



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---



**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**FLAVONOIDES MEDIADORES EN LA ENFERMEDAD PERIODONTAL.**

**TESINA**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

***CIRUJANO DENTISTA***

**P R E S E N T A:**

**JOSÉ MANUEL GONZÁLEZ FIERRO**

**TUTORA: DRA. GLORIA GUTIÉRREZ VENEGAS**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

Más hondamente mía: este trabajo hermoso  
de encontrar las palabras verdaderas  
inconfundibles en su ser pues siempre  
nos hablan desde dentro de las cosas  
las que a su modo dicen el misterio que entraña  
cuánto alienta y se afirma  
las que con claridad de agua o cristal pronuncian  
la alegría y las lágrimas del vivir y se posan  
temblando en el papel.

Eloy Sánchez Rosillo

## Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a la Dra. Gloria Gutiérrez por haber compartido conmigo sus conocimientos y su pasión por la investigación. Aunque más importante si aún cabe, por haberme dado la confianza necesaria para enfrentarme a algo impensable para mi “una tesis y la lectura de la misma”.

Debo manifestar, mi agradecimiento a mis compañeros de laboratorio, cuya amistad ha provisto de un ambiente propicio para poder realizar este trabajo de investigación.

A mi familia y que gracias a su compañía y a su ayuda, contribuyeron en la elaboración de esta Tesis.

# ÍNDICE

---

1. INTRODUCCIÓN	9
1.2. Flavonoides	10
1.3. Distribución y estado natural	12
1.4. Propiedades Físicas	13
1.5. Características de los flavonoides	13
1.6. Efecto de los Flavonoides en los seres humanos	14
1.7. Evidencias Epidemiológicas del Efecto de los flavonoides en el tratamiento de enfermedades	14
1.8 Afecciones coronarias	17
1.9 Efecto de los flavonoides como antioxidantes	18
1.10 Efecto de los flavonoides en el tratamiento del cáncer	19
2. IDENTIFICACIÓN DE LOS FLAVONOIDES	21
2.1. Biosíntesis y funciones	21
2.2. Extracción y aislamiento	23
2.3. Ensayos para la detección de flavonoides por colorimetría	23
2.4. Ensayo de Shinoda	23
2.5. Ensayo con Zn/HCL	24
2.6. Ensayo de Pacheco	24
2.7. Ensayo del estroncio amoniaco	24
2.8. Ensayos no colorimétricos. Espectroscopia ultravioleta visible	24
2.9. Absorción y metabolización	25
3. FLAVONOIDES Y EL HÍGADO	25
3.1. Flavonoides modo de acción en la arteriosclerosis	25
3.2. Flavonoides reguladores de la permeabilidad capilar	26
3.3. Los flavonoides mediadores de la inflamación	26
3.4. Efecto de los Flavonoides en sistemas enzimáticos	27

3.5. Cinasas	27
3.6. ATPasas	28
3.7. Fosfolipasa A2	29
3.8. Lipooxigenasas y ciclooxigenasa	29
3.9. Fosfolipasa C (PLC)	30
<b>4. FOSFODIESTERASA DE NUCLEÓTIDOS CÍCLICOS</b>	<b>30</b>
4.1. Adenilato ciclasa	31
4.2. Sialidasa	31
4.3. Óxido nítrico sintasa	31
4.4. Efectos sobre la Activación de factores de transcripción	32
4.5. Los Flavonoides moduladores de las vías de señalización	33
4.6. Flavonoides en la caries	34
4.7. Enfermedad Periodontal	36
4.8. Clasificación de la enfermedad periodontal	37
4.9. Clasificación de la enfermedad periodontal de acuerdo a la Asociación Dental Americana Papel de las citosinas	38
<b>5. FLAVONOIDES EN LA ENFERMEDAD PERIODONTAL</b>	<b>39</b>
5.1. Radicales libres	39
5.2. Fuentes de Radicales Libres	40
5.3. Factores orgánicos y metabólicos	41
5.4. Daños biomoleculares en el Estrés Oxidativo	41
5.5. Sistema de defensas antioxidantes	42
5.6. Clasificación de los antioxidantes	42
5.7. Estrés oxidativo y su relación con el proceso inflamatorio acción de los RL en los sistemas biológicos	43
5.8. Papel de las especies reactivas del oxígeno	43
5.9. Desbalance Redox en la enfermedad periodontal inflamatoria	44
<b>6. EXPRESIÓN DE LA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTETASA</b>	<b>46</b>
6.1. Hiperactivación de polimorfonucleares causas extrínsecas e intrínsecas	49
6.2. Papel de las citosinas	52

6.3. Acción de las proteasas	53
6.4. Efecto de los flavonoides en la enfermedad Periodontal	54
6.5. Vimang y Olezón	55
6.6 Los flavonoides en el tratamiento de la enfermedad periodontal	58
7. CONCLUSIONES	68
8. BIBLIOGRAFIA	69



Abreviaturas Utilizadas

- ADN .....Ácido desoxirribonucleico
- Akt .....Proteína cinasa B
- AP-1 .....Factor de transcripción
- ATP .....Adenosín trifosfato
- C/EBPd.....Factor de transcripción que se ha demostrado para mediar en la detención del crecimiento de líneas celulares
- C-2:.....Carbono quiral
- Ca<sup>2+</sup> .....Cación de calcio
- COX .....Ciclooxygenasa
- ERO.....Especies reactivas de oxígeno
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> .....Peróxido de hidrógeno
- HCl.....Ácido clorhídrico
- HO.....Radical hidroxilo
- HPCL:.....Cromatografía líquida de alta resolución
- IkappaB.....Proteína inhibidora kappa B
- IKK.....Cinasa inhibidora kappa
- IRF .....Factor regulador de interferón
- LDL .....Lipoproteínas de baja densidad
- MDA .....Malondialdehído



- Mg.....Magnesio
- NADPH.....Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
- NF kappaB.....Factor de transcripción nuclear kappa B
- NF-kB: .....Factor Nuclear kappa B
- NOS: .....Óxido Nítrico Sintasa
- O<sub>2</sub> .....Molécula de oxígeno
- PCR .....Proteína C reactiva
- PLS .....Polisacáridos
- PMN/M.....Células polimorfonucleares/macrófagos
- PMN.....Polimorfonucleares
- RL.....Radical libre
- ROS: .....Especies reactivas del oxígeno
- SOD .....Superóxido dismutasa
- TNF.....Factor de necrosis tumoral
- Zn .....Zinc



## Introducción

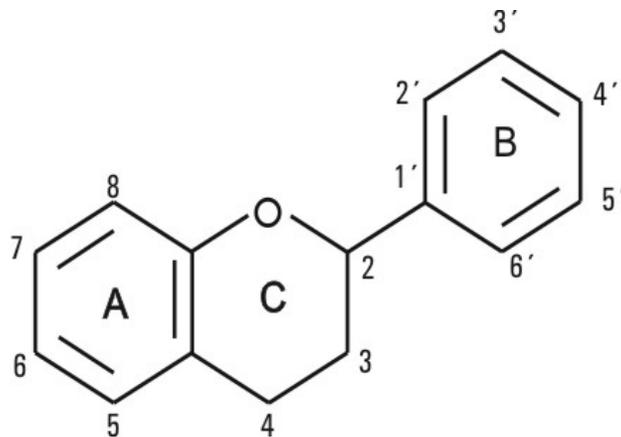
### **1.- Introducción.**

A pesar de los grandes avances que se han logrado en los últimos años en la comprensión del origen de enfermedades como la isquemia cardíaca, enfermedades agudas respiratorias y enfermedades de respuesta inflamatoria, no se han desarrollado aún medicamentos efectivos. Sin embargo, con los avances en las técnicas de biología molecular se ha logrado la identificación de un número cada vez mayor de moléculas “diana” y junto con el conocimiento de la relación entre anomalías funcionales y estructurales con ciertas patologías, quizá a mediano plazo se permitirá el desarrollo de fármacos más selectivos. La búsqueda de sustancias derivadas de productos naturales, es un campo de continua investigación. En este grupo de sustancias se encuentran, los flavonoides, que desde punto de vista farmacológico, poseen algunas ventajas respecto a otros grupos de compuestos naturales. La más importante es la uniformidad de la configuración química de toda la familia, de modo que las relaciones entre estructura y actividad son más fáciles de establecer. Por otro lado, la disponibilidad de las moléculas de la familia de los flavonoides y la relativa facilidad de su obtención por síntesis favorecen la evaluación de sus propiedades. Así mismo, se han caracterizado el efecto de los flavonoides en moléculas diana del metabolismo humano, así como las dosis efectivas<sup>1</sup> Por este motivo se realizará una revisión bibliográfica de los flavonoides y su papel en la enfermedad periodontal.



## 1.2 Flavonoides

Aunque probablemente la primera vez que se describió a los flavonoides fue cuando Robert Boyle en 1664, quien hizo una primera descripción de los efectos de los pigmentos de las flores obtenidos en medio ácido y en medio básico. La identificación del primer flavonoide ocurrió algunos siglos después, en año 1930 el premio Nobel de Fisiología y Medicina Szent- Györgyi, aisló de la cáscara de limón una sustancia, a que denominó citrina, la cual logró regular la permeabilidad de los capilares cuando es consumida, a esta sustancia se le describió con el nombre de vitamina P. Cuya estructura consistía en un compuesto de tres anillos bencénicos unidos por una cadena propánica; las distintas clases de flavonoides se diferencian en la saturación y en los sustituyentes del anillo C, mientras que los compuestos individuales, dentro de cada uno de estos grupos, se distinguen por la diferente sustitución de los anillos A y B, de esta forma, se han identificado a la fecha hasta 4.000 compuestos diferentes (Fig. 1).<sup>2</sup>



**Figura 1 Estructura básica de los flavonoides y el sistema de numeración de los carbonos.**

Es posible que los flavonoides hayan existido en la naturaleza desde hace un billón de años y haber interactuado por simbiosis con los organismos vegetales. La importancia del papel que desempeñan en la naturaleza ha permitido que hayan permanecido durante la evolución, haciendo posible el extraordinario rango



de actividades farmacológicas y bioquímicas, que manifiestan en mamíferos y otros sistemas celulares.

Por otra parte, en cuanto a su estructura química los Flavonoides son compuestos polifenólicos que se encuentran presentes en las plantas, como producto del metabolismo secundario y son productos involucrados en la pigmentación y protectores de rayos UV en las plantas. Particularmente abundan en los géneros Polygonácea, Rutácea, Leguminosae, Umbelliferae y Compositae. Son un grupo de compuestos de bajo peso molecular con una estructura química común fenil benzo- $\gamma$ -pirona (C6-C3-C6) (Figura2)

En función del grado de saturación y de la apertura del anillo central pirano, los flavonoides se clasifican en flavanoles, flavonas, isoflavonas, chalconas, flavanonas y flavonoles y en grupo nuevo denominado neoflavonoides (figura2).<sup>3-4</sup>

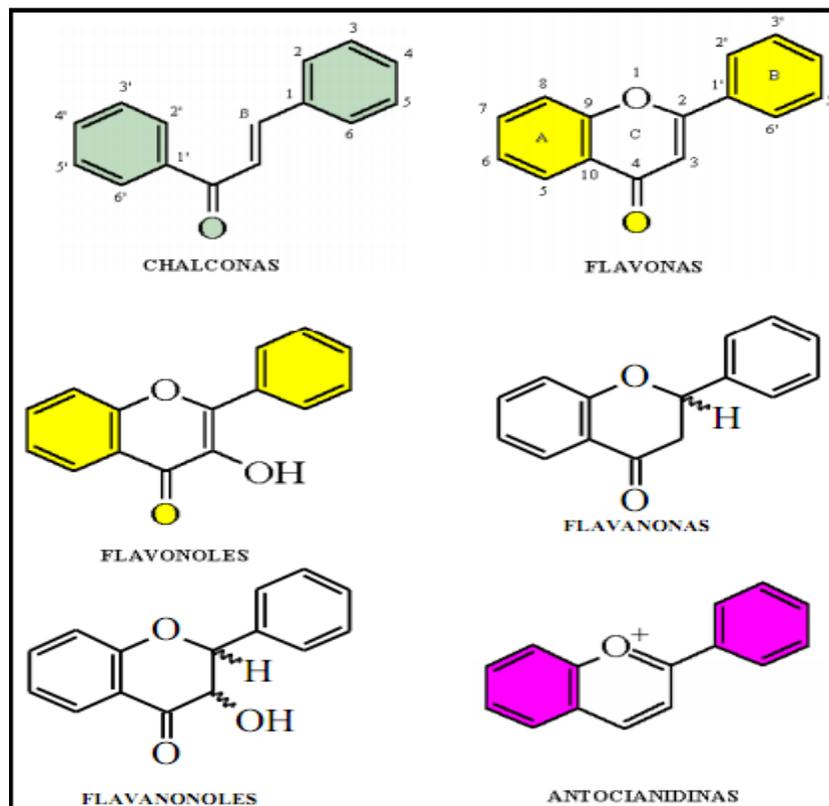


Figura 2. Estructura de los flavonoides.



La mayoría de los flavonoides poseen nombres triviales con la terminación INA u OL. Por ejemplo la acacetina se identificó por primera vez en una planta del género *Acacia* y se clasifica como una Flavona. La quercetina es un Flavonol identificado inicialmente en una planta del género *Quercus*. La naringenina es una Flavona aislada inicialmente en la naranja. El eriodictiol es una Flavanona que se aisló inicialmente en una planta del género *Eriodictyon*. Sin embargo, esta clase de nombres no es muy útil cuando se requiere información más sistemática de estas sustancias, por lo cual los químicos han convenido llamarlos con nombres que representen su estructura química. Estas sustancias se encuentran la mayoría de las veces, ligadas a moléculas de carbohidratos. A este tipo de combinación núcleo flavonoide básico + una o varias unidades de carbohidratos, se les denomina Glicosidos, y cuando no tienen ligadas moléculas de carbohidrato se les denomina Agliconas Flavonoides, Por ejemplo los que mencionamos anteriormente (Acacetina, Eriodictiol, Quercetina, Naringenina, etc.)

Son Agliconas Flavonoides. Un ejemplo de glicósido es la Vitexina, la nomenclatura de los glicósidos es más compleja que la de las Agliconas.

### **1.3 Distribución y estado natural.**

Se encuentran especialmente en las plantas verdes (en las angiospermas), y sólo algunos pocos se han detectado en hongos y algas. Se han encontrado en las diferentes partes de las plantas, especialmente en las partes aéreas; y se les encuentra en forma libre (también llamados Agliconas Flavonoides), como glicósidos (la mayoría de las veces), como sulfatos y algunas veces como dímeros<sup>5</sup> y polímeros<sup>6</sup>. También unidos a azúcares formando heterocidos, lo que les confiere su estabilidad química. Los glicósidos pueden ser de dos clases: 1) con los carbohidratos ligados a través de átomos de oxígeno (enlace hemiacetal) es decir como O-glicósidos; o 2) con los carbohidratos ligados a través de enlaces C-C, es decir como C-glicósidos; de todas estas formas naturales, los O-glicósidos son los más comunes de hallar. Las antocianinas por su parte se encuentran como



sales principalmente en flores, frutos y tejidos con coloraciones que van del rojo hasta el violeta y el azul<sup>7</sup>.

