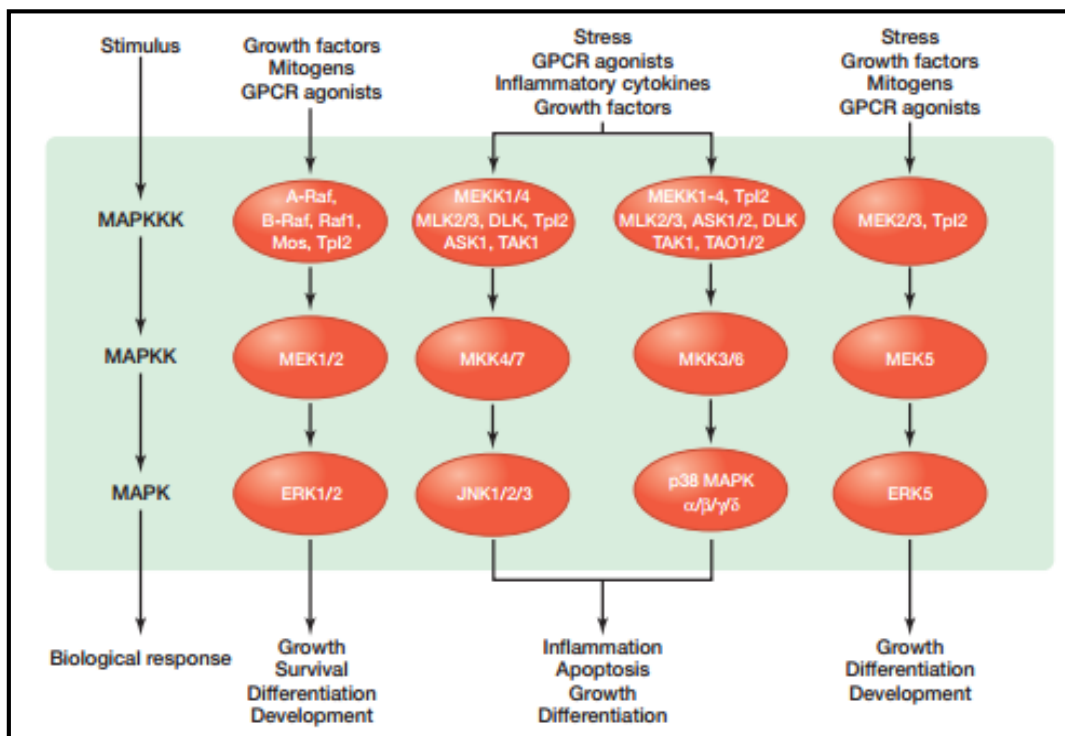
PROTEÍNAS CINASAS ACTIVADAS POR MITÓGENOS (MAPKs)

Las quinasas son un grupo de proteínas con actividad enzimática que transfieren grupos fosfato desde moléculas donadoras; como es el ATP; a sustratos específicos; a este proceso se le conoce como fosforilación.⁵³

Las MAPK constituyen una familia serín/treonin quinasas activadas por factores de crecimiento, apoptosis, procesos inflamatorios y estrés; estas proteínas desempeñan un papel importante en la transducción intracelular de señales, permitiendo a la célula integrar diferentes estímulos extracelulares. Cada subfamilia de MAPK está compuesta por un módulo de señalización de tres quinasas; la MAPK quinasa quinasa activa a la MAPK quinasa, que a su vez activa a la MAPK por fosforilación (Figura N. 3).⁵⁴

Las MAPK se pueden agrupar en tres familias principales: ERK 1/2; señal extracelular regulada por quinasas; JNK; c-Jun-N-cinasa terminal; y p38; proteína quinasa activada por estrés. ⁵⁵ El primer grupo responde a los factores de crecimiento y mitógenos para inducir el crecimiento celular y diferenciación; el segundo se activa por tensiones como son la radiación ionizante, calor, estrés oxidativo, daño al DNA y citocinas inflamatorias como factores de crecimiento; y por último la familia p38 es activado por tensiones ambientales y citocinas inflamatorias. En conjunto, juegan un papel importante en la apoptosis, inflamación, metabolismo y producción de citocinas. ⁵⁶

Figura N.3 Vía de las MAPKS.



Fuente: Morrison KD. MAP Kinase Pathways 2012. La MAPKKK fosforila y activa directamente la MAPKK, que a su vez activa la fosforilación de MAPK, una vez activado el MAPK fosforila diversos sustratos en el citosol y el núcleo para producir cambios en la función de las proteínas y expresión genética que ejecuten la respuesta biológica apropiada.

3. Tratamiento de las infecciones ocasionadas por *Streptococcus sanguinis*.

FLAVONOIDES

DEFINICIÓN

Flavo proviene del latín flavus y significa de color entre amarillo y rojo; y flavonoide se refiere a un grupo aromático, pigmentos heterocíclicos que contienen oxígeno ampliamente distribuido en las frutas rojas como zarzamoras, fresas, frutas cítricas, chocolate, nueces, vino tinto y plantas medicinales.^{57, 58}

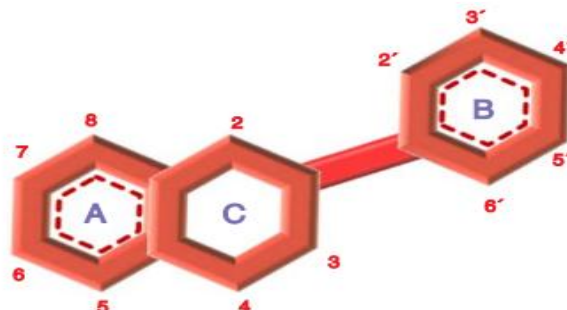
ESTRUCTURA Y CLASIFICACIÓN

Los flavonoides son sustancias de bajo peso molecular, procedentes del metabolismo secundario de las plantas a través de la ruta de los policétidos que sintetiza el anillo A, y por la ruta del ácido shikímico que sintetiza el anillo B y la unidad C de los flavonoides (Figura N.4).^{58, 59}

Tienen un sistema $C_6-C_3-C_6$, con una funcionalidad fenilbenzopirano, venzo- γ -pirona, que consistente en un anillo fenólico y un anillo pirano, que se clasifican de acuerdo a su constitución.⁵⁸

Los flavonoides se dividen en antiocianinas y antoxantinas; las primeras son moléculas que poseen pigmentos de color rojo, azul y morado; las segundas son moléculas incoloras o de color blanco a amarillo y a su vez se dividen en flavonas, flavonoles, flavanonas e isoflavonoides (Cuadro N.3).⁶⁰

Figura N.4 Estructura química del flavonoide.



Fuente: Escamilla JC. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. Rev Fac Med UNAM 2009. Los flavonoides sintetizan el anillo A, el anillo B y la unidad C.

Cuadro N. 3 Clasificación de los flavonoides.

Nombre	Descripción	Ejemplo
Antocianidinas	Tiene un grupo –OH unido en posición 3, pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.	Antocianidina
Flavanoles	Con un grupo-OH en posición 3 del anillo C.	Catequina
Flavonas	Poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3.	Diosmetina
Flavonoles	Grupo carbonilo en posición 4 y un grupo –OH en posición 3 del anillo C.	Quercitina
Isoflavonas	Tienen el anillo B en la posición 3 del anillo C.	Daidzeina

Fuente: Amaya RM. El salvador; universidad del salvador: 2013. De acuerdo a su estructura química, los flavonoides tiene un anillo fenólico y uno pirano; de los cuales va depender su clasificación de los cinco grupos: antocianinas, Flavanoles, flavonas, flavonoles e isoflavonas.

METABOLISMO

Los flavonoides forman parte del grupo de los polifenoles que se localizan en los alimentos; sin embargo su biodisponibilidad con respecto a la cantidad de nutrientes que se digieren, absorben y metabolizan; no son los más activos en el organismo ya sea por su baja absorción en el intestino, por ser altamente metabolizados o acelerada excreción.⁶¹

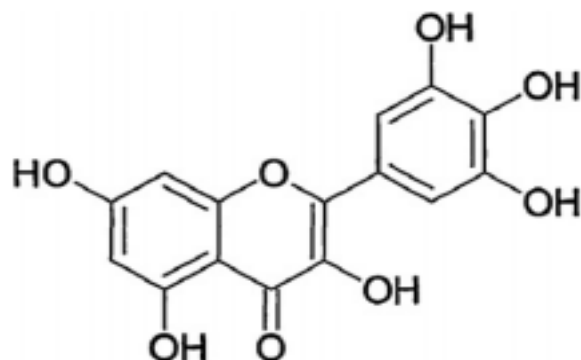
Las dosis de flavonoide determinan el sitio primario del metabolismo, en dosis elevadas se metaboliza en el hígado, mientras que en dosis inferiores se da en la mucosa intestinal. Además los metabolitos glucurono- y sulfo-conjugados producidos a nivel hepático son excretados por vía biliar, como se ha observado en estudios realizados en la preparación de hígado de ratas aislado y perfundido.