#### **1.4 Propiedades Físicas**

Sus propiedades están en función de la clase de flavonoides, se considera su forma libre o asociada a glicósido ó sulfato. Por ejemplo las flavonas, flavonoles y auronas, por el sistema de enlaces conjugados, son compuestos sólidos con colores que comprenden desde el amarillo muy tenue hasta el rojo. Las Anticianidinas son de colores rojo intenso, morado, violeta y azul. Las Flavanonas y Flavanonoles debido al C-2 presentan el fenómeno de la rotación óptica. Los glicósidos son en general sólidos amorfos, mientras que las Agliconas y los altamente metoxilados y cristalinos. La solubilidad depende de su forma, el número y clase de sustituyente presente. Los glicósidos, las antocianidinas y los sulfatos son solubles en agua y alcohol. Las agliconas flavonoides están altamente hidroxiladas y son solubles en alcohol (etanol, metanol y n-butanol), mientras que las poco hidroxiladas lo son en solventes como éter etílico, acetato de etilo y acetona. Las agliconas flavonoides están altamente metoxiladas y son solubles en solventes menos polares como éter de petróleo y cloroformo.<sup>8</sup>

#### **1.5 Características de los Flavonoides**

Los Flavonoides cumplen funciones metabólicas importantes en las plantas como la protección frente a la luz UV<sup>9-11</sup>, defensa ante los herbívoros, regulación del transporte de la hormona auxina<sup>12</sup>, atracción de animales polinizadores, atracción de animales dispersores de semillas y frutos, atracción de presas, inducción de la nodulación por parte de las bacterias fijadoras de nitrógeno, protección contra los hongos. Algunas funciones son comunes a todas las plantas y otras son específicas de algunos taxones.



## **1.6 Efecto de los Flavonoides en los seres humanos**

Aumentan la resistencia capilar, presentan propiedades cardiotónicas y anti-trombóticas, propiedades hepatoprotectoras, de disminución del colesterol circulante, actúan como protectores gástricos, poseen propiedades antioxidantes, antiinflamatorios y analgésicos, Antivíricos, antibacterianos y antifúngicos y de prevención de enfermedades neurodegenerativas.<sup>13-20</sup>

## **1.7 Evidencias Epidemiológicas del Efecto de los flavonoides en el tratamiento de enfermedades.**

Flavonoles, flavanonas y flavones son flavonoides que poseen actividades cardioprotectoras y anti-carcinogénicas. En Europa se ha investigado a 36,037 individuos de entre 35 y 74 años, encontrando que los hombres consumen 130.9 mg/ d y las mujeres 97 mg/d.<sup>21</sup> En Grecia se estima que se consumen 92 mg/d de flavonoides, de proantocianidinas se consumen 87 mg. En Estados Unidos se estima que el consumo de proantocianidinas es de 83 mg.<sup>22</sup> Los resultados del consumo de flavonoides en Grecia se resume a continuación<sup>23,24</sup>. (Cuadro I)

**Cuadro I Consumo de Antioxidantes en Griegos adultos**

Antioxidante	Consumo		
	Mujeres	Hombres	Ambos
<b>N</b>	16,618	11,954	28,572
<b>Flavonas, mg</b>	7 (6, 9)	8 (6, 10)	7 (6, 9)
Apigenina	4 (3, 5)	5 (4, 6)	5 (4, 6)
Luteolina	3 (2, 4)	3 (2, 4)	3 (2, 4)
<b>Flavonoles, mg</b>	26 (20, 32)	32 (25, 39)	28 (22, 35)
Quercetina	17 (13, 21)	20 (16, 25)	18 (14, 23)
Kaempferol	5 (4, 8)	7 (4, 10)	6 (4, 9)
Isorhamnetina	2 (2, 3)	3 (2, 3)	2 (2, 3)
Miricetina	1 (1, 1)	1 (1, 2)	1 (1, 1)
<b>Flavanones, mg</b>	27 (15, 37)	28 (16, 42)	27 (16, 39)
Eriodictial	0.3 (0.2, 0.4)	0.3 (0.2, 0.4)	0.3 (0.2, 0.4)
Hesperetina	19 (10, 26)	19 (10, 27)	19 (10, 27)
Naringenina	7 (5, 11)	8 (6, 13)	8 (5, 12)
<b>Flavan-3-ols, mg</b>	13 (8, 18)	18 (12, 28)	14 (9, 22)
Catequina	5 (3, 7)	8 (5, 13)	6 (4, 10)
Epicatequina	6 (4, 8)	7 (5, 11)	6 (4, 9)
Gallocatequina	<0.1	0.1 (0.05, 0.4)	<0.1
Epigallocatequina	0.7 (0.4, 1.4)	0.8 (0.5, 1.5)	0.7 (0.5, 1.4)
Epicatequina gallato	0.1 (0.04, 0.2)	0.1 (0.05, 0.2)	0.1 (0.05, 0.2)
Epigalocat. Gallato	0.1 (0.08, 0.2)	0.1 (0.08, 0.2)	0.1 (0.08, 0.2)
<b>Anthocianidinas, mg</b>	9 (6, 13)	12 (8, 19)	10 (6, 16)
Cianidina	4 (2, 6)	4 (2, 6)	4 (2, 6)
Delfinidina	3 (2, 4)	4 (3, 6)	4 (3, 6)
Malvidina	0.3 (0.01, 0.6)	2 (0.3, 6)	0.3 (0.01, 0.6)
Pelagronidina	<0.1	<0.1	<0.1
Peonidina	0.2 (0.07, 0.5)	0.4 (0.2, 0.9)	0.3 (0.1, 0.6)



Petunidina	<0.1	0.2 (0.03, 0.7)	<0.1
Isoflavonas, <b>mg</b>	<0.1	<0.1	<0.1
Proanthocianidinas, <b>mg</b>	67 (42, 98)	89 (57, 130)	75 (47, 111)
Vitamin C, <b>mg</b>	209 (160, 270)	220 (269, 280)	214 (163, 274)
Vitamin E, <b>mg</b>	26 (18, 37)	31 (23, 45)	28 (20, 41)
$\beta$ -caroteno, <b><math>\mu</math>g</b>	4532 (3362, 6143)	4828 (3629, 6440)	4660 (3470, 6269)
Selenio, <b><math>\mu</math>g</b>	69 (54, 88)	85 (66, 110)	75 (58, 98)
TEAC, <b><math>\mu</math>mol trolox equivalent</b>	3496 (2407, 7281)	5241 (3249, 9913)	4092 (2669, 8355)
TRAP, <b><math>\mu</math>mol trolox equivalent</b>	2918 (1953, 9343)	4941 (2752, 12366)	3560 (2187, 10934)
FRAP, <b><math>\mu</math>mol trolox equivalent</b>	3739 (2695, 5445)	5498 (3692, 8093)	4357 (2990, 6589)
ORAC, <b><math>\mu</math>mol trolox equivalent</b>	9944 (7697, 12749)	12277 (9454, 16121)	10796 (8283, 14152)
Total phenols, <b>mg GAE</b>	1229 (950, 1564)	1427 (1110, 1814)	1306 (1006, 1671)

El consumo de proantocianidinas, en Estados Unidos en el periodo de 1999-2002 en adultos mayores de 19 años es de 95 mg/d, de polímeros (30%), monómeros (22%), dímeros (16%), Tetrámeros y hexámeros (15%), 7.10 meros (11%) y trímeros de 5%. El té, las legumbres y vinos contribuyen 45 mg (48%) al día.<sup>25</sup>

En Holanda, se ha estudiado el consumo de flavonoides y su contribución con el aumento en el índice de masa corporal, se encontró que las mujeres consumen 125 mg/d de flavonoides, este estudio señala que la miricetina contribuye en muy baja proporción con el índice de masa corporal. Por otra parte, la principal fuente para consumir miricetinas son el té, la cebolla y los pueros y aunque la relación entre el consumo de miricetina y obesidad es limitada, se ha establecido con certeza que la miricetina mejora el perfil metabólico y contribuye a mantener el peso en mujeres<sup>26</sup>. Por otra parte, en estudios realizados en Hong Kong en mujeres de 50 a 61 años, se determinó que el consumo de isoflavonas provenientes de la soya es de 7.8 mg y que las mujeres no cantonesas son las que tienen un mayor consumo 10 mg. El tofu aporta el 21% del consumo de isoflavona, seguido del frijol (7.1%), la leche de soya (6.3%), leche de soya



procesada en casa (6.2%) y la leche soya genérica ( 5.8%). Estos cinco alimentos combinados contribuyen a un 46% del total de isoflavonas diarias.<sup>27</sup>

En Australia<sup>28</sup> se reporta que la manzana es la principal fuente de quercetina, entre los jóvenes de 16 a 18 años. La manzana, albaricoque y las uvas son la fuente principal de epicatequina, catequina en niños y en los adultos es sustituida por el consumo de vino. El vino es la fuente principal de malvidina. El consumo de flavonoides es de 351 mg por persona /d. de los cuales el 75% corresponde a flavan-3-oles. El té negro es la principal fuente de representando el 70%. En México, se encontró un reporte que en un estudio realizado en la Ciudad de México, el cual señala que la principal fuente de consumo de polifenoles son los mangos, peras y frijoles. Los resultados obtenidos de este estudio muestran que secoisolariciresinol y cumestrol reducen el riesgo de padecer cáncer gástrico por nitrosilación endógena.<sup>29</sup>

### **1.8 Afecciones Coronarias.**

En las décadas de los cincuenta y setenta se llevaron a cabo estudios epidemiológicos en diversos países de Europa, Estados Unidos y Japón, en los que se demostró que existe una relación inversamente proporcional entre la mortalidad por afección coronaria y el consumo de diario de flavonoides. Su mecanismo como agente cardioprotector se debe a sus propiedades antioxidantes, vasodilatadora y como regulador de la actividad plaquetaria<sup>30-32</sup>. La quercetina, regula la disfunción endotelial, disminuye la producción de radicales libres plasmáticos y regula la hipertensión<sup>33-35</sup>. Extractos vegetales obtenidos de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) promueven una reducción del 11.2% en presión sistólica y 10.7% en la presión diastólica en pacientes que padecen de hipertensión, después de 12 días de iniciar el tratamiento<sup>36</sup>.

Otros autores confirmaron los hallazgos anteriores y caracterizaron que la administración de *Hibiscus sabdariffa* en infusiones de 10g/1.5 L por un periodo de 4 semanas causa una importante disminución en la presión diastólica y sistólica, de 139.05 a 123.73 mm Hg y de 90.81 a 79.52 mm Hg respectivamente.



Estudios DASH (Dietary Approaches to Stop Hypertension) (Enfoques Alimenticios para Detener la Hipertensión), muestran que el consumo estandarizado de antocianidina a 9.6 mg por día, provoca una disminución sustancial de la presión arterial y de lípidos séricos. La dieta DASH es rica en flavonoles, flavanonas, flavan 3-oles, beta-caroteno, beta-criptoxantina, licopena, luteína y fitosteroles<sup>37</sup> por este motivo los beneficios de esta dieta son atribuibles a estos compuestos polifenólicos<sup>38</sup>. A nivel molecular se ha demostrado que la quercetina, disminuye la presión arterial regulando la expresión del canal de sodio epitelial (EnaC) que participa en la regulación de la presión sanguínea mediante el control de la reabsorción de sodio en los tubos renales<sup>39,40</sup>.

En Estados Unidos se mostró que el jugo de uva reduce la presión arterial en pacientes hipertensos. La administración de 5.5 mL/kg de peso al día, de jugo de uva Concord, promovió una disminución en la presión sistólica y diastólica<sup>41,42</sup>.

El tratamiento con una proantocianidina obtenida de una pino originario de Europa, *Pinus maritima* en pacientes hipertensos, disminuyeron las concentraciones plasmáticas de endotelina-1 y de angiotensina II y aumentaron los niveles de óxido nítrico plasmáticos, cuando se administraron 100 mg de este compuesto en un periodo de 12 semanas<sup>43</sup>. Por otra parte, los flavanoles presentes en vino tinto, té negro, cerezas y cocoa presentan efectos cardioprotectores en cuanto a la función vascular y a la actividad plaquetaria<sup>44</sup>.

### **1.9 Efecto de los flavonoides como antioxidante.**

Un agente oxidante es un compuesto que previene la oxidación de otras moléculas, que cuando está en concentraciones menores que las de un sustrato oxidable, disminuye la oxidación de dicho sustrato, por este motivo los antioxidantes permiten la protección de estructuras celulares que pudieran ser dañadas por reacciones en las que están involucradas los radicales libres como las membranas, proteínas y ácidos nucleicos.<sup>45</sup> En las membranas los radicales libres ocasionan lipoperoxidación, ocasionado padecimientos cardiovasculares,



generación de cataratas, inmunosupresión y disfunción cerebral.<sup>46</sup> Se ha demostrado que el consumo de infusiones de té negro, verde<sup>47</sup>, lima mexicana<sup>48</sup>, derivados de cítricos<sup>49</sup>, manzana, cereza, jitomate y cebolla actúan como una importante fuente de flavan-3-oles, los cuales estabilizan y desactivan a los radicales libres y son capaces de regular la síntesis de glutatión, que un antioxidante presente en el organismo.<sup>50</sup>

### **1.10 Efecto de los flavonoides en el tratamiento del Cáncer.**

Desde tiempos remotos en la medicina, se establecido que existe una asociación directa entre la dieta y el cáncer. Hallazgos consistentes señalan que la dieta rica frutas y vegetales es determinante en la prevención del cáncer.<sup>51</sup>

Se ha demostrado que cientos de compuestos sintéticos tienen actividades promisorias en prevenir el cáncer. Existe un amplio campo de investigación que señala que antioxidantes y fitoquímicos presentes en las plantas protegen contra acciones genotóxicas y promotoras de procesos cancerosos.<sup>52,53</sup>

Recientemente, algunos investigadores señalan<sup>54</sup> que la combinación del tratamiento con curcumina y las catequinas obtenidas de té verde previenen los efectos de la dimetilhidrazina en prevenir el cáncer de colon en ratones. Así mismo, la genisteína inhibe el crecimiento de células PC3 y la síntesis de matriz metaloproteinasas-2.<sup>55</sup> Otros investigadores<sup>56, 57,58</sup> han identificado efectos quimiopreventivos en componentes de la soya y el té inhibiendo el cáncer de próstata. La combinación de ambos inhibe sinérgicamente el tamaño y la metástasis de los tumores. Polifenoles del té negro y resveratrol protegen contra la carcinogénesis en piel.<sup>59,60</sup> El resveratrol (3,4,5-trihidroxi-trans-stilbeno), es un polifenol presente en las uvas, vino y cacahuates. Entre sus actividades biológicas se encuentran sus actividades anti-cáncer y anti-inflamatorias. El resveratrol posee actividades quimiopreventivas y citostáticas en los tres principales estadios de la carcinogénesis<sup>61</sup> iniciación, promoción y progresión. Sus efectos también han sido reportados en otros tipos de cáncer como el hepático, pulmón y piel<sup>60-63</sup>.