62

MIRICETINA

Es un flavonoide del grupo de flavonoles; derivado de vegetales, nueces, frutas y té; por primera vez se aisló a finales del siglo XVIII de la corteza de *Myrica nagi* Tunb; cosechado en la india como luz de cristales color amarillo; el aislamiento fué principalmente por el interés en la propiedad de teñido del compuesto, mejor caracterizado en un estudio de Pekin; encontrando que miricetina produce un floroglucinol y ácido gálico en hidrólisis que sirvió para confirmar su estructura química,^{63, 64} presenta sustituciones hidroxilo en las posiciones 3-, 5-, 7-, 3'-, 4'- y 5'- (Figura N. 5).⁶⁵

Figura 5. Estructura química de miricetina.



Fuente: Food Science and Human Wellness 2012. La miricetina un flavonoide de origen natural con grupos hidroxilo en las posiciones 3, 5, 7, 3', 4' y 5'.

PROPIEDADES BIOLÓGICAS

Los flavonoides han despertado recientemente considerable interés, debido a sus efectos benéficos potenciales sobre la salud humana; se ha reportando una gran variedad de propiedades biológicas; tales como antiinflamatorios, anticancerígenos y antioxidantes; ayudando a reducir el estrés oxidativo que ha estado relacionado con la inflamación, cáncer, aterosclerosis, lesión isquémica y enfermedades neurodegenerativas. ^{66, 67} Diversos estudios *in vivo e in vitro*, han demostrado su actividad contra una variedad de ADN polimerasas, ARN polimerasas y quinasas. ⁶⁴

EFECTO PREVENTIVO

En la enfermedad periodontal crónica, la inflamación representa un importante mecanismo de defensa contra muchas condiciones fisiopatológicas ya que se activan diversas formas de citoquinas pro-inflamatorias; por lo cual, es importante enfatizar en el diagnóstico y la prevención con el fin de evitar complicaciones sistémicas, como es el caso de la endocarditis infecciosa. ⁶⁸

Es precisamente tener presente la importancia de la **prevención**; la cual se define según la OMS; como “las medidas destinadas no solamente a prevenir la aparición de la enfermedad, tales como la reducción de factores de riesgo, sino también a detener su avance y atenuar sus consecuencias una vez establecida”. ⁶⁹ Por lo tanto, la identificación de la periodontitis crónica como uno de los factores de riesgo para la endocarditis infecciosa; incrementaría los procesos protectores para la salud general de la población y así mismo tendría un impacto en la prevención de endocarditis infecciosa. ^{70, 71}

Por otra parte se ha demostrado que miricetina tiene un efecto positivo contra la periodontitis crónica ya que atenúa la producción de mediadores inflamatorios, en la activación de $TNF\alpha$; encargada de la producción de citoquinas IL- β , IL-6 y IL-13; ERK1/2, AKT, p38 NF- $K\beta$; y expresión de COX-2. ^{64, 63}

EPIDEMIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL Y ENDOCARDITIS INFECCIOSA; E IMPORTANCIA DE ESTA INVESTIGACIÓN.

Actualmente, la enfermedad periodontal ha incrementado su incidencia, razón por la cual es considerada el segundo problema de salud pública a nivel mundial. Asimismo, es la segunda causa de pérdida de dientes y de otros problemas de salud de menor incidencia como problemas de la articulación tempomandibular, lenguaje, disfunción masticatoria, estado nutricional deficiente; y reducción en la calidad de vida de las personas.⁷⁰

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud alrededor del 15% de los adultos en todo el mundo tienen enfermedad periodontal avanzada, estando afectada el 48% de la población adulta; interfiriendo así las condiciones culturales, sociales, económicas y políticas.⁷¹ En México, la notificación semanal de casos nuevos de enfermedades periodontales ubicó en el octavo sitio a esta enfermedad entre las principales causas de morbilidad.⁷²

Estudios recientes han demostrado que el tratamiento de la periodontitis crónica reduciría el riesgo de endocarditis infecciosa, debido a las proteínas de la fase aguda como son los niveles elevados de la proteína C reactiva y fibrinógeno; que están presentes en pacientes con inflamación o infección, en consecuencia surgió el interés de evaluar el efecto de miricetina en la línea celular H9c2 en la estimulación del peptidoglicano obtenido de *Streptococcus Sanguinis*.

Por lo que la presente investigación plantea una nueva alternativa de tratamiento de la periodontitis crónica, disminuyendo la probabilidad de riesgo para endocarditis infecciosa por medio del uso del flavonoide miricetina y sus propiedades biológicas.

EFICACIA DE LOS ESTUDIOS

La inflamación inducida por periodontitis crónica puede promover el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, tales como endocarditis infecciosa (EI). Kanafani y col. (2002) reportaron hemocultivos positivos en el 77.5% de los casos de EI, de los cuales el 57% fueron por *Streptococcus* del grupo víridans; posteriormente Nakatani et al. (2013) encontraron que la periodontitis crónica era uno de los factores predisponentes, los *S. del grupo víridans* se aislaron en el 52% de los casos.

Se ha encontrado que el 60% de las cepas de *S. Sanguinis* producen dextrano, importante en el desempeño de la patogénesis de EI; ya que es una proteína de unión a fibronectina y el ácido teicoico descritos como factores importantes en la adhesión a la matriz de plaquetas-fibrina de la pared valvular.⁷³ Así mismo *S. sanguinis* es capaz de activar la respuesta inmune debido a su pared celular que se conforma de peptidoglicano, éste PAMP es detectado por receptores tipo toll (TLR); la interacción entre sus respectivos ligados activan vías de señalización que inducen la respuesta inflamatoria.^{43, 44, 47, 48}

Forner et al., observaron en pacientes con periodontitis crónica bacteriemias durante 30 minutos después de mascar chicle, mientras que en pacientes periodontalmente sanos no había bacterias en la muestra de sangre; por otra parte lockhart et al., llevaron a cabo un estudio clínico controlado aleatorizado a doble ciego, demostrando que existe una asociación de la bacteremia producida tras el cepillado dental tanto con mala higiene oral como con el sangrado gingival; estos

resultados sugieren que la prevención de EI debida a bacterias orales debería ir encaminada a mejorar la higiene oral, lo cual reduciría la incidencia de bacteremias.⁷⁴

Se ha reportado que la periodontitis crónica puede producir bacteremia incluso en ausencia de procedimientos dentales; en la extracción dental de 10 a 100%, cirugía periodontal 36 a 88%, limpieza dental del 40%, procedimientos endodónticos del 20%, en donde el 8% de todos los casos de endocarditis infecciosa se asocia con enfermedad periodontal crónica sin previo procedimiento dental.³⁵

Ebersole et al., reportaron significativamente niveles más altos de la proteína C reactiva en pacientes con periodontitis; considerándolo como un marcador de riesgo coronario; así mismo se informó que los niveles elevados de ésta proteína (>3mg/L) e IL-6 eran significativamente mayor en pacientes con periodontitis crónica.³²

Sin embargo el tratamiento de la enfermedad periodontal crónica podría prevenir el desarrollo de endocarditis infecciosa. Se han realizado investigaciones de miricetina (62.5-125 µg/mL); ensayos *in vitro* e *in vivo*; reportando su actividad anti-inflamatoria inducida contra *Porphyromona gingivalis* en células del huésped y previniendo la activación de NF-κB en un modelo de monocitos, en donde se inhibe la secreción de IL-6, IL-8, MMP-3; la producción y niveles de COX-2, iNOS (10 µM), activación de ERK ½, AKT y p38; sugiriendo que miricetina puede actuar como un agente terapéutico para el tratamiento de periodontitis crónica.⁶⁴

En otro estudio se investigó el efecto inhibitorio de miricetina sobre la producción de óxido nítrico (NO) y prostaglandina E₂ (PGE₂), el tratamiento con lipopolisacarido (LPS) aumentó la producción de NO significativamente 6.8 veces ($p < 0.001$); y en la producción de PGE₂ aumentó 3.3 veces en comparación con las células no tratadas, sin embargo la producción de NO y PGE₂ redujo significativamente las células pretratadas con miricetina (25, 20 y 100 μ M).

También se reportó que el tratamiento con LPS aumento significativamente la expresión de iNOS y la proteína de COX-2 en RAW264.7 macrófagos, los resultados sugieren que miricetina disminuyo la producción de NO y PGE₂ por inhibición de la expresión de iNOS y COX-2. ⁶⁸

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La enfermedad periodontal es considerada la segunda enfermedad bucal más prevalente a nivel mundial; seguida de la caries dental. De acuerdo con la OMS alrededor del 48% de la población en todo el mundo presenta enfermedad periodontal crónica.