Resveratrol bloquea la activación de la MAPK y la expresión de ciclooxygenasa en cáncer de piel.<sup>64</sup>

En estudios realizados *in vitro*, se ha demostrado que los flavonoides interfieren en el progreso oncogénico, por lo que son útiles en la regulación de las primeras fases del cáncer y en la inhibición del desarrollo de tumores. A la fecha no se tienen conclusiones definitivas en relación al consumo de flavonoides y el control del desarrollo de tumores. La actividad anticarcinogénica de los flavonoides la realizan modulando enzimas hepáticas como el citocromo P450 (que se abrevia como CYP), esta superfamilia de hemoproteínas, es la primera línea de defensa frente a moléculas exógenas que en ocasiones activan mutágenos. Enzimas del citocromo P450 conforman a más de 60 hemo-enzimas endógenas que participan en el metabolismo de drogas. La reacción que más comúnmente desempeña este complejo es la de monooxygenasa, es decir, la inserción de átomos de oxígeno. Estas enzimas están por lo general asociadas a membranas citoplasmática, mitocondrial y del retículo endoplasmático en donde actúan metabolizando compuestos endógenos y exógenos. Participa también en la síntesis de hormonas esteroideas, colesterol y vitamina D3.

La súper familia del citocromo P450 modula el metabolismo de mutágenos, se ha demostrado que los flavonoides son capaces a su vez de regular a P450. Las catequinas presentes en el té pueden inhibir la actividad de las monooxygenasas de P450, en estudios *in vivo* el té negro y el té verde inducen isoenzimas de P450, enzimas de fase II y antioxidantes. El efecto de los flavonoides sobre la regulación del complejo varía según el tejido y la vía de administración de los polifenoles, regulan de igual manera vías de señalización y formación de ácido araquidónico. Flavonoides obtenidos de plantas del género Citrus inducen enzimas detoxificantes de la fase II en hepatocitos.



## 2. Identificación de los Flavonoides

Se utilizan un gran número de métodos analíticos: la resonancia magnética nuclear (RMN), espectrometría de masas, espectrofotometría UV o IR (suele ir acoplada a una separación cromatografía como por HPLC).<sup>66</sup>

### 2.1 Biosíntesis y Funciones

Los Flavonoides se sintetizan en todas las plantas (taxón *Embryophyta*) y también en algunas algas (*Charophyta*), comparten la vía biosintética central, poseen una gran variabilidad en la composición química de sus productos finales y en los mecanismos de regulación de su biosíntesis, por lo que la composición y concentración de flavonoides es muy variable en función de la especie y en respuesta al ambiente. Los flavonoides son sintetizados en el citoplasma y luego migran hacia su destino final en las vacuolas celulares.

Están disueltos como glicósidos en el jugo vacuolar, cloroplastos y membranas. La luz no es esencial para su formación, pero influye de forma cuantitativa.<sup>67-72</sup>

La biosíntesis se inicia por la acción de liasas amoniacales de la fenilalanina y tirosina<sup>73</sup>, estos dos aminoácidos se interconvierten en ácido cinámico y p-hidroxicinámico, que mediante una reducción se convierten en cinamaldehído y p-hidroxicinamaldehído (Fig.3).<sup>74</sup> La vía del ácido shikímico<sup>75</sup> participa en la biosíntesis de la mayoría de los fenoles de las plantas superiores y utiliza como sustratos la eritrosa-4-fosfato (de la vía de las pentosas fosfato) y el ácido fosfoenol-pirúvico (proveniente de la glucólisis). Uno de los productos de esta vía es la fenilalanina, de la que se deriva la mayoría de los fenoles. La fenilalanina, forma parte del metabolismo primario de las plantas y animales, entra en el metabolismo secundario cuando la enzima fenilalanina amonioliasa (PAL) cataliza la eliminación del grupo amino convirtiendo a la fenilalanina en ácido cinámico. La vía del ácido malónico utiliza como sustrato al Acetil-CoA, esta vía es una importante fuente de fenoles en bacterias y hongos, y en las plantas superiores aunque existe no es



muy utilizada. Junto con la vía del ácido Shikímico participa en la biosíntesis de los Flavonoides, la lignina y otros fenoles.<sup>76</sup>

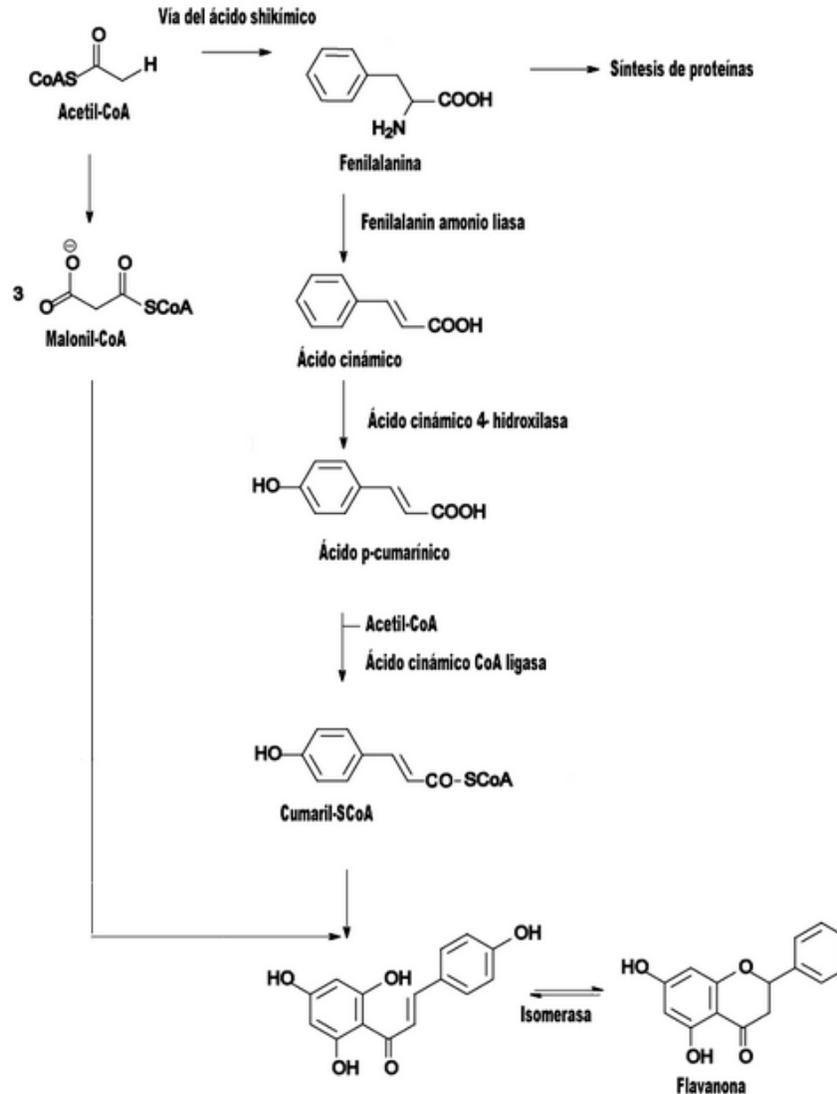


Fig. 3 Biosíntesis de los flavonoides.

Los precursores biosintéticos de los flavonoides son la fenilalanina (que es la molécula que aporta los grupos fenol) y de Acetil-CoA, el cual forma un intermediario denominado malonil CoA (que actúa como precursor en la biosíntesis de ácidos grasos). La fenilalanina puede ser utilizada para la biosíntesis de proteínas o bien por acción de la fenilalanina amonio liasa producir ácido cinámico y de ahí ser sustrato para la biosíntesis del ácido p-cumarínico y por acción del ácido cumárico CoA ligasa sintetizar cumaril S-CoA.y que junto con el malonil CoA se produce la biosíntesis de flavonas.



## 2.2 Extracción y aislamiento

Los flavonoides en general se extraen de muestras secas y molidas. La muestra se desengrasa inicialmente con éter de petróleo ó n-hexano, y el marco se extrae con etanol puro o del 70%.<sup>77</sup> Este último es recomendado para garantizar la extracción de los más polares. El extracto obtenido se evapora con calentamiento no superior a los 50°C y se le hacen particiones sucesivas con éter etílico, acetato de etilo y n-butanol. Los flavonoides apolares quedan en la fase etérea, los medianamente polares en la fase acetato de etilo y los más polares en el n-butanol. Cada una de estas tres fracciones se puede analizar con cromatografía en capa fina (CCF) y HPLC<sup>78</sup> en fase reversa. Para el análisis por CCF de las Agliconas se pueden utilizar mezclas n-hexano/acetato de etilo y cloroformo/acetato de etilo en diferentes proporciones.

Las antocianinas se pueden extraer de tejidos frescos (p. ej. pétalos) por maceración con un solvente ácido como por ejemplo la mezcla metanol-ácido acético-agua (MAW) (11:1:5) ó la mezcla MFW, es decir metanol/ácido fórmico/agua.<sup>79</sup>

## 2.3 Ensayos para la detección de flavonoides por colorimetría.

Los flavonoides se pueden reconocer experimentalmente mediante diferentes ensayos de coloración. A continuación se describen un ensayo general de reconocimiento como es el ensayo de Shinoda, y otros ensayos más específicos para varias clases de flavonoides.<sup>80</sup>

## 2.4 Ensayo de Shinoda

Los flavonoides con el núcleo benzopirona (p. ej. flavonas, flavonoles, flavanonas, etc.)

Producen coloraciones rojizas cuando a sus disoluciones acuosas o alcohólicas se les



adiciona magnesio seguido de HCl concentrado. Aunque no se conoce el mecanismo de esta prueba, es muy utilizada para reconocer esta clase de compuestos.<sup>80</sup>

## 2.5 Ensayo con Zn/HCl

Al remplazar el Mg por el Zn en el procedimiento del ensayo de Shinoda, solamente los

Dihidroflavonoles (o flavanonoles) producen coloraciones rojo-violetas. Las flavanonas y Flavanoles no producen color o producen coloraciones rosadas débiles.<sup>81</sup>

## 2.6 Ensayo de Pacheco

El sólido flavonoides se calienta sobre una llama con unos pocos cristales de acetato de sodio y 0.1 ml de anhídrido acético. Luego con 0.1 ml de ácido clorhídrico concentrado. Los dihidroflavonoles producen un color rojo característico. Las flavonas, chalconas, auronas, flavonoles y flavanonas dan una respuesta negativa.<sup>82</sup>

## 2.7 Ensayo del estroncio-amoniaco

Este ensayo se utiliza para distinguir entre flavonas y flavonoles-3-O-sustituídos 5,6-

Dihidroxilados y 5-hidroxil-6-metoxilados.<sup>83</sup>

## 2.8 Ensayos no colorimétricos. Espectroscopia ultravioleta-visible

Los espectros UV de los flavonoides en metanol presentan bandas características debidas a los sistemas conjugados de los anillos aromáticos.

Las flavonas y flavonoles muestran dos bandas definidas: La banda I, de mayor longitud de onda en el rango 300-390 nm asociada con la funcionalidad cinamoílo, y la banda II, entre 250-280 nm debida al anillo aromático A (funcionalidad



benzoílo), aunque a veces se observan otras bandas de absorción. La posición de la banda I depende del tipo de flavonoides.<sup>84</sup>

## 2.9 Absorción y Metabolización.

Los diferentes grupos de flavonoides poseen distintas propiedades farmacocinéticas.

Los compuestos solubles son metabolizados en el tracto gastrointestinal. Las agliconas

libres, son absorbidas a través de la mucosa del intestino delgado. La transformación de los flavonoides tiene lugar en dos localizaciones: en primer lugar en el hígado, por medio de reacciones de biotransformación de fase I en las que se introducen o exponen grupos polares; en segundo lugar en el colon mediante reacciones de biotransformación de fase II, en las que los microorganismos degradan los Flavonoides no absorbidos.<sup>85-88</sup>

## 3 Los flavonoides y el hígado

Recientemente muchas líneas de investigación están encaminadas a determinar el papel de varias drogas naturales como hepatoprotectores. Una de las más mencionadas y comercializadas es el ginkgo. La droga la constituyen las hojas de *Gingko biloba* (Gingkoaceae) un arbusto ornamental de origen asiático. Estas plantas contienen Flavonoides, Biflavonoides, proantocianidinas y otros. El extracto de ginkgo actúa al nivel circulatorio. Inhibe la agregación plaquetaria.<sup>88-91</sup>

### 3.1 Flavonoides modo de acción en la arteriosclerosis

La arteriosclerosis es el endurecimiento progresivo de las venas y arterias por acumulación de sustancias grasas, por lo tanto afecta la presión arterial y puede llevar a la muerte. Uno de los medios más utilizados para su tratamiento es el manejo de dietas rigurosas y deficientes en grasas y carbohidratos. Sin embargo,



existen investigaciones recientes que demuestran que las personas que consumen habitualmente bebidas como los vinos tintos y el té verde, se ven beneficiados por el hecho de que son menos propensos a ataques cardíacos y prevenir la arteriosclerosis.<sup>92-95</sup>

### **3.2 Flavonoides reguladores de la permeabilidad capilar**

Detienen el flujo de proteínas y células de sangre, pero permiten el flujo de oxígeno, dióxido del carbono y otros nutrientes. Muchos flavonoides incrementan la fortaleza de los vasos capilares, previniéndolos de cerrarse fácilmente. Esto es en parte debido a que ciertos flavonoides tienen una acción similar a la de la vitamina C.

Esto puede ayudar a proteger los vasos sanguíneos contra las infecciones y las enfermedades. También puede relajar el músculo liso del sistema cardiovascular, disminuyendo así la presión de la sangre. Esto también mejora la circulación en el propio corazón. Los flavonoides son antioxidantes y también pueden prevenir la oxidación del colesterol LDL, previniendo el aumento de placa arterioesclerótica. También pueden detener el agrupamiento de las plaquetas de sangre, reduciendo la coagulación de la sangre y el daño de los vasos sanguíneos.<sup>96,97</sup>

### **3.3 Flavonoides mediadores de la inflamación**

La inflamación una reacción defensiva del organismo ante una lesión. La quercetina está indicada en cualquier condición inflamatoria ya que inhibe la formación de prostaglandinas y leucotrieno, así como la liberación de histamina.

Las propiedades antiinflamatorias de la miel y propóleos, se deben a la presencia de flavonoides que inhiben el desarrollo de la inflamación provocada por una variedad de agentes. Entre estos flavonoides, la galangina, es capaz de inhibir la ciclooxigenasa (COX) y la actividad lipo-oxigenasa, lo que limita la acción de la poligalacturonasa, y la reducción de la expresión de la isoforma inducible de la COX-2. Otro compuesto, éster del ácido cafeico fenetil (CAPE), también presentes en el propóleos, muestra actividad anti-inflamatoria a través de la inhibición de la



liberación de ácido araquidónico de la membrana celular, lo que conduce a la supresión de la COX-1 y la actividad de la COX-2 e inhibe la activación de la expresión génica de la COX-2.<sup>99,100</sup>

Crisina, otro flavonoides presente en la miel y propóleos, también muestra actividad anti-inflamatoria. Su mecanismo de acción está relacionado con la inhibición de las actividades pro-inflamatorias de la COX-2 y la NOS.<sup>100-104</sup>

### 3.4 Efecto de los flavonoides en sistemas enzimáticos

Se ha demostrado que, *in vitro*, los flavonoides afectan la actividad de diversos sistemas enzimáticos, aunque existen evidencias de que también pueden hacerlo *in vivo*, por lo que es pertinente indicar los efectos de los flavonoides sobre aquellos sistemas enzimáticos que pueden ser potencialmente blancos terapéuticos.