En México, el Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Patologías bucales (SIVEBAD) ha reportado que el 53% de los habitantes tienen enfermedad periodontal crónica.⁷¹

Por otra parte, estudios epidemiológicos han asociado la periodontitis crónica como un factor de riesgo de endocarditis infecciosa (EI); principalmente durante el sondaje, raspado y alisado radicular, y durante los tratamientos quirúrgicos; en México, la EI alcanza una tasa de mortalidad al año del 40%.

Uno de los microorganismos con mayor interés es el *Streptococcus sanguinis*; dado que es el colonizador inicial de la placa dentobacteriana; el efecto de este microorganismo incrementa en presencia de la periodontitis crónica, estando relacionado con la causalidad de la EI. En efecto, el peptidoglicano al ser un componente de su pared celular es capaz de activar la respuesta inmune del huésped; las células que interactúan; monocitos/macrófagos, neutrófilos, linfocitos y NK; expresan receptores tipo Toll que detectan distintos patrones moleculares asociados a patógenos; la interacción entre ambos induce la activación de diversas vías de señalización.

Estudios recientes proponen el empleo de anti-inflamatorios no esteroideos (AINES) como tratamiento coadyuvante de la enfermedad periodontal crónica; sin embargo entre sus efectos adversos incluyen problemas gastrointestinales y hemorragias, problemas renales y hepáticos, disturbios en el sistema nervioso central, tiempo de coagulación aumentado, daño en médula ósea y reacciones de hipersensibilidad. Por otra parte, se ha demostrado que el uso de componentes naturales, como los flavonoides, presentan diversas propiedades biológicas; antiinflamatorias, anticancerígenas y antioxidantes; y aplicaciones clínicas en cuanto a la regulación de diversas vías de señalización. Por tales motivos surge la necesidad de investigar nuevas alternativas de tratamiento; sobre todo de origen natural; como es el caso de la miricetina y la importancia del diagnóstico por parte del cirujano dentista durante la práctica profesional; para evitar complicaciones sistémicas, como es el caso de la endocarditis infecciosa y la prevención del mismo. Por lo anterior surge la siguiente pregunta:

¿Cuál es el efecto de miricetina en la línea celular H9c2 en la estimulación del peptidoglicano obtenido de *Streptococcus sanguinis*?

HIPÓTESIS

Considerando las propiedades anti-inflamatorias del flavonoide miricetina en la línea celular H9c2, suponemos que este regulará la fosforilación de las MAPKs y expresión de COX-2, en la estimulación del peptidoglicano obtenido de *Streptococcus sanguinis*.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de miricetina en la línea celular H9c2 en la estimulación del peptidoglicano obtenido de *Streptococcus sanguinis*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto de miricetina en la activación de las MAPKs en la línea celular H9c2.
- Determinar la respuesta del peptidoglicano en la expresión de COX-2 en la línea celular H9c2.
- Evaluar el efecto de miricetina en la expresión de COX-2 en la línea celular H9c2.

MATERIAL Y MÉTODOS

TIPO DE ESTUDIO: De acuerdo a Campbell y Stanley; se llevó a cabo un estudio cuasi-experimental, longitudinal y comparativo.

UNIVERSO DE ESTUDIO: El estudio se llevó a cabo en el cultivo celular de cardiomiocitos H9c2, cada uno de los experimentos se realizaron tres veces de forma independiente, las muestras fueron representadas por la cantidad de 1×10^6 células/ensayo por cada pozo; se dividieron en 6 grupos; para evaluar el efecto de miricetina en la vía de las MAPKs cinasas y expresión de COX-2: Grupo 1, control; grupo 2 (estimulado), peptiglicano 10 mg/mL; grupo 3 (tratado), peptidoglicano 10 mg/mL+ 1 μ L de miricetina; grupo 4 (tratado), peptidoglicano 10 mg/mL+ 5 μ L de miricetina; grupo 5 (tratado), peptidoglicano 10 mg/mL+ 10 μ L de miricetina y grupo 6 (tratado), peptidoglicano 10 mg/mL+ 15 μ L de miricetina.

Para evaluar la respuesta del peptidoglicano en la expresión de COX-2 se dividieron en 6 grupos: Grupo 1, control; grupo 2 estimulado (PGN), 0.1 μ L; grupo 3 estimulado, 1 μ L; grupo 4 estimulado, 5 μ L; grupo 5 estimulado, 10 μ L; y grupo 6 estimulado, 15 μ L.

En cada uno de los experimentos se tomaron en cuenta los siguientes criterios:

- *Criterios de inclusión:* Células H9c2 que estuvieron confluentes para ser tratadas.
- *Criterios de exclusión:* Células H9c2 que estuvieran contaminadas

VARIABLES DE ESTUDIO

Variable	Definición	Tipo	Clasificación	Nivel de medición	Categorías
Efecto de miricetina	Miembro de los flavonoides del grupo de flavonoles.	Independiente	cuantitativa	Continua	<ul style="list-style-type: none"> • Antiinflamatorio • sin efecto antiinflamatorio.
Fosforilación de las MAPKs	Se activan en un proceso inflamatorio, encargadas de fosforilar proteínas.	Dependiente	Cualitativa	Nominal	<ul style="list-style-type: none"> • p-ERK (p44/p45) • p-JNK (p54/p46) • p-p38
Expresión de COX-2	Enzima activada por citoquinas pro-inflamatorias	Dependiente	Cuantitativa	Continua	<ul style="list-style-type: none"> • Activa • inactiva
Respuesta del peptidoglicano	Pared celular en bacterias gram positivas.	Dependiente	Cuantitativa	continua	<p>Fosforilación de las MAPKs:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Activa • Inactiva <p>Expresión de COX-2:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Activa • Inactiva

TÉCNICA.

El western blot es una técnica utilizada para la inmunodetección y cuantificación de proteínas específicas, que tiene como objetivo transferir proteínas de geles SDS-poliacrilamida a una membrana absorbente.

Cultivo celular

Línea celular H9c2 obtenida de cardiomiocitos de ratón, crecieron en medio DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal, se encubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂.

Tratamiento celular

Se sembraron cardiomiocitos (1×10^4) en cajas de 6 pozos en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal, hasta que estuvieran confluentes en un 80%, posteriormente se ayunaron en DMEM 2% SBF por 12 horas. Las células se pre-trataron con miricetina 1×10^{-3} M a diferentes concentraciones (1, 5, 10 y 15 mg/mL); durante 30 minutos; y finalmente se adicionó el peptidoglicano 1 mg/mL de acuerdo a las condiciones de cada uno de los 6 grupos. Para los experimentos de MAPKs, las células se encubaron con el peptidoglicano durante 30 min; y para COX-2 durante 6 horas.

Western-Blot.

- Las células H9c2 crecieron en cajas de 6 pozos. Al término del tratamiento se aspiró el medio y se lavaron las células en PBS + 1 mL de Ortovanadato de sodio 0.1 mM; las células se desprendieron con un gendarme, se recuperaron y se colocaron en eppendorf para centrifugarlas a 12 000 rpm, por 10 min. y a 4°C. Posteriormente se resuspendieron en buffer de lisis en 30 µL (0.05 M Tris- HCL, pH7.4, 0.15 M de NaCl, 1 % de Nonidet P-40, 1mM PMSF, 50 µg/mL de aprotinina, 10 µg/mL de Leupetina, 4 mM de ortovanadato de sodio, 1M de fluoruro de sodio y 250 mM de pirofosfato de sodio). Sobre hielo las muestras se sonicaron durante 30 segundos por 30 de amplitud y la proteína se cuantificó por el método de Bradford 595 nm.

- *Electroforesis:* se utilizaron 30 µg para la carga en geles SDS-PAGE al 10%; previamente se desnaturalizaron las muestras a 70 °C durante 5 min.

- *Electrotransferencia:* Al término de la corrida, la muestra se transfirió en membranas PVDF en cámara de transferencia semi-húmeda Bio-Rad, 15 Volts durante 1 hora.

- Posteriormente la membrana se bloqueó durante 1 hora a temperatura ambiente en una solución con leche al 5% en buffer 50 mM Tris; 150 mM cloruro de sodio pH7.5. La membrana se lavó en tres ocasiones por 10 min con buffer de lavado; Trisma 137 mM, NaCl 20mM, Tween y pH 7.8.

- *Detección específica:* La membrana fue encubada con el anticuerpo primario (p-ERK, pp38, pJNK ó COX-2) por 12h a 4°C (1:10,000), y por 1 hora con anticuerpo secundario (anti-ratón IgG, anti-conejo IgG ó anti-cabra IgG) (1:10,000), se hicieron 3 lavados con buffer de lavado.

- *Revelado:* Las membranas se sometieron a revelado por quimi-luminiscencia; el sustrato quimioluminiscente utilizado fué el luminol, exposición de 10 min. y posteriormente se reveló.

Plan de codificación: Una vez clasificadas las variables, fueron codificadas a través del método de asignación numérica con el propósito de facilitar la identificación y localización de cada uno de los datos obtenidos.