### 3.5 Cinasas

Una cinasa es una proteína que cataliza la transferencia de un grupo fosfato proveniente de una molécula de trifosfato de adenosina (ATP) hacia una molécula específica por lo general una proteína a la que le transfiere el grupo fosfato en los aminoácidos treonina, tirosina y serina. La proteína cinasa C (PKC) es una enzima que fosforila residuos de serina y treonina, ampliamente distribuida en los mamíferos, siendo dependiente de  $Ca^{2+}$  y de fosfolípidos, con una participación activa en funciones celulares tales como mitogénesis, procesos secretorios, funcionalidad de las células inflamatorias, funcionamiento de los linfocitos T y promoción de tumores.<sup>105-107</sup>

Se ha demostrado que la PKC puede ser inhibida *in vitro* por ciertos flavonoides, como la quercetina que inhibe la transformación de fibroblatos de ratón *in vitro*.<sup>108</sup> Experimentos realizados por Ferriola y cois.<sup>109</sup> demostraron que los flavonoides fisetina, quercetina y luteolina fueron los inhibidores más activos de la PKC de cerebro. En experimentos en los cuales emplearon diferentes sustratos proteicos



(histona y protamina) así como diversos activadores (diacilglicerol y acetato de tetradecanoilforbol), mostraron que tanto la fisetina como la luteolina inhibían el sitio de unión del ATP en la unidad catalítica de la PKC. Otras enzimas que emplean ATP como sustrato fueron inhibidas por flavonoides mediante la unión competitiva del flavonoides al sitio de unión del ATP, mostrando además que la adición de un grupo hidroxilo en la posición 3 elimina esta actividad inhibitoria.<sup>110</sup> La proteína cinasa activada por mitógeno (MAP) en células de cáncer epidérmico humano es fuertemente inhibida por la quercetina a una concentración 30  $\mu\text{M}$ .<sup>111</sup>

La cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK) cataliza la fosforilación de las cadenas ligeras de miosina en varios tipos celulares, la cual es esencial para el desarrollo de la actividad tensora en las células de músculo liso, así como también para el movimiento y la migración de otras células. Por ello, resulta interesante observar que el kaempferol actúa como un inhibidor relativamente específico ( $\text{IC}_{50} = 0.45 \mu\text{M}$ ) de MLCK purificada de aortas bovinas.<sup>112</sup> siendo 30 veces más activo para esta cinasa que para otras. Como ya se ha visto en otros sistemas con diferentes flavonoides, el kaempferol actúa competitivamente con el ATP. La MLCK purificada de aves también fue inhibida por varios flavonoides, especialmente los que posean una doble ligadura entre los carbonos 2 y 3 así como una polihidroxilación en dos de los tres anillos.<sup>68</sup> En contraparte, tanto la metoxilación como la glicosilación, por separado, abaten considerablemente esta actividad.<sup>112</sup>

### **3.6 ATPasas**

Los flavonoides pueden afectar la función de la ATPasa dependiente de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , la ATPasa mitocondrial y la ATPasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ .<sup>113</sup> La ecto-ATPasa dependiente de  $\text{Mg}^{2+}$  de leucocitos humanos es inhibida por quercetina.<sup>114</sup>



### **3.7 FosfolipasaA<sub>2</sub>**

La fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) es una enzima involucrada en procesos de activación celular, catalizando la hidrólisis de fosfolípidos esterificados en el carbono 2 del esqueleto de glicerol. El ácido araquidónico es esterificado en esta posición, y la PLA<sub>2</sub> libera al ácido araquidónico que será posteriormente metabolizado por la vía de la ciclooxigenasa (COX) y la lipooxigenasa (LO). Adicionalmente, la PLA<sub>2</sub> juega un papel fundamental como mediador de los procesos inflamatorios intra y extracelulares. La quercetina es un inhibidor efectivo de la PLA<sub>2</sub> en leucocitos humanos y de conejo. La quercetagina, el kaempferol-3-(9-galactósido) y la escutelareína inhiben la PLA<sub>2</sub> sinovial humana con valores de IC<sub>50</sub> que van de 12.2 a 17.6 µM.<sup>115</sup>

### **3.8 Lipooxigenasas y ciclooxigenasas**

La liberación del ácido araquidónico de los fosfolípidos de membrana, se efectúa por acción de la lipooxigenasa en el músculo liso con lo que provoca la síntesis de leucotrienos vasoactivos (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>, LTB<sub>4</sub>), los cuales están íntimamente relacionados con respuestas de tipo inflamatorias, alérgicas y asmáticas, así como en otros procesos fisiológicos y patológicos. Yamamoto y cois.<sup>83</sup> estudiaron el efecto de varias benzoquinonas, así como de diversos flavonoides, sobre algunas enzimas de la vía biosintética de los leucotrienos vasoactivos, encontrando que la 3'-4'-5'-trihidroxi-6,7-dimetoxiflavona es un potente inhibidor de la 5-Lipooxigenasa (IC<sub>50</sub> = 0.1 µM). Para lograr tal inhibición, se requiere que el flavonoides posea una combinación de propiedades quelantes y reductoras de hierro, lo que se logra con flavonoides polihidroxilados.<sup>116</sup> Así, la inhibición selectiva de estas vías enzimáticas podría representar una esperanza terapéutica para la introducción de fármacos más eficaces y seguros para el tratamiento del cáncer, de procesos inflamatorios, lo cual deteriora la función endotelial, del mal de Alzheimer y de procesos alérgicos, entre otros.



### **3.9 Fosfolipasa C (PLC)**

No se han reportado los efectos directos de los flavonoides sobre la PLC. Enzima responsable de la hidrólisis del fosfatidilinositol bifosfato en diacilglicerol e inositol trifosfato. Se ha reportado que algunos flavonoides inhiben a la PLC isoforma gamma.<sup>117</sup>

### **4. Fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos**

Los nucleótidos cíclicos monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) y monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) median diversos procesos biológicos a través de su capacidad para estimular a las proteínas cinasas dependientes de nucleótidos cíclicos, las cuales, en turno, fosforilan a los sustratos proteicos celulares y desencadenan respuestas específicas. El AMPc y el GMPc se forman a partir de ATP y GTP mediante la actividad catalítica de las adenilato y guanilato ciclasas, respectivamente, estimuladas a su vez, por diversos agentes. Tanto el AMPc como el GMPc participan en la regulación de procesos celulares, tales como la división celular, la contractilidad del músculo liso, funciones secretoras, procesos inmunológicos y agregación plaquetaria, por nombrar sólo algunas funciones. Esta actividad se interrumpe por acción de la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos (PDE). La inhibición de la PDE por flavonoides ha sido ampliamente descrita proponiendo como requerimientos estructurales para esta inhibición la presencia de un núcleo flavona, flavanol. Se ha propuesto que la capacidad inhibitoria de la PDE por flavonoides se debe a la semejanza estructural con el anillo de pirimidina del AMPc y a la presencia del anillo de piranona en los flavonoides activos.<sup>91</sup> Por lo anteriormente expuesto, las PDE son un blanco celular muy importante, y dado que algunos flavonoides aislados y purificados de plantas muestran una inhibición selectiva, éstos podrían servir como agentes vasodilatadores para una alternativa de tratamiento para padecimientos tales como angina de pecho, hipertensión e, inclusive, disfunción eréctil.<sup>118</sup>



#### **4.1 Adenilato ciclasa**

Se ha reportado que compuestos tales como flavona, crisina, prunetina y apigenina, disminuyen la actividad plaquetaria inducida por prostaciclina<sup>119</sup>, un efecto que ha sido atribuido a la inhibición de la adenilato ciclasa, por lo que inhibidores selectivos de esta enzima podrían presentar una notable actividad antiagregante plaquetaria.

#### **4.2 Sialidasa**

La sialidasa (neuraminidasa) cataliza la hidrólisis de residuos del ácido siálico a partir de siaglicoconjugados, ejerciendo un efecto sobre funciones biológicas ante la presentación de antígenos y de receptores. La sialidasa de hígado de ratón es inhibida no competitivamente por la isoscutelareína-8-O-glucorónido ( $IC_{50}=40 \mu M$ ), mientras que la sialidasa del virus de la influenza es inhibida débilmente.<sup>120-122</sup> En ambos casos se observó que los núcleos estructurales flavanona y chalcona carecían de esta actividad. En otros estudios con la sialidasa del virus de influenza, se encontró que los compuestos trihidroxilados (como por ejemplo la 5,7,4'-trihidroxi-8-metoxiflavona) son moderadamente activos inhibiendo la infección por este virus en un modelo que emplea células renales de perro, así como también la replicación del virus en embriones de pollo, por lo que algunos flavonoides podrían ser modificados estructuralmente para generar compuestos con actividad antiviral.

#### **4.3 Óxido nítrico sintasa (NOS)**

El óxido nítrico (NO) es un mediador químico que participa en la relajación del músculo liso, la lisis de células tumorales, la destrucción de microorganismos, entre otros procesos. Se sintetiza a partir de la conversión del aminoácido L-arginina, en presencia de oxígeno molecular, a L-citrulina, siendo un subproducto de esta reacción el NO. Esta reacción es catalizada por un sistema enzimático denominado óxido nítrico sintasa, siendo para el caso que nos ocupa las



isoformas inducible (iNOS) y endotelial (eNOS), el blanco molecular más importante para los flavonoides. A este respecto, hay una controversia muy interesante, pues por una parte, se ha acumulado evidencia de que la iNOS de células C6 derivadas de gliomas" puede ser inhibida por la genisteína y por compuestos polifenólicos capaces de atenuar la producción de NO en cultivos celulares C6 de astrocitos.<sup>123</sup> Adicionalmente, se ha reportado que los flavonoides quercetina, galato de epigallocatequina, morina, apigenina, taxifolina, fisetina y catequina inhiben la actividad de 3 isoformas de la NOS. Sin embargo, la evidencia más reciente al respecto apunta a que extractos y flavonoides (luteolina y cinarosida), obtenidos de *Cynara scolymus* L. (alcachofa), son capaces de incrementar la actividad del promotor de la eNOS así como la expresión del RNAm de esta enzima, incrementando así la producción de óxido nítrico en cultivos celulares de células endoteliales humanas. También se ha reportado que la (-)-epicatequina, purificada de extractos de té verde, a una concentración de 100  $\mu\text{M}$ , es capaz de generar una relajación dependiente del endotelio, la cual cursa con incrementos sustanciales en la producción de NO y GMPc. Lo que sugiere, que el amplio abanico de efectos de los flavonoides sobre los sistemas enzimáticos que mencionamos en líneas anteriores de deba a la presencia de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3 del núcleo flavonoides, y de una hidroxilación del anillo B, lo que favorece la interacción estereoespecífica de estas moléculas con los sitios enzimáticos activo la unión de los flavonoides a las proteínas, o bien, la formación de complejos estables de proteína flavonoides, haciendo inaccesibles estos sitios activos.<sup>106,107</sup>

#### **4.4 Efectos sobre la Activación de factores de transcripción**

Hay varios pasos críticos en los que los flavonoides son capaces de modular la cascada de eventos moleculares que conducen a la sobreexpresión de la iNOS o COX-2. Estas incluyen la inhibición de la proteína quinasa C, la fosfolipasa C y A2 y fosfodiesterasas, de modulación indirecta de iNOS por la inhibición de la ciclooxigenasa y / o vías de la lipooxigenasa, la inhibición de factores de



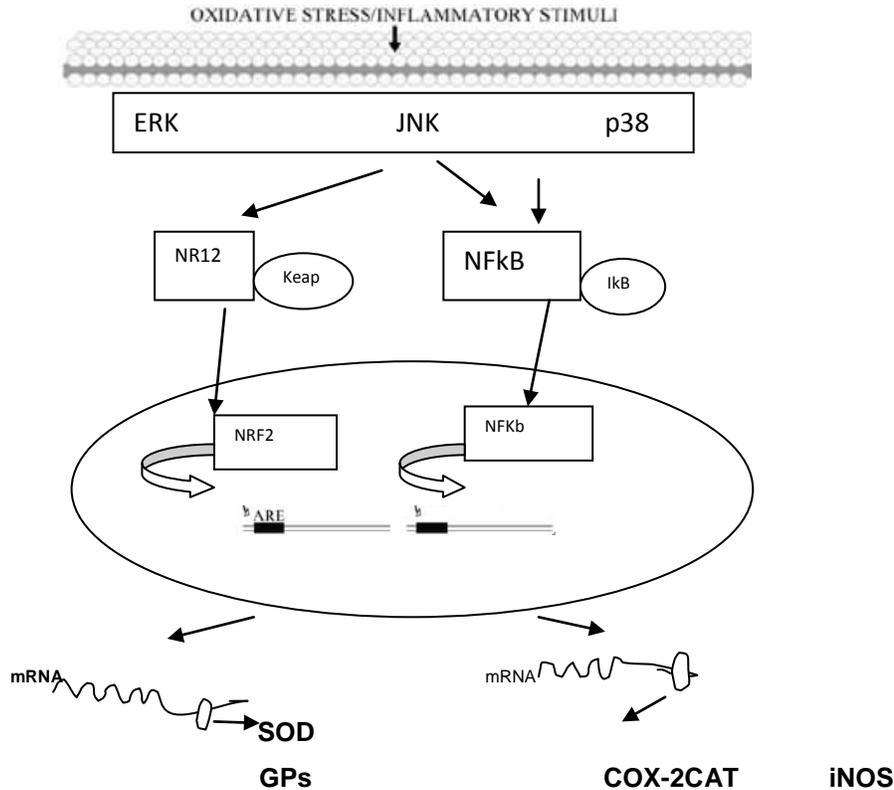
transcripción AP-1 y C / EBPd, o los efectos sobre el regulador del interferón factor (IRF) -1 y Akt vía de señalización. En las alteraciones que ocasionan inflamación, los macrófagos, liberan citoquinas, TNF y generan ROS. Los ROS contribuyen a la aparición del estrés oxidativo, sobre todo en aquellos casos en que hay un desequilibrio enzimático y no enzimático (glucagón, vitaminas, y, probablemente, flavonoides) existen defensas antioxidantes.<sup>33,34</sup> En los casos con estrés oxidativo, que puede ser un estímulo importante para la activación de NF-kappaB, que aparece en forma latente en el citoplasma de las células madre, formando un complejo con sus inhibidores, el IkappaBs (IkappaB $\alpha$  y IkappaB $\beta$ ). Cuando la célula es estimulada, NFkappaB activa el factor por medio de la fosforilación y la degradación de las proteínas IkappaB y migra al núcleo, estimulando la expresión de sus genes diana. La fosforilación de IkappaB implica dos quinasas IkappaB, IKK $\alpha$  y IKK $\beta$ . La degradación de IkappaB $\alpha$  se asocia con rápidos cambios en la inducción de NF-kappaB, mientras que la degradación de IkappaB $\beta$  se asocia con una activación prolongada de NF-kappaB. Una vez activado, NFkappaB pueden estimular la expresión de iNOS, con el consecuente aumento de óxido nítrico. La reacción de éste con ROS, tales como el anión superóxido, produce la formación de peroxinitrito, que, además, contribuye al daño celular.<sup>125-129</sup>

#### **4.5 Los Flavonoides moduladores de las vías de señalización**

Diversos estudios han demostrado que los flavonoides son capaces de modular la vía de señalización NF-kappaB durante la inflamación y modificar a través de este la expresión de genes implicados en el proceso inflamatorio (Fig 4).<sup>125-129</sup> Sólo algunos flavonoides como kaempferol suprimen la actividad de diversas tirosin cinasas mediada por las vías de señalización en las células de cáncer de próstata o inhibir la producción de TNF-alfa y TNF inducida por traslocación de NF-kappaB en los osteoblastos. Por el contrario, tanto la quercetina como el kaempferol disminuye la degradación de IkappaB a través de la regulación de los miembros del complejo IKK.<sup>125-129</sup> Por otra parte, la quercetina inhibe la



transcripción del gen iNOS inducida por LPS.<sup>125</sup> La curcumina disminuye la inflamación hepática<sup>46,47</sup> También se ha reportado que el tratamiento con antocianina, promueve la inhibición de la translocación de NF-kappaB puede contribuir a la inhibición de la expresión de COX-2 en células RAW 264.