Plan de tabulación: Para llevar a cabo la concentración de los datos, las bandas obtenidas en el Western Blot se sometieron a un análisis densito métrico; software DigiltDoc; y cuantificados en formato Excel; el cual permitió exportar los datos al paquete estadístico GraphPad Prisma, versión para Windows.

Para evaluar el efecto de miricetina en la fosforilación de las MAPKs y expresión de COX-2; de los seis grupos tratados, el grupo basal sirvió de referencia para evaluar el punto de corte del efecto de miricetina; *ant-inflamatorio* (menor a 100) y el segundo grupo estimulado con peptidoglicano para el código *sin efecto anti-inflamatorio* (mayor a 100); por tales motivos sólo se registraron los datos de la concentración del flavonoide en los resultados. Anexo 1

Para evaluar la respuesta del peptidoglicano obtenido de *Streptococcus sanguinis* en la expresión de COX-2 en la línea celular H9c2; el grupo control, sirvió de referencia para el criterio activo de ésta enzima; mayor a 100; por tales motivos sólo se registraron los datos de la concentración de PGN en los resultados.

RECURSOS

Material y equipo

Cultivo y tratamiento celular

Incubadora (Nuaire) cajas falco (Corning), cajas de 6 pozos (Corning), campana de flujo laminar (The Barker Company), tubos clínicos, tubos de ensayo, tubos eppendorf, micropipetas y puntas de 10, 100 y 100 μ L (eppendorf), microscopio de objetos invertidos (Olympus CK2).

Western-Blot.

Gendarme (costar), centrifuga (thermo Scientific), micropipetas y puntas de 10, 100 y 100 μ L (eppendorf), sonicador (Ultrasonic Processor), espectrofotómetro (Pharmacia Biotech), baño seco (Bio-Ddnamycs), cámara de electroforesis (GIBCO), fuente de poder para cámara de electroforesis (OWL), cámara de transferencia (Bio-Rad), fuente de poder para la cámara de transferencia (Bio-Rad), orbit Shaker (LB-LINE), potenciómetro (Scine Med), Balanza Sartorius, placas radiográficas.

DISEÑO ESTADÍSTICO

- ✓ Plan de clasificación: Se ordenaron los datos del Western Blot de acuerdo a las variables de interés: Efecto de la miricetina y la respuesta del peptidoglicano en la línea celular H9c2.
- ✓ Procesamiento estadístico propiamente dicho: para evaluar el efecto de miricetina en la activación de las MAPKs; y en la expresión de COX-2 en la línea celular H9c2 en la estimulación del peptidoglicano obtenido de *Streptococcus sanguinis*; se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis.
- ✓ Presentación estadística: Para establecer el efecto de miricetina en sus diferentes concentraciones, los resultados se presentaron en una tabla general de frecuencias y porcentajes; y para la asociación entre el efecto de miricetina y la respuesta del peptidoglicano se utilizó la prueba de Kruskal-wallis; promedio y desviación estándar.

RESULTADOS

De acuerdo al cuadro 4, la frecuencia y porcentaje del efecto de miricetina a diferentes concentraciones; en la fosforilación de las MAPKs y expresión de COX-2, en la línea celular H9c2 en la estimulación del peptidoglicano obtenido de *Streptococcus sanguinis*; en el grupo 1 la frecuencia de actividad anti-inflamatoria fué de (4) 22.22%, el grupo dos de (12) 66.66%, grupo 3 de (15) 83.33% y en el grupo 4 de (16) 88.88%.

Cuadro 4.- Efecto de miricetina en la fosforilación de las MAPKs y expresión de COX-2, en la línea celular H9c2 en la estimulación del peptidoglicano obtenido de *Streptococcus sanguinis*. N=3

CONCENTRACIÓN			Efecto de la miricetina				Total
			Sin efecto anti-inflamatorio		Anti-inflamatorio		
			f	%	f	%	
Uno (1µL)	p-ERK	p44	2	11.11	1	5.55	3
		p42	3	16.66	0	0	3
	p-JNK	p54	3	16.66	0	0	3
		p46	1	5.55	2	11.11	3
	p-p38		2	11.11	1	5.55	3
	COX-2		3	16.66	0	0	3
	Total		14	77.77	4	22.22	18
Dos (5 µL)	p-ERK	p44	0	0	3	16.66	3
		p42	1	5.55	2	11.11	3
	p-JNK	p54	1	5.55	2	11.11	3
		p46	0	0	3	16.66	3
	p-p38		2	11.11	1	5.55	3
	COX-2		2	11.11	1	5.55	3
	Total		6	33.33	12	66.66	18
Tres (10 µL)	p-ERK	p44	0	0	3	16.66	3
		p42	1	5.55	2	11.11	3
	p-JNK	p54	1	5.55	2	11.11	3
		p46	0	0	3	16.66	3
	p-p38		0	0	3	16.66	3
	COX-2		1	5.55	2	11.11	3
	Total		3	16.66	15	83.33	18
Cuatro (15 µL)	p-ERK	p44	0	0	3	16.66	3
		p42	0	0	3	16.66	3
	p-JNK	p54	0	0	3	16.66	3
		p46	0	0	3	16.66	3
	p-p38		1	5.55	2	11.11	3
	COX-2		1	5.55	2	11.11	3
	Total		2	11.11	16	88.88	18

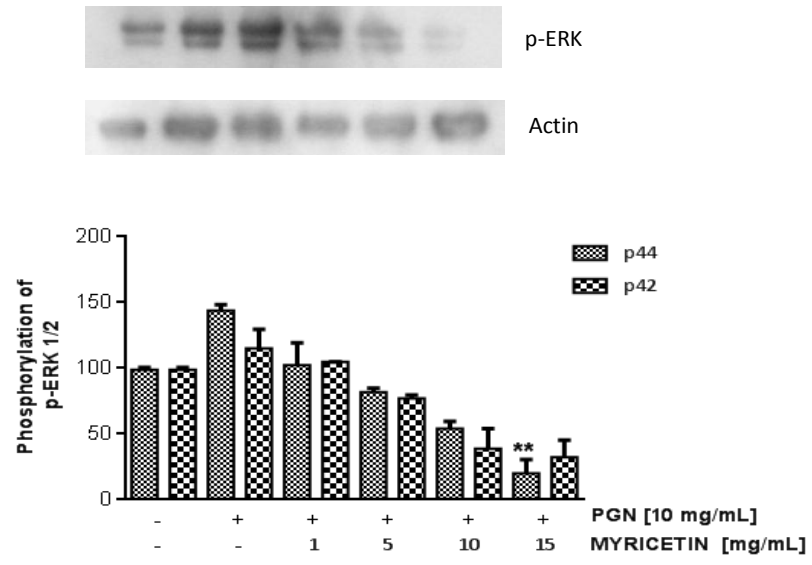
De acuerdo al cuadro 5, el efecto de miricetina en la fosforilación de las MAPKs en la línea celular H9c2 en la estimulación del peptidoglicano obtenido de *Streptococcus sanguinis*, el flavonoide presentó un efecto anti-inflamatorio; disminuyendo la fosforilación de p-ERK por medio de una dosis dependiente en el grupo 3, obteniendo un promedio de 53.53 (p44) y 67.31 (p42); sin embargo en el grupo cuatro se obtuvo un menor promedio de 19.62 (p44) y 31.83 (p42). Se encontró que miricetina tiene diferencia significativa en el grupo 4. (Ver figura N.6).

Cuadro 5.- Efecto de miricetina en la fosforilación de p-ERK en la línea celular H9c2 en la estimulación del peptidoglicano obtenido de *Streptococcus sanguinis*.

GRUPO (concentración)/ subunidad		EFECTO DE MIRICETINA	
		PROMEDIO	DE
Uno (1 µL)	p44	119.2233	34.3853
	p42	241.8	238.3476
Dos (5 µL)	p44	81.2006667	5.47320759
	p42	111.6256	60.8257
Tres (10 µL)	p44	53.534	9.52092201
	p42	67.311	52.5788
Cuatro (15 µL)	p44	19.6253333	18.1684924
	p42	31.8392	22.7192089

Kruskal-wallis (calculada)=12.83, gl= 4 (9.48), p<.05

Figura N.6 Efecto de miricetina en la fosforilación de p-ERK en la línea celular H9c2 en la estimulación del peptidoglicano obtenido de *Streptococcus sanguinis*.



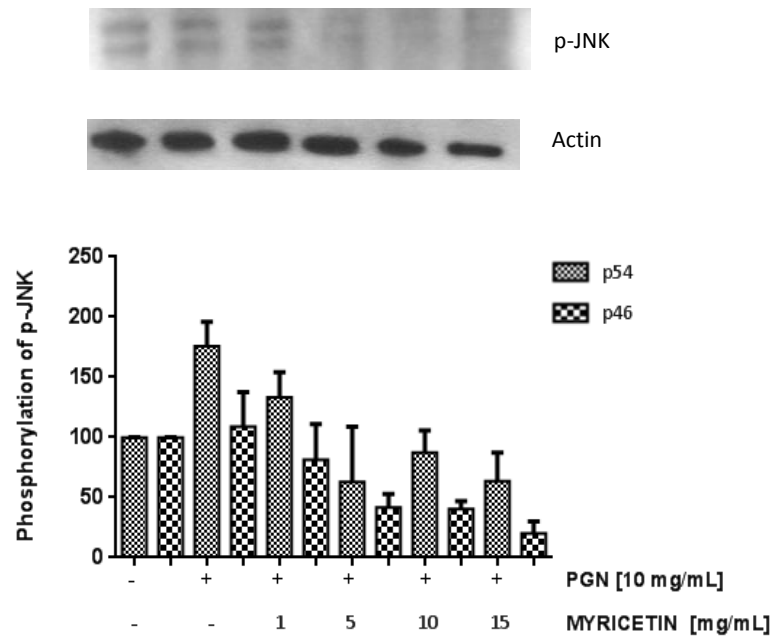
De acuerdo al cuadro 6, el efecto de miricetina en la fosforilación de las MAPKs en la línea celular H9c2 en la estimulación del peptidoglicano obtenido de *Streptococcus sanguinis*, el flavonoide presentó un efecto anti-inflamatorio; disminuyendo la fosforilación de p-JNK por medio de una dosis dependiente a partir del grupo 2, obteniendo un promedio de 63.07 (p54) y 41.59 (p46). No obstante se encontró que en el grupo 4 se obtuvo un menor promedio de 20.14 (p46). (Ver figura N.7).

Cuadro 6.- Efecto de miricetina en la fosforilación de p-JNK en la línea celular H9c2 en la estimulación del peptidoglicano obtenido de *Streptococcus sanguinis*.

GRUPO (concentración)/ subunidad		EFECTO DE MIRICETINA	
		PROMEDIO	DE
Uno (1 µL)	p54	133.18	36.2912607
	p46	81.3086667	51.3581017
Dos (5 µL)	p54	63.0723333	79.2672425
	p46	41.5986667	19.8321812
Tres (10 µL)	p54	60.4913	41.0162
	p46	40.2933333	11.4172703
Cuatro (15 µL)	p54	63.679	40.6658791
	p46	20.1411933	17.2099308

Kruskal-wallis (calculada)= 8.06, gl= 4 (9.48), p<.05

Figura N.7 Efecto de miricetina en la fosforilación de p-JNK en la línea celular H9c2 en la estimulación del peptidoglicano obtenido de *Streptococcus sanguinis*.



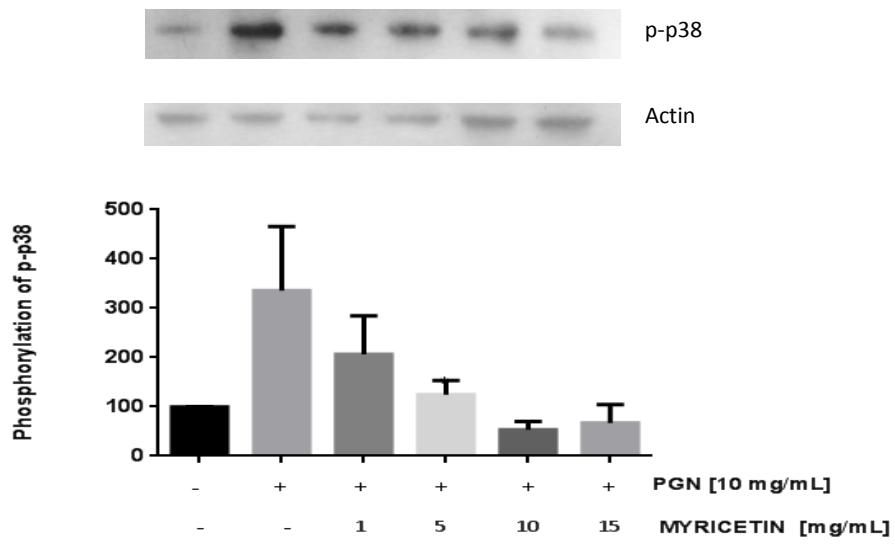
De acuerdo al cuadro 7, el efecto de miricetina en la fosforilación de las MAPKs en la línea celular H9c2 en la estimulación del peptidoglicano obtenido de *Streptococcus sanguinis*, el flavonoide presentó un efecto anti-inflamatorio, disminuyendo la fosforilación de p-p38 por medio de una dosis dependiente a partir del grupo 3; obteniendo un promedio de 53.59. (Ver figura N.8).

Cuadro 7.- Efecto de miricetina en la fosforilación de p-p38 en la línea celular H9c2 en la estimulación del peptidoglicano obtenido de *Streptococcus sanguinis*.

GRUPO (concentración)	EFECTO DE MIRICETINA	
	PROMEDIO	DE
Uno (1 µL)	206.335667	135.357022
Dos (5 µL)	124.855667	49.9771083
Tres (10 µL)	53.5993333	28.9346832
Cuatro (15 µL)	67.0883333	64.6074261

Kruskal-wallis (calculada)= 6.56, gl= 4 (9.48), p<.05

Figura 8. Efecto de miricetina en la fosforilación de p-p38 en la línea celular H9c2 en la estimulación del peptidoglicano obtenido de *Streptococcus sanguinis*.

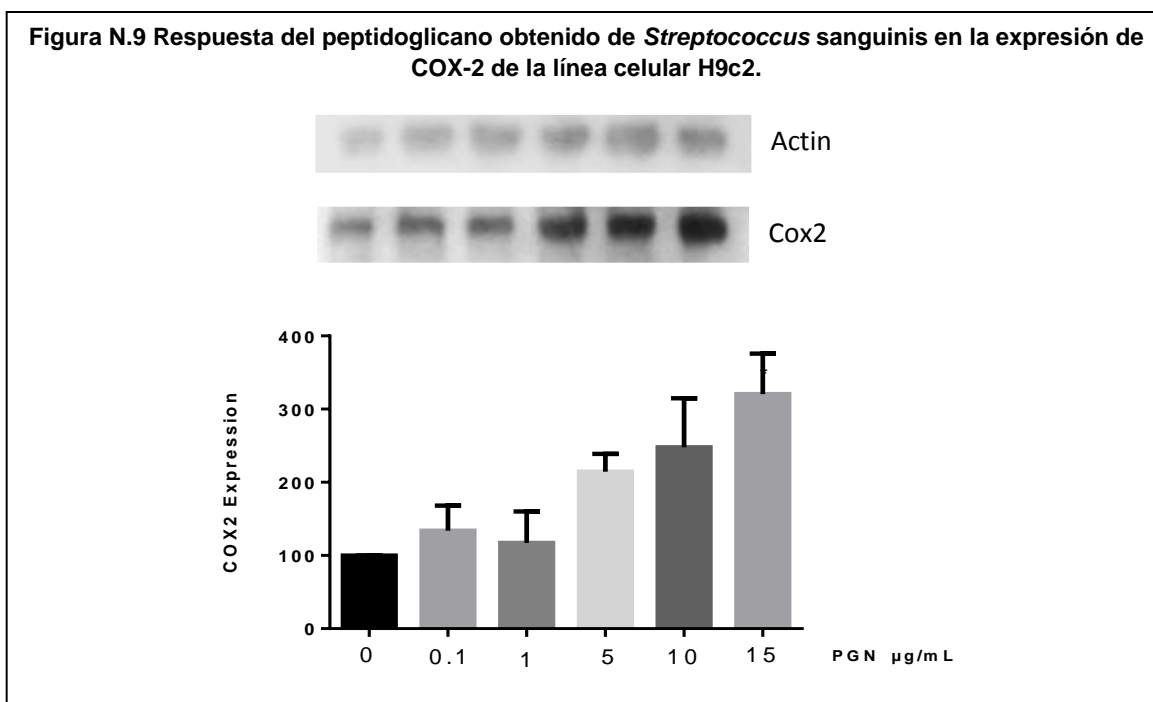


De acuerdo al cuadro 8, la respuesta del peptidoglicano obtenido de *Streptococcus sanguinis* en la expresión de COX-2 en la línea celular H9c2; el peptidoglicano por medio de una dosis dependiente, presentó mayor expresión de la enzima en el grupo 5; obteniendo un promedio de 320.36. (Ver figura N.9).

Cuadro 8.- Respuesta del peptidoglicano en la expresión de COX-2 de la línea celular H9c2.