**Figura 4 Efecto del estrés oxidativo en la expresión de moléculas inflamatorias.**

El estrés oxidativo promueve la activación de proteínas cinasas como JNK, ERK y p38, que activan a NFkB mediante la fosforilación de IκB, lo que provoca la translocación de NFkB y la expresión de moléculas involucradas en respuestas inflamatorias entre las que se encuentran SOD; superóxido dismutasa; GF, factores de crecimiento; CAT, catalasa; COX-2, iNOS, CRP, proteína C reactiva.

#### 4.6 Flavonoides en la caries.

La caries dental es una enfermedad infecciosa, de naturaleza multifactorial, que depende de diversos factores entre los que se encuentran, la dieta, nutrición, la flora oral residente, y la respuesta del huésped. Como todas las enfermedades



infecciosas está asociada al metabolismo de carbohidratos de las bacterias debido a que la acidificación de la placa provoca la desmineralización del esmalte.<sup>124-127</sup> Los factores de virulencia que contribuyen al desarrollo de la caries consisten en la formación de biopelículas con tolerancia ácida debido a la producción de ácidos provenientes de los carbohidratos.<sup>128,129</sup> Sin embargo y a pesar de la complejidad de la placa dental, los estreptococos orales entre los que se encuentran *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*, se consideran como los agentes etiológicos primarios de la caries dental.<sup>124,133</sup> Ha sido ampliamente documentada la capacidad de *S. mutans* en producir glucosiltransferasas que sintetizan polisacáridos intra y extracelulares. Los polisacáridos extracelulares en particular los glucanos insolubles, intervienen en la adherencia de *S. mutans* con otras especies de bacterias lo que contribuye a la formación de la biopelícula.<sup>134,135</sup> Otro factor de virulencia importante en *S. mutans* es el sistema  $F_1F_0$ -ATPasa, la agmatina deaminasa, enolasa y lactato deshidrogenasa. El sistema ATPasa -  $F_1F_0$  bombea protones de la célula y de esta manera contribuye al mantenimiento de pH ácido.<sup>126, 136,137,138</sup> Otro mecanismo, es de naturaleza inducible que consiste en la producción de álcalis por el sistema agmatina deaminasa que aumenta la adaptación de *S. mutans*, contribuyendo de esta forma a su persistencia y patogénesis.<sup>139,140</sup> Por otra parte, la enolasa es responsable de la producción de fosfoenolpiruvato que funciona como un componente clave en el sistema Fosfoenolpiruvato: Carbohidrato fosfotransferasa. Finalmente, la enzima lactato deshidrogenasa, es la responsable de la producción de ácido láctico que contribuye en la virulencia de *S. mutans*.<sup>141</sup> Mutantes de *S. mutans*, deficientes en factores de virulencia específicos, son más sensibles a estrés y son menos cariogénicos.<sup>142-145</sup>

Por otra parte las aplicaciones tópicas de fluoruro se utilizan como un agente cariostático efectivo<sup>146-148</sup> ya que provoca la inhibición de la desmineralización y el incremento en la remineralización, así como la inhibición de la actividad bacteriana.<sup>147</sup> Sin embargo, la presencia de altas concentraciones de bacterias y padecimientos como la xerostomía, son insuficientes para prevenir el avance de la



caries. Así mismo, las consecuencias resultantes de la aplicación tópica de fluoruro conlleva a problemas de fluorosis que sin duda es un problema de salud pública en la población.<sup>147,149</sup>

Por este motivo, es importante el desarrollo de nuevos agentes que tengan actividades bacteriostáticas, una de estas alternativas consisten en evaluar el efecto de moléculas provenientes de la medicina natural. Como las infusiones de té de la planta *Camellia sinensis* (family: Theaceae).<sup>150</sup>

Estudios realizados por diferentes investigadores, señalan que las catequinas presentes en el té. Tienen componentes que actúan como efectivos antibacteriales, en particular, los polifenoles presentes el té verde que actúan contra diferentes especies de streptococos orales.<sup>151-157</sup> Estudios realizados en animales muestran que extractos provenientes del té previenen la pérdida de las piezas dentales.<sup>158-161</sup>

Estudios clínicos, señalan que beber té libre de azúcar está asociado con bajos niveles de caries en humanos.<sup>162-164</sup> Entre los mecanismos asociados a las catequinas presentes en el té se encuentra su actividad contra la caries, asociada a la inhibición del crecimiento bacterial, pérdida de la adherencia, disminución en la producción de ácidos y de actividades enzimática como las glucosiltransferasas y la amilasa.<sup>165-168</sup>

#### **4.7 Enfermedad Periodontal**

Las infecciones periodontales son un conjunto de enfermedades localizadas en las encías y estructuras de soporte del diente. Están producidas por ciertas bacterias provenientes de la placa bacteriana. Estas bacterias son esenciales para el inicio de la enfermedad, pero existen factores predisponentes del hospedador y microbianos que influyen en la patogénesis de la enfermedad. La microbiota bacteriana periodontopatógena es necesaria pero no suficiente para que exista enfermedad, siendo necesaria la presencia de un hospedador susceptible.



## 4.8 Clasificación de la enfermedad periodontal

Durante muchos años, la Asociación Americana de Periodoncia ha clasificado las enfermedades periodontales en gingivitis y periodontitis (suave, moderada, severa y refractaria), en función de la región periodontal afectada. En 1989 en el World Workshop on Clinical Periodontics se estableció una nueva clasificación caracterizada por la incorporación de nuevas entidades nosológicas (tabla 1).

**TABLA 1. CLASIFICACIÓN DEL WORD WHORKSHOP.**

<b>Gingivitis</b>
1. Asociada a placa
2. Gingivitis Ulcero Necrotizante Aguda
3. Gingivitis Inducida por hormona esteroides
4. Agrandamiento Gingival inducida por fármacos
5. Gingivitis asociada a desordenes sanguíneos deficiencias nutricionales tumoresfactores genéticos
6. Gingivitis descamativa

Posteriormente, en el Primer Workshop Europeo de Periodoncia (1993) se propone una clasificación más simple de las enfermedades periodontales basada principalmente en los factores causales asociados a las mismas y en la diferente respuesta del hospedador.

Estas clasificaciones han sido ampliamente empleadas tanto por investigadores, sin embargo, presentan una serie de fallos. Por ello, en el World Workshop in Periodontics de 1996 se enfatiza la necesidad de revisar las Clasificaciones existentes y crear una nueva.(tabla 2)

**TABLA 2. CLASIFICACIÓN EUROPEAN WORKSHOP, 1993**

<b>Periodontitis</b>
1. Periodontitis del adulto
2. Periodontitis de comienzo temprano:
2.1. Periodontitis prepuberal
2.1.1. Localizada
2.1.2. Generalizada
2.2. Periodontitis juvenil
2.2.1. Localizada
2.2.2. Generalizada
3. Periodontitis a enfermedades sistémicas
4. Periodontitis ulcerativa necrotizante
5. Periodontitis refractaria

En 1997, la Asociación Americana de Periodoncia decide formar un comité encargado de esta tarea, y es en el International Workshop for a Clasification of Periodontal Diseases and Conditions (1999) cuando se aprueba la clasificación propuesta por dicho comité (tabla 3).

#### **4.9 Clasificación de la enfermedad periodontal de acuerdo a la Asociación Dental Americana**

Se basa en la severidad de la perdida de inserción. El clínico usa la información clínica radiográfica obtenida y clasifica al paciente dentro de cuatro casos.

Caso tipo I: Gingivitis

Caso tipo II: Periodontitis leve

Caso tipo III: Periodontitis moderada

Caso tipo IV: Periodontitis Avanzada

**TABLA 3. CLASIFICACIÓN EUROPEAN DEL WORD WHORKSHOP.**

<b>A. Descriptores primarios</b>
a. Periodontitis del adulto
b. Periodontitis de aparición temprana
c. Periodontitis necrotizante
<b>B. Descriptores secundarios</b>
a. Distribución de la dentición
b. Ritmo de progresión
c. Respuesta del tratamiento
d. Relación con enfermedades sistémicas
e. Características microbiológicas
f. Grupo étnico
g. Otros factores

## 5. Flavonoides en la Enfermedad Periodontal

Apenas resulta necesario subrayar el papel que tiene el estrés oxidativos en el desarrollo de procesos inflamatorios y como el enfermedad periodontal en un padecimiento de naturaleza inflamatoria, muchas investigaciones se han enfocado en desentrañar la relación entre el estrés oxidativo con esta afección, ya que ocasiona la pérdida de la homeostasis celular y portan el desarrollo de enfermedades.

### 5.1 Radicales libres

El estrés oxidativo genera un conjunto de moléculas denominadas radicales libres, que son aquellas moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera una alta inestabilidad. En la molécula de ( $O_2$ ) se conocen los siguientes RL



o también llamados especies reactivas: Anión superóxido -  $O_2^-$ , -  $H_2O_2$ ,  $OH^-$ , oxígeno (simple) -  $O_2^{-1}$ . El  $H_2O_2$  no es un radical libre, pero por su capacidad de generar el HO en presencia de metales como el hierro, lo ha calificado en esta familia. Una característica fundamental de las reacciones de los radicales libres es que actúan como reacciones en cadena, donde la reacción de un radical genera otro de forma consecutiva

## 5.2 Fuentes de Radicales Libres

La mitocondria constituye una importante fuente de radicales libres ya que a partir de la cadena de electrones genera un gradiente eléctrico que aporta la energía necesaria para formar ATP a partir de la reducción tetravalente del  $O_2$  en agua. Los peroxisomas, organelos del citosol son muy ricos en oxidasas que generan  $H_2O_2$  el cual es depurado por enzimas específicas (catalasas) y transformado en agua.

- A. Los leucocitos polimorfonucleares constituyen una fuente importante de radicales libres cuando se activan por diversas proteínas que actúan específicamente sobre ellos (Ejemplo: interleucinas etc.). Los leucocitos poseen en su membrana la enzima NADPH oxidasa generadora del  $O_2^-$  que en presencia de hierro se transforma en el altamente tóxico  $^1HO$ . Esta situación se da particularmente en los procesos inflamatorios.
- B. Enzima xantina deshidrogenasa. Esta enzima predomina en los endotelios, normalmente depura la xantina formando ácido úrico. Cuando vira a la forma oxidasa por isquemia, estimulación por  $Ca^{2+}$  y generación  $O_2^{-3}$ .

Los radicales libres se forman en condiciones fisiológicas en proporciones controlables por los mecanismos defensivos de las células. En situaciones patológicas esta producción se incrementa sustancialmente ingresándose al estado de estrés oxidativo. Es por esto que podemos definir que el estrés oxidativo es la condición en la cual la producción de radicales libres aumenta de manera



excesiva sobrepasando la capacidad protectora del sistema de defensas antioxidantes del organismo como resultado de este desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes se producen efectos tóxicos y se generan múltiples patologías.

### **5.3 Factores orgánicos y metabólicos**

- Dieta hipercalórica e insuficiente en antioxidantes
- Diabetes
- Procesos inflamatorios y traumatismos
- Fenómeno de isquemia reperusión
- Ejercicio extenuante

### **5.4 Daños biomoleculares en el Estrés Oxidativo**

Los siguientes factores son imprescindibles para entender el daño biomolecular que sufren las células al entrar en contacto con un radical libre

- a) El desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes producen los efectos tóxicos.
- b) La producción de radicales libres (RL) es un fenómeno continuo con implicaciones en el envejecimiento y la carcinogénesis.

Otra molécula que es dañada por los RL es el ADN. El daño a los ácidos nucleicos produce bases modificadas, lo que tiene serias consecuencias en el desarrollo de mutaciones y carcinogénesis por una parte, o la pérdida de expresión o síntesis de una proteína por daño al gen específico.

El daño a biomoléculas determina que los RL se hallen implicados en la génesis o exacerbación de numerosos procesos. Arterioesclerosis, infarto de miocardio, cardiopatía alcohólica, diabetes, enfermedad de Parkinson, Alzheimer, neuropatía alcohólica, isquemia o infarto cerebral, cataratas, daño degenerativo de la retina, enfisema, cáncer de pulmón, síndrome respiratorio del adulto, artritis reumatoide, úlcera gastroduodenal, displasias, tumores, síndromes autoinmunes y enfermedad periodontal.



Un ejemplo es la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) esta participa en la génesis de los ateromas que a su vez provocan isquemia coronaria esto se manifiesta como infartos, embolias, arterosclerosis etc.

## 5.5 Sistema de defensas antioxidantes

Todos los seres vivos que utilizan el oxígeno para generación de energía, liberan RL. A estas defensas se las designa antioxidantes y se considera como tal a cualquier sustancia que en concentraciones normales posee una afinidad mayor que cualquier otra molécula para interaccionar con un RL. Antioxidante a toda sustancia que hallándose presente a bajas concentraciones respecto a las de un sustrato oxidable (biomoléculas), retarda o previene la oxidación de dicho sustrato. El antioxidante al reaccionar con el RL le cede un electrón oxidándose a su vez y transformándose en un RL débil, no tóxico y que, en algunos casos como la Vitamina E, puede regenerarse a su forma primitiva por la acción de otros antioxidantes.

## 5.6 Clasificación de los antioxidantes

Exógenos: Aquellos que ingresan a través de la cadena alimentaria: vitamina E, vitamina C, betacaroteno, flavonoides, licopeno.

Endógenos: Aquellos que son sintetizados por la célula: glutatión, coenzima Q, ácido tióctico, enzimas como (SOD), catalasa, glutatión peroxidasa y sus cofactores también conocidos como oligoelementos: selenio, hierro, cobre, zinc, manganeso. En el plasma sanguíneo también encontramos la bilirrubina, transferrina, lactoferrina, ceruloplasmina y albúmina como elementos antioxidantes.

La vitamina E, el betacaroteno y el licopeno actúan en el medio liposoluble de la célula y su absorción y transporte se halla muy vinculado con el de los lípidos. La vitamina E es considerado el más importante protector de las moléculas lipídicas.