GRUPO (concentración)	EXPRESIÓN DE COX-2	
	PROMEDIO	DE
Uno (0.1 µL)	133.6866	59.6442
Dos (1 µL)	117.1756	74.6898
Tres (5 µL)	214.37	42.5549
Cuatro (10 µL)	247.7433	116.2683
Cinco (15 µL)	320.3633	96.3259

Kruskal-wallis (calculada)= 8.21, gl= 4 (9.48), p<.05



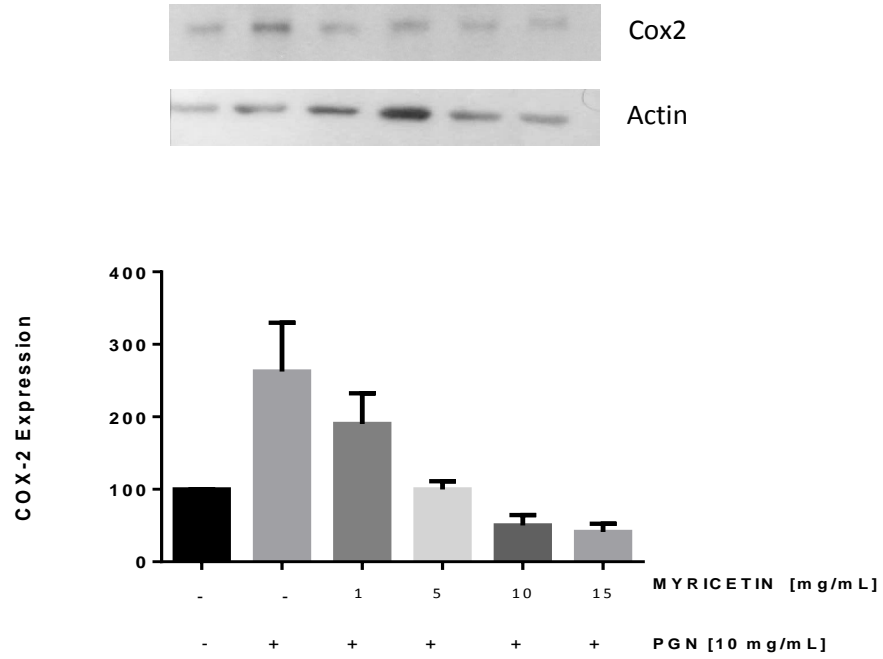
De acuerdo al cuadro 9, el efecto de miricetina en la expresión de COX-2 en la línea celular H9c2 en la estimulación del peptidoglicano obtenido de *Streptococcus sanguinis*, el flavonoide a partir de una dosis dependiente, reguló la expresión de ésta enzima en el grupo 3; obteniendo un promedio de 98.49. Sin embargo se obtuvo un menor promedio en el grupo 4 de 58.31. (Ver figura N. 10).

Cuadro 9.- Efecto de miricetina en la expresión de COX-2 en la línea celular H9c2 en la estimulación del peptidoglicano obtenido de *Streptococcus sanguinis*.

GRUPO (concentración)	EFECTO DE MIRICETINA	
	PROMEDIO	DE
Uno (1 µL)	190.326667	73.0132018
Dos (5 µL)	171.8826	125.2749
Tres (10 µL)	98.4936	84.8738
Cuatro (15 µL)	58.3193	32.0130

Kruskal-wallis (calculada)= 7.509, gl= 4 (9.48), p<.05

Figura 10. Efecto de miricetina en la expresión de COX-2 en la línea celular H9C2 en la estimulación del peptidoglicano obtenido de *Streptococcus sanguinis*.



DISCUSIÓN

En nuestra investigación, se observó que miricetina tiene un efecto antiinflamatorio en la línea celular H9c2 en la estimulación del peptidoglicano obtenido de *Streptococcus sanguinis*, dado que, disminuye la fosforilación de la vía de las MAPKs cinasas y expresión de COX-2; por medio de una dosis dependiente ya que al tratar las células a una concentración de 15 μ L del flavonoide se obtuvo mayor frecuencia con anti-inflamatoria de (16) 88.88% y sin actividad anti-inflamatoria (2) 11.11% de 18 casos totales que representaron el triplicado de p-ERK, p-JNK, p-p38 y Cox-2; así como las sub-unidades de los mismos.

Por otra parte a partir de una concentración de 5 μ L del flavonoide, p-JNK presentó actividad anti-inflamatoria con un promedio de 63.07 (p54) y 41.59 (p46); sin embargo a partir de 10 μ L de miricetina se reguló p-ERK con un promedio de 53.53 (p44) y 67.31 (p42); y a p-p38 con un promedio de 53.59. Éste comportamiento se puede deber a los factores de crecimiento y mitógenos para inducir el crecimiento celular y diferenciación; así mismo a la interacción de los cambios en los niveles de expresión de genes tempranos que se relacionan con la apoptosis celular.

Por otra parte Kumar et al. (2016), en el Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Sudáfrica; reportó concentraciones de 62.5-125 μ g/mL de miricetina; demostrando su actividad anti-inflamatoria en ensayos *in vitro* e *in vivo*; inhibiendo la secreción de IL-6 e IL-8, MMP-3; y a 10 μ M ERK $\frac{1}{2}$, AKT y p38; ⁶⁴

Con respecto a la variable peptidoglicano, se encontró que el TLR 2 estimula el PAMP; activando la cascada de cinasas como p38 asociada a la proteína activada por mitógenos (MAP), JNK (c- N-terminal kinases) y ERK ½ (extracelular regulated Kinase ½); y enzimas (COX-2) ^{48, 49}. Tal como lo describe Gutiérrez-Venegas G, et.al (2003), UNAM Facultad de Odontología: departamento de investigación y posgrado, ciudad de México; y Akira, et al., (2006), Instituto de enfermedades microbianas, Japón; demostrado que TLR 2 reconoce una gran variedad de PAMP; bacterias gram positivas y gram negativas; detecta lipoproteínas, peptidoglicanos y ácido lipoteicoico que contienen lípidos, como es el peptidoglicano. ^{28, 52, 75}

En el 2015, Zheng G; llevó a cabo un estudio en la línea celular H9c2, simulando un modelo de sepsis a una concentración de 20 mg/mL de peptidoglicano; sin embargo en nuestra investigación a partir de 0.1 µL con un promedio de 133.6866, desencadenó la expresión activa de COX-2. Tal como lo describe Nunes, et al., 2013; durante el proceso inflamatorio se activan diversos eventos de síntesis y liberación de mediadores pro-inflamatorios; como resultado induce la ruptura de la membrana epitelial y un daño tisular; la llave para que se desencadene esta respuesta inflamatoria es el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras κ de linfocitos B activados (NF-κB), que induce la expresión de genes pro-inflamatorios y regulación de la liberación de citoquinas y quimiocinas. ^{63, 64}.

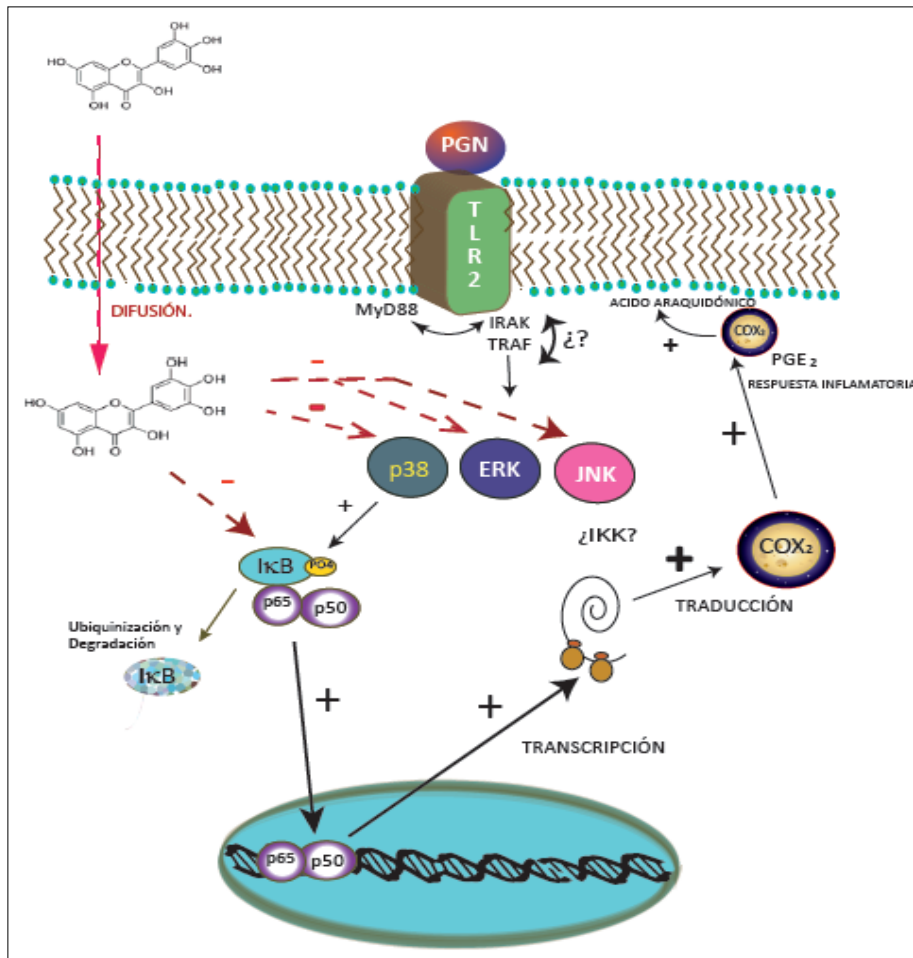
Es importante enfatizar que las MAPKs cinasas son activadas por factores de crecimiento, apoptosis, procesos inflamatorios y estrés; estas proteínas desempeñan un papel importante en la transducción intracelular de señales, permitiendo a la célula integrar diferentes estímulos extracelulares.^{54, 56}

Con respecto a nuestra variable COX-2, se encontró que participa en la cascada de la inflamación; se obtuvo mayor expresión a partir de una dosis de 15 μ L de peptidoglicano, con un promedio de 320.3633. Así mismo el pre-tratamiento con miricetina por medio de una dosis dependiente regula la expresión de COX-2 en células H9c2 en la estimulación del peptidoglicano obtenido de *Streptococcus sanguinis*; se encontró que disminuye su expresión a partir de 10 μ L del flavonoide con un promedio de 98.4936; éste comportamiento no concuerda con los datos de Byoung, et al., demostró que el pre-tratamiento con miricetina (25, 50 y 100 μ M) disminuye la expresión de COX-2 en RAW264.7 macrófagos; esta diferencia se puede deber a la diferencia de líneas de investigación.⁶⁸

En resumen, el ligado peptidoglicano al interactuar con el TLR2, activa diversas vías de señalización; tal como la vía de las MAPKs cinasas; así mismo la miricetina traspasa la membrana lipídica por difusión; inhibiendo a ERK, JNK y p38; y la vía $I\kappa\beta$. Además la activación de ésta última vía promueve la degradación de p65/p50; estimulando NF- κ B, activación de COX-2; desencadenando la respuesta inflamatoria a través de la liberación de PGE₂ y el ácido araquidónico. Así pues, Gutiérrez-Venegas G, et. al (2006), UNAM Facultad de Odontología: departamento de investigación y posgrado, ciudad de

México; reportó que la cascada de fosforilaciones resulta en la estimulación de NF- κ B, la subsecuente expresión de la ciclooxigenasa-2 (COX2) y liberación de prostaglandinas E2. ⁷⁶ (Figura N. 11)

Figura N. 11 Efecto de miricetina en la vía de las MAPKs y COX-2



*F.D Fuente Directa: Gutiérrez-Venegas G.

CONCLUSIÓN

En la presente investigación titulada: Efecto de miricetina en la línea celular H9c2 en la estimulación del peptiglicano obtenido de *Streptococcus Sanguinis*, podemos concluir de acuerdo a los resultados obtenidos que miricetina regula la fosforilación por medio de una dosis dependiente la vía de las MAPKs y expresión de COX-2; demostrando que posee propiedades anti-inflamatorias, capaz de modular la liberación de mediadores pro-inflamatorios; posible agente terapéutico de investigaciones futuras en modelos in vivo para que éste flavonoide se use como tratamiento preventivo de pacientes con periodontitis crónica, disminuyendo la probabilidad de riesgo para endocarditis infecciosa.

CRONOGRAMA

ACTIVIDADES 2016-2017

Meses	Nombre del proyecto	Revisión bibliográfica	Elaboración del proyecto	Western blot	Concentración de información (Excel)	Análisis Estadístico	Discusión y conclusión
Noviembre	X						
Diciembre		X					
Enero			X	X			
Febrero				X			
Marzo				X			
Abril				X	X		
Mayo				X	X		
Junio				X	X		
Julio				X	X	X	
Agosto						X	X

BIBLIOGRAFÍA

1. Hernández GC, Orozco NE, Armando Arredondo LA. Modelos conceptuales y paradigmas en salud pública. Rev. salud pública 2012. 14 (2): 315-24.
2. Liliana BM. Realizando 'diagnósticos diferenciales' de los modelos teóricos del proceso salud-enfermedad. K A I R O S. Revista de Temas Sociales 2011. 15 (28): 1-12.
3. López DM, Carvallo FG. Aproximación al proceso salud-enfermedad. Odous científica 2009. 10 (1): 33-43.
4. Alvear FS, Vélez ME, Botero L. Factores de riesgo para las enfermedades periodontales. Rev Fac Odontol Univ Antioq 2010; 22(1): 109-116.
5. Mannns FA. Sistema Estomatognático: fundamentos clínicos de fisiología y patología funcional. Ed. ALMOCA; 2013.
6. Carranza KT. Periodontología clínica de Carranza. 8nd. Ed. AMOLCA; 2014.
7. Jiménez SW. Tabaco e influencia en peiodonto. Rev. Act. Med. 2013; 31 (1 supl 2).
8. Pereiro GD. Regulación del movimiento dentario ortodóntico por los estrógenos. Facultad de medicina y ciencias en la salud. Oviedo; 2012.
9. Lindhe J. Periodoncia clínica e implantología odontológica. 5ª. Ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2009.

10. Rivera PA, Bruno CR. Producción y caracterización de una proteína recombinante del cemento (CEMP 1) en células de *Drosophila melanogaster* (DML-2-23). Rev. Odont. Mex 2013; 17(2).
11. González AP, Gómez PE. Localización de las proteínas específicas del cemento radicular CEMP1 y CAP en células neoplásicas. Immunolocalization of cementum specific proteins CEMP1 and CAP in tumor cells. Journal of Oral Reseach 2013.
12. Hueso Alveolar. Odont Moder 2012; 8(90): 14-15.
13. Moreno CS, contreras RE. Molecular mechanisms involved in bone, destruction in periodontitis. Review of de literature. Rev clin. implantol Periodontics 2013. Colombia; 6(3).
14. Corrales AM, Arce GM, Hernández MV. Terapia celular en las periodontopatías: una realidad alentadora en Villa Clara. Medicent Electrón 2014; 18(4): 201.
15. Shaw L, Ulla H, Ronan D, Simeon M, Charlie D, Maleta K, et al. Distinguishing the Signals of Gingivitis and Periodontitis in Supragingival Plaque: a Cross-Sectional Cohort Study in Malawi. American Society for microbiology 2016; 82 (19): 6057-65.
16. Gómez MG, Aguilar SA, Guardia J. Inflamación gingival. Dentaid expertise 2011; (7): 4-6.
17. Botero JE, Bedoya E. Determinantes del diagnóstico periodontal. Rev. Clin. Periodoncia Implantol. 2010; 3(2): 94-99.

18. Santaularia TM, Vega SA, Pérez RD. Endocarditis infecciosa. Investigación en salud 2014; 7(2); 76-83.
19. Hernández HF. Interacción de streptococcus sanguinis en la viabilidad y crecimiento de candida albicans en la cavidad oral. Universidad de Chile; 2016.
20. Santander IE, Muñoz PC, Molina ML, Cifuentes JP. Hábitos de higiene oral en estudiantes de odontología de la Universidad de Chile. Rev. Clin. Periodoncia Implantol. 2010; 3 (1): 11-18.
- 21.. Elasco EA. El modelo de alonde como marco descriptivo dentro de las investigaciones sobre del grupo de investigación gastrohnut de la universidad del valle de cali, colombia. Revista gastrohnut 2015; 17 (3): 204-207.
22. Horacio SR, Quispe RD. Enfermedades periodontales y genética. Rev. Act. Clin. Med 2013; 31 (1 supl 2): 1581-85.
23. Pérez MY. "Prevalencia de placa dentobacteriana alumnos de la escuela primaria gral. Ignacio Zaragoza de tihuatlan, ver. Poza rica de Hidalgo; 2012.
24. Sarduy BL, González DM. La biopelícula: una nueva concepción de la placa dentobacteriana. Mediacentro Electrónica 2016; 20 (3): 4.
25. Pérez HY, Armas CA. Prevalencia de enfermedad periodontal y factores de riesgo asociados. Policlínico Pedro Borrás, Pinar del Río. Rev Ciencias Médicas 2011 junio; 15(2).
26. Abbas AK, Lichtman AH. Inmunología celular y molecular. 5nd. Ed. España. Elsevier; 2008.