Calculándose que cada molécula de la misma es capaz de proteger 500 moléculas de fosfolípidos. Cada antioxidante posee una afinidad hacia un determinado RL.

### **5.7 Estrés oxidativo y su relación con el proceso inflamatorio acción de los RL en los sistemas biológicos.**

Los radicales libres son un mecanismo de gran importancia en la defensa contra las bacterias. También ha podido comprobarse que estos reactivos pueden actuar como mensajeros e inductores genéticos o provocar el desencadenamiento de la síntesis de ciertas citocinas. La propia reactividad del  $O_2$  hace que sea capaz de interactuar con otra sorprendente molécula reguladora inorgánica, conocida como factor de regulación derivado del endotelio y por lo tanto participa en el tono de contracción de la musculatura lisa de los vasos. Por otra parte, la inflamación es un mecanismo de defensa en contra de patógenos, Sin embargo, los altos niveles de estas moléculas que junto con enzimas hidrolíticas, citocinas y lípidos activos provocan respuestas que conllevan a procesos de inflamación crónica y en ocasiones provoca daños tisulares severos.<sup>169</sup>

La presencia de infiltrado inflamatorio es una característica constante en la enfermedad periodontal. De esta forma, un mecanismo defensivo, bajo la interacción de diferentes factores, puede tomarse en lesivo para los tejidos periodontales, y por lo tanto están involucrados en la etiopatogenia de la enfermedad periodontal inflamatoria.

### **5.8 Papel de las especies reactivas del oxígeno**

Se considera que la fuente primaria de Especies Reactivas del Oxígeno en esta enfermedad es la activación de los polimorfonucleares. Estos son los leucocitos predominantes en el epitelio del surco gingival y el tejido conectivo adyacente. Bajo ciertas condiciones los factores locales (depósito dental, placa) conducen la migración de los neutrófilos de la gíngiva y el fluido gingival y provocan una



ruptura de los tejidos blandos del periodonto; esta ruptura es inducida por las ERO generadas por PMN activados ( $\text{HOCl}^\cdot$ , radical anión superóxido, entre otros).

La lipoperoxidación, la oxidación de grupos funcionales de aminoácidos de componentes de la matriz extracelular y la despolimerización las cadenas constituidas de glucosaminoglucano por la acción de los radicales libres, lo que representa el mecanismo desencadenante en el desarrollo de cambios morfofuncionales en el periodonto y sus vasos sanguíneos, como resultado final tienen lugar la destrucción del colágeno y la reabsorción del tejido óseo.

## 5.9 Desbalance Redox en la enfermedad periodontal inflamatoria

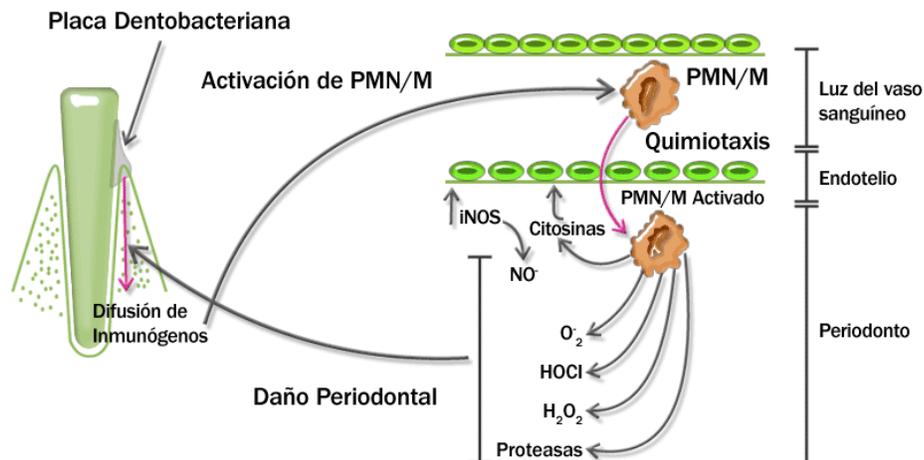
La enfermedad periodontal inflamatoria (EPI) inicia con una infección de la encía ocasionando un respuesta inflamatoria denominada «gingivitis» que puede o no extenderse a los tejidos más profundos y dar lugar a la «periodontitis». Esta última se caracteriza por pérdida ósea y movilidad, que pueden conducir finalmente a la pérdida del diente, si no se establece a tiempo una terapéutica adecuada. Pero este concepto de terapia adecuada ha sufrido modificaciones en los últimos años. Anteriormente los procedimientos terapéuticos se basaban fundamentalmente en el uso de técnicas quirúrgicas como el raspado y alisado radicular y el control bacteriológico.<sup>12</sup> Sin embargo, se han acumulado suficientes datos que avalan el concepto de que las EPI constituyen infecciones específicas (producidas por determinadas bacterias periodontopáticas) que se desarrollan en un huésped apropiadamente susceptible y por lo tanto la Academia Norteamericana de Periodontología ha recomendado el «control de la respuesta del huésped» como coadyuvante a las dos anteriores.<sup>170-174</sup>

Una vez establecido el daño, es poco probable que se logre la regeneración total de los tejidos periodontales, por este motivo la prevención gana terreno. Todas las formas de peridontitis en humanos son producidas por bacterias predominantemente móviles, anaerobias y Gramnegativas, que colonizan el diente cerca del margen gingival, las bacterias y las sustancias que ellas producen



provocan reacción inflamatoria en el tejido gingival subyacente y una gran cantidad de PMN son atraídos a la zona de interacción entre las bacterias y la superficie tisular. Existen mecanismos de defensa local ante el ataque de estas bacterias: barrera epitelial, saliva (acción de lavado, aglutininas y anticuerpos), fluido crevicular (acción de lavado, opsoninas, anticuerpos, sistema del complemento y otros componentes del plasma), producción local de anticuerpos, recambio tisular elevado, presencia de flora noxal, migración de PMN y otros leucocitos. Aunque todos estos son importantes en la defensa local, ninguno es tan importante como la acción de los PMN, como lo demuestra el hecho de que mínimas alteraciones en los neutrófilos resultan en periodontitis de comienzo temprano y rápida progresión.<sup>170</sup>

Por otra parte, la enfermedad periodontal activa los mismos mecanismos de defensa sistémicos que cualquier otra infección en el organismo, como cambios en el lecho vascular que resultan en la formación de infiltrado inflamatorio, activación del sistema inmune, quimiotaxis de fagocitos, activación de la cascada del complemento y el sistema generador de quininas. Mientras su activación proporciona defensa contra los microorganismos los mismos sistemas participan en la destrucción de los tejidos del huésped. A medida que avanza la enfermedad periodontal se forma el exudado inflamatorio (neutrófilos, macrófagos, linfocitos y células plasmáticas) y son destruidos el tejido conectivo de la encía, el ligamento y el hueso alveolar (figura 5).





**Figura 5 Representación esquemática de la incidencia de factores etiológicos locales para el desarrollo de la Enfermedad Periodontal inflamatoria. (Figura tomada del artículo desbalance redox en la enfermedad periodontal inflamatoria)**

La placa dentobacteriana promueve la activación de polimorfonucleares en los vasos sanguíneos que por quimiotaxis del endotelio se moviliza al periodonto en donde produce radicales libres y proteasas que ocasionan el daño periodontal.

PMN/M, células polimorfonucleares/macrófagos; iNOS, enzima óxido nítrico inducible; NO•, óxido nítrico; O<sub>2</sub>•-, radical anión superóxido; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peróxido de hidrógeno; HOCL, ácido hipocloroso.

## **6 Expresión de la enzima óxido nítrico sintasa**

Muchas células inflamatorias, fibroblastos, células endoteliales vasculares y osteoclastos también producen especies reactivas del oxígeno. El superóxido generado es convertido al potente peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo y oxígeno singlete<sup>171-173</sup>.

La expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en respuesta a un estímulo inflamatorio produce un gran cúmulo de óxido nítrico (NO) que puede actuar como molécula citotóxica contra la invasión de microorganismos y puede estar relacionada con efectos tanto beneficiosos como perjudiciales sobre los tejidos, al estudiar cuantitativamente la actividad de la iNOS en células de muestras de tejidos gingivales normales, en gingivitis por placa dentobacteriana y en periodontitis crónica localizada, se encontró un incremento significativo del número de células positivas a esta enzima en las muestras de gingivitis y periodontitis en comparación con las normales. En todos los grupos los PMN mostraron inmunorreactividad intensa para la iNOS independientemente del estadio de la enfermedad, y el porcentaje de PMN positivos a la iNOS creció significativamente en la enfermedad periodontal comparado con el grupo control,



por lo que se concluyó que la iNOS se incrementa en la enfermedad periodontal y además se sugiere que los PMN representan una vía de activación adicional de la iNOS y probablemente una fuente importante de NO en la enfermedad periodontal inflamatoria. El NO en la saliva de pacientes con periodontitis es significativamente más alto que en individuos sanos. Una relación muy significativa se encuentra entre la presencia de bolsas y las concentraciones de NO. La reacción del NO con el superóxido produce peroxinitrito que es también capaz de dañar las moléculas biológicas<sup>174-178</sup>.

No existen dudas de que una alteración de la función de los polimorfonucleares conduce a un incremento en la incidencia y progresión de la enfermedad periodontal inflamatoria. Otras evidencias que apoyan este planteamiento son:

- 1.) Pacientes con enfermedad periodontal muestran incremento de polimorfonucleares en número y actividad.
- 2.) Sustancias eficaces en la terapéutica periodontal poseen propiedades antioxidantes. Este es el caso de las tetraciclinas cuya utilidad en el tratamiento periodontal es clásica, pero se ha descubierto que no se debe sólo a su poder antimicrobiano, sino también a su poder antioxidante e inhibidor de proteasas leucocitarias.
- 3.) Sustancias con propiedades antioxidantes son eficaces en la terapéutica periodontal. Con estos fines se encuentra patentado el uso de las vitaminas A, E y C, el ácido retinoico, la coenzima Q, la enzima superóxido-dismutasa y flavonoides de diferentes extractos de plantas.<sup>179-180</sup>

Los PMN del fluido gingival y también los periféricos de los pacientes con diferentes formas de periodontitis producen una mayor cantidad de radical superóxido y por lo tanto tienen una respuesta oxidante incrementada con relación a los de los controles sanos. Algunos estudios han demostrado que paralelamente existe un nivel de defensa antioxidante similar al de los controles y por tanto el



efecto protector o destructivo de los PMN pudiera asociarse a la capacidad de respuesta antioxidante de los tejidos frente a un estrés oxidativo.<sup>181-183</sup>

El incremento en la producción de especies reactivas del oxígeno que se ha encontrado, depende del estímulo. De forma más consistente los estudios demuestran que la estimulación del receptor Fcy con bacterias opsonizadas con IgG provoca esta respuesta tanto en pacientes con periodontitis de aparición temprana como con periodontitis del adulto. Con otros estímulos los resultados son contradictorios. Se ha propuesto que este efecto se debe no a un incremento del número de los receptores Fcg sino a un incremento de su afinidad provocada por una mayor movilidad en la membrana o por interacciones con otros receptores que afloran desde la misma, como por ejemplo moléculas de adhesión.

La enzima mieloperoxidasa (MPO) en el fluido gingival de pacientes con periodontitis presenta una actividad incrementada. Esta es una enzima que se encuentra en los gránulos de los PMN y que es responsable de la producción de especies reactivas del oxígeno (ácido hipocloroso) de manera secundaria al sistema NADPH-oxidasa. La MPO en contacto con células epiteliales y fibroblastos gingivales es capaz de provocar la lisis de los mismos mientras las especies reactivas del oxígeno producidas por los PMN son capaces de degradar los glicosaminoglicanos de la matriz extracelular del tejido que forma la encía. Ambos efectos evidencian el poder destructor de los PMN<sup>179</sup>.

Las ERO también son capaces de incrementar la reabsorción ósea. Estudios recientes sugieren que no están directamente involucradas en la reabsorción, sino que juegan un papel importante en la activación de los osteoclastos fundamentalmente a través del incremento de su formación.

En su conjunto estos datos permiten plantear que la participación del estrés oxidativo en esta enfermedad es un hecho. De una parte, los factores etiológicos generales provocan una disminución de las defensas antioxidantes y por otra parte, los factores etiológicos locales en íntimo contacto con la encía, provocan la



migración y activación de los PMN. En estas condiciones, la liberación de ERO que provienen de PMN y otras células inmunológicas conduce a daños oxidativos a biomoléculas que desencadena en cambios morfofuncionales en el tejido que conforma el periodonto y sus vasos.

## 6.1 Hiperactivación de polimorfonucleares causas extrínsecas e intrínsecas

Un aspecto de gran polémica es el referente a si la hiperactivación de los PMN se debe a defectos celulares intrínsecos o a factores extrínsecos que promueven esta alteración.<sup>173</sup> Las causas de origen extrínseco implican aquellas ajenas a las características intrínsecas de la célula. Se han propuesto varias causas posibles, entre las que se encuentran:

- Insuficiente producción de citocinas anti-inflamatorias: primero se describió la disminución de IL-4 que no fue avalada por investigaciones posteriores. Actualmente se considera que pueden estar disminuidos el antagonista del receptor de IL-1, el factor de crecimiento transformante-beta, el interferón- $\gamma$  y la IL-10.
- Presencia de superantígenos bacterianos en la pared de las bacterias periodontopatógenas. Aunque se sabe que muchas de las bacterias periodontopatógenas poseen en su superficie moléculas con estas características no se ha podido determinar su participación en la enfermedad periodontal inflamatoria.<sup>75</sup> Sin embargo, Bacterias periodontopáticas (*Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*), en contacto con PMN sanos pueden provocar un incremento de la respuesta oxidativa.

Además se ha reportado que el lipopolisacárido bacteriano de *Porphyromonas gingivalis* provoca una disminución de la inducción de la apoptosis en los PMN lo cual incrementa su tiempo de vida media.



La acción de determinados factores propios de los PMN también puede incidir en las causas de su hiperactivación. En este sentido han sido significativos los estudios realizados en una forma de enfermedad periodontal inflamatoria de aparición temprana: la periodontitis juvenil localizada (PJL).