27. Zepeda GF, Kreft VJ. *Streptococcus pneumoniae* e inmunidad innata. Rev. chil. enferm. respir. 2013; 29(2): 89-95.
28. Calvo J, Martínez M. Mecanismo de acción de los antimicrobianos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011; 27(1):44–52.
29. Lucrecia MM, Medina GM, Merino A. Identification of periodontal pathogen bacteria using molecular diagnostic methods. Enf Inf Microbiol 2010; 30 (3): 83-90.
30. Kinane DF. Causation and pathogenesis of periodontal disease. Periodontology 2000. 2015; 25 (1 supl2): 8–20.
31. Chandki R, Banthia B. Biofilms: A microbial home. J Indian Soc Periodontol 2011; 15(2): 111–14.
32. AlJehani AY. Risk Factors of Periodontal Disease: Review of the Literature. International Journal of Dentistry 2014: 1-9.
33. García PJ, Martínez MJ. Endocarditis infecciosa. MEDISAN 2010; 14(1):90
34. Diagnóstico y tratamiento de la endocarditis infecciosa. 2010, Pub. CENETECN. 978-607-14-3
35. Santini R, Saini S, Sugandha R. Periodontal diseases: A risk factor to cardiovascular disease. Brief communication 2010; 13(2): 159-161.
36. Montes AM. Nivel de conocimiento sobre Profilaxis Antibiótica de Endocarditis Infecciosa previa a procedimientos odontológicos en internos de odontología de tres universidades de Lima - 2013. Perú: lima; 2014.

- 37.** Habbid G, Lancellotti P, Antunes NJ. Guía ESC 2015 sobre el tratamiento de la endocarditis infecciosa. Rev Esp Cardiol 2016; 69(1):49-69.
- 38.** Bain SC, Hamburger J, Scully C. Guía Médica para la Consulta Dental. Ed. ALMOCA; 2012.
- 39.** HOSPITAL PUERTA DEL MAR. CÁDIZ. Endocarditis infecciosa tratamiento y profilaxis: CARDIOLOGÍA PEDIÁTRICA; 2011
- 40.** Escudero CN, Perea GM, Bascones MA. Revisión de la periodontitis crónica: Evolución y su aplicación clínica. Avances en Periodoncia 2010; 20(1): 27-37.
- 41.** Pretel TC, Chávez RB. Periodontal Disease as a Risk Factor for systemic conditions. Rev. Estomatol Herediana 2013; 23(4):223-9.
- 42.** Molana BW, Munevar CJ. Papel de la enfermedad periodontal en el desarrollo de entidades inflamatorias de etiología autoinmune: implicaciones clínicas y desafíos terapéuticos. Rev. Colomb. Reumatol 2012 junio; 19(2).
- 43.** Jiménez BG, Machuca PG. Heart and periodontal diseases: Does evidence exist of association? Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2010; 10:215-20.
- 44.** Rodríguez G. Géneros Streptococcus y Enterococcus. Temas de bacteriología y virología médica 2010: 273-89.
- 45.** Mora X. Diferenciando bacterias gram gram+ y gram -. SELECCIONES AVÍCOLAS 2012: 25-8.

46. Calvo J, Martínez M. Mecanismo de acción de los antimicrobianos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011; 27(1):44–52.
47. Maroley RN, Espinosa RM. Estructura bacteriana. *Revistas Bolivianas* 2014; 49: 2589-93
48. Fernández CE. Progresos en terapias inmunomoduladoras con inmunoglobulinas y con vacunas de mucosas en patologías infecciosas. *Sociedad inmunología comunidad de Madrid* 2013: 71-87.
49. Kawai T, Akira S. Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity* 2011 may.
50. Gómez GH, Rugeles TM, Jaimes AF. Características inmunológicas claves en la fisiopatología de la sepsis. *ELVESIER* 2015 marzo; 19(1):40-46.
51. Vadillo E, Pelayo R. Los receptores tipo Toll en el desarrollo y función del sistema hematopoyético. *RIC* 2012 octubre; 64(5): 461-476
52. Botosa I, Segal MD, Davies RD. The Structural Biology of Toll-Like Receptors. *National Institutes of health* 2011; 19(4): 447-59.
53. García GR. Las interacciones entre las proteínas Scaffold y la ruta Ras-ERK como diana antitumoral. *Universidad de Cantabria*; 2013.
54. Salinas SA, Giménez BJ. Papel de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) en el carcinoma de células renales esporádico. *Actas Urológicas Españolas* 2012; 36(2):99-103.
55. Weinberg AR. *Cell Signaling Technology*. Ed. Hardcover. 2015
56. Morrison KD. *MAP Kinase Pathways*. Cold Spring Harbor Laboratory Press 2012; 4(001); 1-5.

57. Escamilla JC, Cuevas ME, Guevara FJ. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. Rev Fac Med UNAM 2009; 52(2): 73-75.
58. Estrada RR, Ubaldo SD, Araujo EG. Los flavonoides y el sistema nervioso central. Salud mental 2012; 35(5): 375-384.
59. Ortíz CM. Actividad analgésica del extracto etanólico del fruto *Vallea stipularis* L.F. “chuillur” en ratones: lima- Perú: universidad wiener; 2016.
60. Amaya RM, Portillo ME. Determinación de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante de en Melaza, azúcar blanco y moreno en el ingenio chaparrastique por el método de espectrofotometría ultravioleta-visible. El salvador; universidad del salvador: 2013.
61. Quiñones M, Miguel M, Aleixandre A. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. Nutrición hospitalaria 2012; 27(1): 76-89.
62. Menéndez SC. Efectos vasculares de la quercetina y la catequina: interacción y los procesos de coagulación y desconjugación metabólica. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2012.
63. Fuente ML. Estudio de la capacidad antioxidante de los polifenoles del vino tinto y sus aplicaciones biológico-preventivas. Villaviciosa de Odón: Universidad Europea; 2014.
64. Kumar SD, Badoni SR, Combrinck S, Viljoen A. Myricetin: a dietary molecule with diverse biological activities. Nutrients 2016; 8(9): 1-31.

- 65.** Xue GR, Fu X, Chen J, Zhou Lin, Chen G. Preparation and characterization of microemulsions of myricetin for improving its antiproliferative and antioxidative activities and oral bioavailability. American Chemical Society 2016; (64): 6286-94.
- 66.** Jovi J, Dhanya AT, Haridas KR, Sumesh K, Jarayaraman S, Jayadevi VE, et al. Structural characterization of a novel derivative of myricetin from *Mimosa pudica* as an anti-proliferative agent for the treatment of cancer. Biomedicine & Pharmacotherapy 2016; 1067-77.
- 67.** Zhang HX, Gang MZ, Rowlands KD, Gou LY, Fok LK, Wong YH, et al. Flavonoid Myricetin Modulates GABAA Receptor Activity through Activation of Ca²⁺ Channels and CaMK-II Pathway. Complementary and Alternative Medicine 2012; 1-9.
- 68.** Cho OB, Yin HH, Park HS, Byun BE, Ha YH, Jang IS. Anti-inflammatory activity of myricetin from *Diospyros lotus* through suppression of NF-Kb and STAT1 activation and Nrf2-mediated HO-1 induction in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 2016; 80 (8): 1520-30.
- 69.** Ferrand SP. Reflexiones alrededor del concepto de promoción de la salud y prevención de la enfermedad. Revista Med 2011; 19 (1): 112-13.
- 70.** Carvajal P. Periodontal disease as a Public Health problem: The challenge for Primary Health Care. Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral 2016; 9 (2).
- 71.** Villa OP. Enfoque salubrista de la enfermedad periodontal. RelbCi 2015 julio; 2(4): 2334-2501.

- 72.** Fonseca RS. Periodontitis crónica: ¿un factor de riesgo cardiovascular?.
Med Int Mex 2013; 29 (1 supl2): 495-503.
- 73.** Shree VD, Milind SD, Basavraj SN. Periodontitis, Bacteremia and Infective Endocarditis: A Review Study. Arch Pediatr Infect Dis 2017. 74.
Bascones MA, Muñoz CM, Bascones IJ.
Infecciones orales y endocarditis infecciosa. Med Clin (Barc) 2012;
138(7):312–317.
- 74.** Bascones MA, Muñoz CM, Bascones IJ.
Infecciones orales y endocarditis infecciosa. Med Clin (Barc) 2012;
138(7):312–317.
- 75.** Gutiérrez-Venegas G, Ruíz-López C. Receptores Toll y mecanismos de transducción en la inmunidad innata. REB 2003; 22(2): 67-75.
- 76.** Gutiérrez-Venegas G, Cardoso-Jiménez P. Ácido lipoteicoico: receptores y mecanismos de transducción. REB 2006; 25 (2): 41-9.



UNIVERSIAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



CARRERA DE CIRUJANO DENTISTA

RECOLECCIÓN DE DATOS DE WESTER BLOT

Efecto de miricetina en la línea celular H9c2 en la estimulación del peptidoglicano obtenido de *Streptococcus sanguinis*.

Instrucciones: Marcar con una **X** el rubro a evaluar N. de experimento: ____

- Efecto de miricetina sobre:

La vía MAPKs cinasas: ____ Expresión de COX-2: ____

- Respuesta del peptidoglicano:

Expresión de COX-2: ____ Fosforilación de las MAPKs: ____

Instrucciones: llenar la tabla con los datos correspondientes y marcar con una **X** los valores menor, igual o mayor a 100.

❖ **Análisis densitométrico**

Grupos	1	2	3	4	5	6
Cuantificación						
Menor a 100						
Igual a 100						
Mayor a 100						