Al aislar los PMN de individuos afectados con PJL se observó que en un gran porcentaje de estos pacientes esas células poseían las siguientes características:

- Disminución de su capacidad quimiotáctica asociada a un menor número de receptores quimiotácticos. También está disminuida GP-110, una glicoproteína de la superficie celular involucrada en la locomoción de los PMN.
- Incremento de la adherencia determinada por un incremento de la expresión de moléculas de adhesión celular que permiten la unión del PMN al endotelio. Por ejemplo, las beta2-integrinas: LFA-1, Mac-1 y CR4.3. Un incremento de la expresión de moléculas de adhesión celular también se ha observado en fibroblastos gingivales expuestos a la nicotina, un importante factor de riesgo de enfermedad periodontal inflamatoria.
- Incremento de la producción de radical superóxido. Esto puede deberse a los defectos en las vías de señalización que conducen entre otros al incremento de la actividad de la proteína cinasa C la cual está a su vez involucrada en la activación de la NADPH-oxidasa. Si se tiene en cuenta que este PMN será incapaz de arribar al sitio de infección y se quedará adherido al endotelio, este incremento de la producción de especies reactivas del oxígeno en esa localización potenciará entonces su capacidad destructiva.
- Disminución de la destrucción intracelular de bacterias periodontopáticas debido posiblemente a defectos en la fusión fagosoma-lisosoma.<sup>180-183</sup>

Todas estas características conducen a un PMN disfuncional cuya normalidad no puede restablecerse al colocarlos en suero de individuos sanos. Esto apoya la



teoría de la causa intrínseca del defecto. Sin embargo, poco después que se demostrara la disminución de la capacidad quimiotáctica, se conoció que el suero de pacientes con PJI al ponerse en contacto con PMN funcionales de individuos sanos tiene la capacidad de producir todas las alteraciones descritas anteriormente. Con el posterior desarrollo de los conocimientos sobre las citocinas y su papel en los procesos inmunológicos se sospechó que estas moléculas pudieran ser responsables de este efecto. Así, al poner en contacto los PMN sanos con citocinas pro-inflamatorias como la IL-1 y el TNF-alfa en concentraciones muy bajas (15-150 pg/ml), se obtuvo un PMN disfuncional con similares características a las descritas para los pacientes con PJI. Además, la adición de anticuerpos contra estas citocinas al suero de pacientes con PJI bloqueó parcialmente su efecto inductor de alteraciones en los PMN sanos. Todos estos experimentos apoyan la teoría de la participación de factores séricos y en particular las citocinas en las alteraciones que presentan los PMN de los pacientes con PJI.<sup>183,184</sup>

La alteración en el patrón de secreción de IL-1beta pudiera implicar un defecto genético del macrófago y explicaría la naturaleza familiar de la PJI. Se sabe que la respuesta a LPS bacteriano está determinada genéticamente y que es específica para cada tipo bacteriano en particular. Se ha postulado que el polimorfismo en la región promotora de los genes de citocinas es importante en la modulación de la magnitud de la respuesta secretora de citocinas estimulada por LPS. Recientemente se identificó un genotipo específico de IL-1 que se asocia con la severidad de la enfermedad periodontal inflamatoria. La enfermedad severa fue identificada en no fumadores cuando el alelo 2 del polimorfismo IL-1A-889 estaba presente con el alelo 2 del polimorfismo +3953 del gen de IL-1beta. Los monocitos de individuos homocigóticos para el alelo 2 de IL-1beta +3953 produjeron 4 veces más IL-1beta y los heterocigóticos 2 veces más que las células de individuos homocigóticos para el alelo 1. Fue esta la primera vez que se definió un marcador genético que identifica a adultos que ante un reto bacteriano son altamente susceptibles a la periodontitis severa.



## 6.2 Papel de las citocinas

Debido a que una fuente importante de IL-1 y TNF- $\alpha$  son los PMN que a su vez desempeñan un importante papel en la inflamación y la reparación, se ha investigado el impacto de la producción de citocinas por parte de estas células provenientes de pacientes con enfermedad periodontal inflamatoria. Se detectó que los monocitos de pacientes con periodontitis juvenil localizada, tienen concentraciones incrementadas de ARNm o de las propias citocinas (IL-1 $\alpha$ / $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8) en respuesta a lipopolisacárido bacteriano proveniente de bacterias periodontopáticas. Además, se han encontrado elevadas concentraciones de estas y otras citocinas en el fluido gingival y homogenados de tejidos periodontales inflamados. Adicionalmente en pacientes adultos con EPI, la invasión de la *Porphyromonas gingivalis* desencadena la liberación de citocinas como la IL-8 y TNF- $\alpha$ , que estimulan la elevación del número de PMN y el incremento de su actividad. Por lo tanto, se ha concluido que los macrófagos de estos pacientes producen una respuesta hiperagresiva ante bacterias periodontopáticas. Otra fuente potencial de citocinas inflamatorias son los fibroblastos gingivales que desempeñan funciones como células inmunológicas accesorias. Se ha detectado que pueden liberar IL-1 $\beta$  ante la presencia de lipopolisacárido bacteriano.<sup>190-197</sup>

El aumento de la producción de citocinas puede producir en el ámbito local una pérdida ósea excesiva y daño tisular del periodonto, que puede originar diferentes alteraciones que a su vez están relacionadas con la conexión entre la enfermedad periodontal inflamatoria y las enfermedades sistémicas.

La IL-1 es la citocina más estudiada de la enfermedad periodontal. Las concentraciones de IL-1 disminuyen después del tratamiento de la enfermedad periodontal. Entre las funciones de la IL-1 están: aumentar la concentración de



prostaglandinas E2 (PGE2) por los fibroblastos gingivales, aumentar ARNm para la procologenasa en los fibroblastos y activación de los osteoclastos para la reabsorción ósea. Por su parte la PGE2 produce reabsorción ósea in vitro y se ha comprobado que sus concentraciones en el fluido crevicular se correlacionan con períodos de actividad periodontal.<sup>198-202</sup>

### 6.3 Acción de las proteasas

Debido a que la destrucción de la matriz extracelular es una característica determinante en la progresión de la enfermedad periodontal inflamatoria, las enzimas proteolíticas adquieren gran relevancia en la patogénesis de esta enfermedad. En primer lugar, son liberadas por los PMN activados y en combinación con las especies reactivas del oxígeno constituyen el principal mecanismo germicida de estas células. Las proteasas salen al medio extracelular en forma inactiva y su activación es mediada por las propias especies reactivas del oxígeno. También pudieran estar implicadas las proteasas liberadas por las células residentes del tejido periodontal tales como los fibroblastos, las células endoteliales y las del ligamento periodontal fundamentalmente. Adicionalmente el ácido hipocloroso liberado por la Mieloperoxidasa inactiva la alfa1-antiproteinasa el principal inhibidor de proteasas circulantes. Otra fuente muy importante de proteasas son las propias bacterias periodontopáticas cuya capacidad de evadir la acción de los inhibidores endógenos, de producir disfunción de los mecanismos inmunológicos defensivos y de dañar directamente el tejido, las convierte en candidatas, importantes. Por lo pronto, existen diseños terapéuticos para esta enfermedad basados en la inhibición de la actividad proteolítica los cuales se encuentran en continuo desarrollo.<sup>190-201</sup>

La relación entre la activación de PMN con el desarrollo de la enfermedad periodontal inflamatoria en la generación de especies reactivas del oxígeno, así como la acción combinada de las citocinas y proteasas junto a otros mediadores conducen al deterioro del periodonto y la pérdida dentaria. El conocimiento a



mayor profundidad de estos mecanismos permitirá comprender con mayor claridad la fisiopatología de la enfermedad periodontal inflamatoria y así definir estrategias terapéuticas más eficaces, dentro de las que pudieran considerarse las terapias antioxidantes locales o sistémicas (Figura 6).

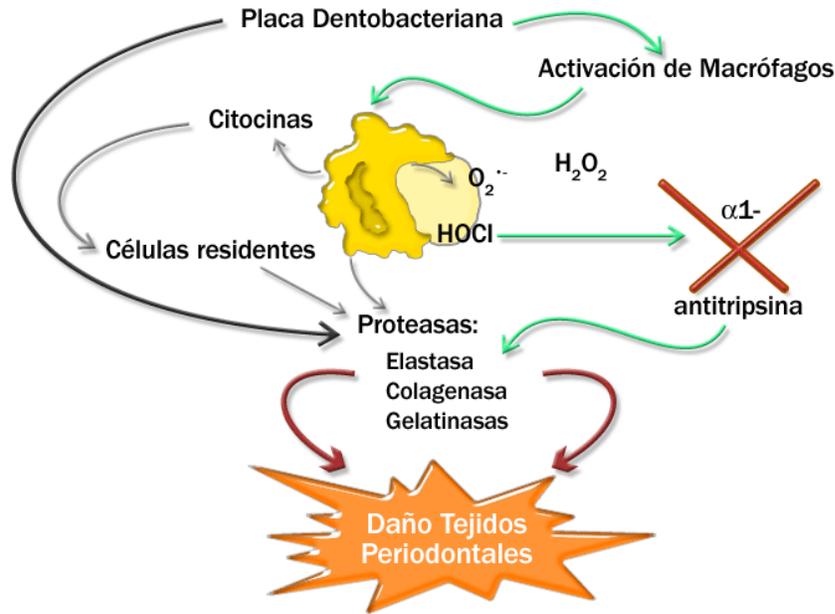


Figura 6 Representación esquemática del origen y acción de las proteasas en la Enfermedad Periodontal Inflamatoria. (Figura tomada del artículo desbalance redox en la enfermedad periodontal inflamatoria)

O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, radical anión superóxido; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peróxido de hidrógeno; HOCl, ácido hipocloroso.

#### 6.4 Efecto de los flavonoides en la enfermedad Periodontal

Las reacciones donde intervienen oxidantes y radicales desempeñan un papel esencial en el origen de las formas de vida aerobias y son una parte integral de la homeostasis celular. Sin embargo debido a los efectos tóxicos colaterales, de forma muy temprana en la evolución se desarrollaron las enzimas y factores antioxidantes que son capaces de controlar la presencia y efectos de estos productos. Oxidantes y antioxidantes tienen una clara función en el organismo y un desequilibrio en estos delicados balances resulta en muchas alteraciones



bioquímicas y celulares que pueden crear condiciones patológicas. Así mismo, el papel de los radicales libres del oxígeno como factor clave en el envejecimiento biológico. Pero existen moléculas que pueden cambiar esos procesos de oxidación-reducción, entre los que se encuentran los flavonoides ya que son capaces de eliminar un amplio rango de especies reactivas del oxígeno, nitrógeno y cloro, tales como el superóxido, el radical hidroxilo, el radical peroxilo, el ácido hipocloroso, actuando como agentes reductores. Además pueden quelar iones de metales de transición, que al actuar rompiendo la reacción en cadena, actúan como consumidores del radical hidroxilo, el peroxinitrito y el ácido hipocloroso, actuando como agentes reductores.<sup>185-190</sup>

## 6.5 Vimang y Oleozón

El vimang, es un extracto que se obtiene de la corteza del árbol *Mangifera indica*. Su composición química, constituye polifenoles, terpenoides, polialcoholes, ácidos grasos y microelementos, lo que le confiere un elevado efecto protector antioxidante. También se ha descrito su poder inmunomodulador. Extractos de las hojas y tallo de esta planta han mostrado efecto anti-inflamatorio, así como actividad antibacteriana contra la microbiota oral anaeróbica, frecuentemente, vinculada con la enfermedad periodontal.<sup>96</sup>

El oleozón se obtiene a partir de la ozonización del aceite de girasol. Está formado por hidroperóxidos y ozónidos, sustancias que poseen carácter germicida, pueden favorecer el metabolismo y regular la defensa celular. El oleozón, posee la propiedad de estimular determinados sistemas enzimáticos antioxidantes, lo cual se debe a una importante activación de reacciones oxígeno dependiente del metabolismo y del ciclo de Krebs y a una influencia directa sobre la función redox de la cadena respiratoria mitocondrial. En estomatología se ha empleado en el tratamiento de variadas afecciones en la gingivitis ulcero necrotizante aguda y la gingivitis herpética aguda Estomatitis Aftosa, conductos radiculares infectados y en alveolitis con buenos resultados. El empleo de estas sustancias es una forma



de tratamiento más inocua, eficaz y económica. En un estudio con catequinas obtenidas del té verde muestra una mejora de la enfermedad periodontal, así mismo, señala la concentración mínima inhibitoria y la actividad bactericida de catequinas del té verde contra el pigmento negro de los bacilos Gram-negativos anaerobios.

Se utilizó hidroxipropilcelulosa es una banda orgánica echa a partir de la celulosa, la cual es el principal polisacárido constituyente de la madera y de todas las estructuras vegetales, presenta mayor solubilidad en agua lo cual se puede usar en tratamientos en boca pues en medio húmedo como el de la cavidad oral se puede utilizar, a esta banda de celulosa se le añadió catequinas del té verde como un sistema de administración de liberación local lenta prolongada se aplico en bolsas periodontales una vez por semana durante 8 semanas. Los efectos clínicos, microbiológicos y enzimáticos de la catequina se determinaron. Catequinas del té verde mostraron un efecto bactericida frente a *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella*, la profundidad de la bolsa y la proporción de nuevos procesos operativos se redujeron notablemente en el grupo con tratamiento mecánico hasta un 70%, Catequinas del té verde mostro una acción bactericida frente a nuevos procesos operativos y el uso combinado de tratamiento mecánico y un sistema local de liberación prolongada lento fue eficaz en el mejorar del estado periodontal.

Pycnogenol es un fitoquímico que se extrae de la corteza del pino marítimo francés. Es una mezcla de procianidinas oligoméricas y monoméricas, ácido cafeico, ácido gálico y otros precursores de procianidinas. Pycnogenol se ha utilizado en países europeos como suplemento dietético por su actividad captadora de radicales libres. El extracto ha sido demostrado tener la capacidad. Pycnogenol ha demostrado proteger a las células endoteliales vasculares de las lesiones inducidas por un oxidante orgánico, t-butilo. Se ha demostrado que aumenta los niveles de glutatión intracelular y mejora las actividades de las enzimas antioxidantes. Varios estudios han sugerido sus efectos protectores sobre



los trastornos cardiovasculares inhibe la oxidación de las lipoproteínas, y el radical hidroxilo inducida por daño en el ADN. Se ha observado su eficacia en el control de las reacciones inflamatorias asociadas con eccema alérgico, dermatitis de contacto, prurito de larga duración. Excelente mejoría clínica se obtuvieron con los suplementos de Pycnogenol, sin efectos secundarios adversos observado. La propiedad antiinflamatoria de procianidinas. Ha demostrado mejorar los trastornos ginecológicos como la endometriosis y la dismenorrea al reducir los cólicos menstruales, dolor abdominal. También se ha demostrado mejorar la función inmune y hematopoyético y para mejorar problemas de aprendizaje y déficit de memoria en el acelerado envejecimiento de ratones. Lo que sugiere su exclusiva propiedad anti-envejecimiento.

El descubrimiento inicial de Pycnogenol se remonta al año 1535, cuando el explorador francés Jacques Cartier y sus hombres arribaron en Quebec, Canadá. A falta de frutas y verduras, se desarrolló el escorbuto y sus encías sangraban las encías y los dientes se caían. Indios de la región prepararon un té derivado de la corteza de los pinos específicos propios de la zona. Cartier y su tripulación bebieron el té y en pocos días las encías dejaron de sangrar. En este estudio, una goma de mascar disponibles comercialmente que contienen Pycnogenol fue evaluado por su efecto sobre el sangrado gingival y la formación de placa en sujetos humanos.

Mark Feldman y colaboradores utilizan 4-Hydroxycordoin de chalcona que es un metabolito secundario de las plantas y es relativamente raro. Ya que hay muy pocos informes sobre la actividad biológica de esta molécula. El tratamiento con este compuesto muestra una marcada actividad antibacteriana en contra de los tres principales patógenos periodontales, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* y *Prevotella intermedia*. Por otra parte, el compuesto mostró un efecto anti-adhesión, ya que inhibe la fijación de *P. gingivalis* a las células epiteliales orales. Posee también la capacidad para inhibir la secreción de mediadores de la inflamación inducida por el lipopolisacárido de *Aggregatibacter*



*actinomycescomitans*. El efecto anti-inflamatorio observado se ha asociado con una reducción de la activación del factor nuclear kB (NF-kB) p65 y la proteína activadora-1 (AP-1).

Sin embargo, sólo un número limitado de especies bacterianas se han asociado fuertemente con las diferentes formas de periodontitis, que incluyen *Actinobacillus*, *Aggregatibacter*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* y *Treponema denticola*. La acumulación y proliferación de estas especies de bacterias en las bolsas periodontales son los pasos iniciales en la aparición de las lesiones periodontales.

## 6.6 Los flavonoides en el tratamiento de la enfermedad periodontal

Los primeros reportes sobre el estudio de flavonoides en padecimientos periodontales se remontan desde el año de 1951, en donde se realizan estudios del papel de rutina en estudios clínicos y se sus beneficios, en esos reportes se refiere a los flavonoides como vitamina P.<sup>204-211</sup>

En el año 1982, investigadores del Hospital de la Administración de Veteranos de Wadsworth en conjunto con investigadores de la Universidad de California, estudiaron el efecto de agentes antimicrobianos de origen Chino y su relación con fármacos del Oeste.<sup>212</sup> La planta *Scutellaria baicalenis* llamada también Huangchin, ha sido, de las hierbas más comúnmente utilizadas en China para tratar abscesos periodontales y periodontitis, así como, la infección de heridas. Existen reportes que datan desde 1882 en donde se trata de determinar la composición de extractos de esta planta pero no es sino hasta el año de 1965 que se reporta, que seis cristales obtenidos de esta planta presentan un glucurónido (C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>O<sub>11</sub>) que se hidroliza en un flavonoide (C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>). En reportes previos, citados en este mismo texto, señalan que extractos de esta hierba son muy efectivos en controlar respuestas inflamatorias mediante la disminución de la liberación de histamina en



linfocitos, muestra también que disminuye la fagocitosis y la permeabilidad vascular. Estos autores reportan que extractos de esta planta tienen también actividades bacteriostáticas cuando se utilizan en concentraciones de 2%. Sin embargo, se requieren concentraciones de 3.13% para presentar actividades bactericidas y mencionan también que la penicilina y fluoruro de estaño realizan el mismo efecto solo que en menores dosis.

Un año después, en 1983, Parisi y Pritchard<sup>213</sup> reportan que especies de *Streptococcus milleri*, son capaces de hidrolizar a la rutina en un mutágeno denominado quercetina (otro flavonoide que años después se ha demostrado que muestra actividades benéficas).

Posteriormente, otro grupo de investigadores<sup>214</sup> efectúan estudios con el flavonoide 3-metoxi-5,7,3,4 tetrahidroxiflavano en un modelo experimental de periodontitis realizado en hámster dorados, encontrando que el tratamiento con este flavonoide (200 mg/kg durante tres veces al día) no tiene efectos en el control de la placa dentobacteriana pero si promueve una disminución en la resorción del hueso alveolar.

Otros investigadores<sup>215</sup> mostraron que el tratamiento con amben y glascorbina, disminuye lesiones necróticas-ulcerativas.

Por otra parte, el grupo de Makimura<sup>216</sup>, de la Facultad de Odontología de Matsuda en Japón, reporta que extractos de epicatequina y epigalocatequina disminuyen la actividad de colagenasa por lo que podrían ser utilizados en el tratamiento de la enfermedad periodontal.

En 1995, años posteriores al primer reporte de *Scutellaria baicalensi*, el grupo de Chung<sup>217</sup> de la Facultad de Odontología de la Universidad de Corea, reportó que extractos metanólicos de la raíz de esta planta y sus flavonoides wogonina, baicaleina y baicalina, inhiben la síntesis de prostaglandina inducida por



interleucina-1 en fibroblastos gingivales. Así mismo, promueven el proceso de cicatrización estimulando la síntesis de colágena.

Componentes de extractos provenientes del té verde<sup>218</sup>, como catequinas y polifenoles han sido utilizados para evaluar su efecto en la regulación de la inflamación de la encía. Demostrando que a las personas a las que se les suministró extractos de té verde presentaron una disminución en el índice de placa y en el sangrado del surco gingival. Los resultados de esta investigación sugieren que la aplicación del té verde puede influir de manera positiva en el control de la inflamación de la encía.

Por otra parte, extractos de la planta *Perilla frutescens Britton var. Japónica Hará* muestran actividad antimicrobiana contra *Streptococcus* cariogénicos y contra el periodontopatógeno *Porphyromonas gingivalis*, mostrando una mayor actividad en los compuestos fenólicos. Por lo que se sugiere que las semillas de perilla pueden usarse con un agente antimicrobiano en el control de la caries y la enfermedad periodontal.<sup>219</sup>

En otra serie de investigaciones<sup>220</sup>, se ha reportado que gomas de mascar elaboradas a partir de un fitoquímico con actividades antioxidantes, denominado picnogenol promueven una disminución en el sangrado gingival y en la formación de placa dentobacteriana.

En otras investigaciones<sup>221</sup>, se ha demostrado que la catequina presente en el té verde muestra actividades bactericidas contra *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella*, cuando la catequina se aplica en tiras de hidroxipropilcelulosa, lo que provoca una liberación local lenta. Así mismo, la actividad peptidasa del fluido gingival se mantiene al mínimo durante el tratamiento con este flavonoide.

Otros estudios<sup>222</sup> señalan que flavanoles y sus oligómeros aislados de la cocoa presentan efectos inmunomodulatorios en la producción de IL-1beta, IL-2 y de IL-



4. Lo que sugiere que estos compuestos pueden reducir el riesgo a desarrollar caries o enfermedad periodontal.

Otros investigadores<sup>223</sup> diseñaron una película que liberaba ipriflavona de forma sostenida en las bolsas periodontales. Para lo cual realizaron un sistema de monocapa de composita hecha de micromatrices de (D,L-lactido-co-glicolida) humedecida con ipriflavona: En este estudio investigaron, en estudios realizados *in vitro*, la influencia del pH, fuerza iónica y la actividad enzimática en la degradación de la película. Encontrando, que la degradación y liberación del flavonoide es directamente proporcional a la estructura de la película y que la liberación se prolonga hasta por 20 días.

Por otra parte, investigaciones realizadas en la Universidad de Yonsei en Corea, en donde se estudió un extracto parcialmente purificado de la corteza de la planta *Ulmus hance* (Olmo) y sus ingredientes activos consistentes en una mezcla de oligómeros de procianidina (monómeros de 3 a 12 flavan-3-ol con peso molecular de 1,517 con una polimerización promedio de 5.3) sobre sus acciones inhibitorias contra proteasas liberadas por tejidos periodontales o por microorganismos periodontopatógenos. Realizaron esta investigación, porque como es bien conocido que las enzimas matriz metaloproteinasas (MMP) y las proteasas bacterianas, juegan un importante papel en la destrucción de los tejidos gingivales. Por lo que inhibidores de estas proteasas podrían ser utilizados en el tratamiento contra la enfermedad periodontal. Para evaluar los efectos inhibitorios se realizaron estudios de zimografía con gelatina y la actividad de la matriz metaloproteinasas se evaluó tanto en el fluido crevicular de adultos afectados con periodontitis como en el medio condicionado de un cultivo de ligamento periodontal, ya que estos tejidos liberan proMMP-2 y la forma activa de MMP-2 cuando se trata con periodontopatógenos como *Treponema lecithinolyticum*. Así mismo, las proteasas se obtuvieron de *Porphyromonas gingivalis* y *Treponema denticola*. Estos investigadores encontraron que los extractos de oligómeros de



procianidina obtenidos del Olmo, mostraron un potente efecto inhibitorio sobre las MMP liberadas por el fluido crevicular (MMP-8 y MMP-9) y sobre las proteasas de *T.denticola* y *P. gingivalis*.<sup>224</sup>

Otras investigaciones señalan que compuestos polifenólicos aislados del té verde (*Camellia sinensis*) contrarrestan los efectos tóxicos de metabolitos liberados por *Porphyromonas gingivalis*. Se encontró que dosis de 1 a 2 mg/ml inhiben completamente la producción de n-butírico y ácido propiónico. Siendo la (-) epigallocatequina, el componente principal, y el que inhibió la producción de ácido fenilacético a una concentración de 0.5 mg/ml. Sin embargo, los flavonoides también presentes en el té verde como: (+) catequina, (-) epicatequina, (+) galocatequina y (-)-epigallocatequina no inhibieron la producción del ácido fenilacético se que obtiene apartir de las reacciones de L-fenilalanina y ácido fenilpirúvico. Lo que sugiere que el grupo 3-OH, juega un papel relevante en la regulación del metabolismo de *Porphyromonas gingivalis*.<sup>225</sup>

Otras investigaciones<sup>226</sup> se han abocado a estudiar el efecto de la baicalina sobre las acciones de IL-1beta en la síntesis de pro-MMP-1 y MMP-3, mediante ensayos de ELISA, en células obtenidas del ligamento periodontal. Encontrado que la baicalina promueve una disminución de manera dependiente de la dosis, en la secreción de pro-MMP-1 en células tratadas con IL-1 beta. Sin embargo, la baicalina no interfiere en la síntesis de MMP-3 de las células obtenidas del ligamento periodontal. Con esta investigación se sugiere que la baicalina podría participar en la prevención y tratamiento contra la enfermedad.

Por otra parte, extractos de proantocianidinas obtenidos de semillas de uva, han mostrado efectos en la regulación del colesterol, efectos anti-oxidantes, anti-tumorales y cardioprotectores. Sin embargo, no se ha caracterizado con certeza su papel en hueso. Por lo que investigadores del Departamento Pediátrico en Japón, evaluaron el efecto de estos flavonoides en la estructura ósea de la



mandíbula de ratas<sup>227</sup>. Para analizar el efecto de los flavonoides, se dividieron a las ratas en dos grupos: a un grupo lo sometieron a una alimentación balanceada y al otro grupo el dieron una dieta baja en calcio, encontrado que los roedores que recibieron una dieta baja en calcio y que fueron tratados con el flavonoide, mostraron un incremento significativo en la calidad y dureza ósea. Por lo que estas investigaciones sugieren que las proantocianidinas podrían tener efectos en el tratamiento contra osteoporosis.

Siguiendo con estas investigaciones un grupo de investigadores de la escuela de Periodoncia en Yonsei en Corea<sup>228</sup>, evaluó el efecto de epigallocatequina en la expresión de MMP-2, MMP-9 y MMP-13 en osteoblastos estimulados con *Porphyromonas gingivalis*. Encontrando que a dosis de 20  $\mu$ M de epigallocatequina, se inhibe la formación de osteoclastos y la expresión de MM-9.

Así mismo, la regulación del recambio de matriz extracelular es un evento de gran importancia en la cicatrización y el progreso de la enfermedad periodontal. Algunos estudios señalan que la regulación de activador plasminógeno tipo uroquinasa, que es una serin-proteasa- que se sintetiza como zimógeno denominado plasmina, se encuentra sujeto al control de factores de crecimiento y citocinas, provee un potencial proteolítico que conlleva a la degradación de matriz extracelular en el periodonto y al desarrollo de la enfermedad periodontal. Entre los factores que regulan la expresión de esta proteasa se encuentra el factor de crecimiento epidermal (EGF). En fibroblastos gingivales humanos se ha demostrado que el tratamiento con curcumina y genisteina inhiben la producción de uroquinasa inducida por EGF. Así mismo, estos investigadores encontraron que el efecto de EGF en estas células es mediado por dos de las proteínas activadas por mitógeno, a saber, la cinasa amino terminal c-JUN (JNK) y la cinasa extracelular activada por mitógeno (ERK). Lo que sugiere que los efectos de EGF sobre la expresión de la serin-proteasa son regulados por EKR y JNK y que los fitoestrógenos curcumina y genisteina modulan estos efectos.<sup>229</sup>



En otro orden de ideas, los masticadores de Areca tienen una baja prevalencia de padecer enfermedad periodontal, lo que se sugiere que compuestos presentes en estas estructuras podrían tener efectos sobre el funcionamiento de sistema inmune. Se ha demostrado que extractos libres de cáscara de la nuez de areca enriquecidos en el alcaloide arecolina y el componente fenólico (+)-catequina no tienen efectos en la viabilidad de los neutrófilos. Sin embargo, arecolina y (+) catequina inhiben la actividad fagocítica de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* de los neutrófilos de manera dependiente de la dosis, desde dosis de 50 µg/ml. Lo que sugiere que la inhibición de extractos de areca en la fagocitosis de neutrófilos podría contribuir en la salud periodontal.<sup>230</sup>

Por otra parte, en la cavidad oral, los nitritos son reducidos a óxido nítrico por algunas bacterias que provocan daños en el periodonto, se ha demostrado que quercetina a una dosis 1 µM inhibe la producción de óxido nítrico y por tanto el tratamiento con este flavonoide, protege al periodonto del daño por radicales libres.<sup>231</sup>

Otros estudios con Baicalina, el flavonoide purificado de la planta medicinal *Scutellaria baicalensis* muestra actividad anti-bacterial, anti-inflamatoria y efectos analgésicos y también bloquea la activación del factor de transcripción NFκB. Ligamento periodontal de humanos es un tejido conectivo que se encuentra entre el hueso alveolar y el diente. El receptor activador de NFκB (RANKL), que es un miembro de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF), juega un importante papel en la osteoclastogénesis de precursores osteoclastos a osteoblastos maduros. Algunas investigaciones muestran que baicalina desde dosis muy bajas (1 ng/mL) bloquea la expresión de RANKL y de ciclooxigenasa-2 (COX-2) en células derivadas del ligamento periodontal estimulado con IL-1beta. Estos datos sugieren que baicalina es efectiva en el control de la enfermedad periodontal y en la resorción ósea.<sup>232</sup>



Otros estudios muestran que luteolina bloquea las acciones del lipopolisacárido obtenido de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* en fibroblastos gingivales<sup>233</sup>. Así mismo, durante el proceso de fagocitosis por estimulación de componentes bacterianos, los macrófagos activan diversos procesos celulares, entre los que se encuentra la producción de especies reactivas del oxígeno y especies reactivas de nitrógeno. El incremento en la concentración de estas especies provoca daños en los tejidos. El flavonoide, proantocianidina obtenido de semillas de la uva presenta un amplio espectro de actividades biológicas entre las que se encuentra el control de la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa y por tanto del óxido nítrico en macrófagos estimulados con lipopolisacárido, por lo que estos resultados sugieren que las propiedades anti-oxidantes de este flavonoide, podría actuar como un agente en la prevención de la enfermedad periodontal<sup>234</sup>.

En otras investigaciones se ha demostrado de baicalina bloquea la degranulación de leucocitos polimorfonucleares inducida por interleucina-8 (IL-8), de igual manera, promueve una disminución en la liberación de MMP-8. Por lo que baicalina podría tener efectos en el control de enfermedad periodontal<sup>235</sup>.

Por otra parte, extractos de arándano enriquecidos en proantocianidina bloquean la producción de IL-8, IL-6 y PGE2 en fibroblastos gingivales tratados con lipopolisacárido obtenido de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.<sup>236</sup>

En otro reporte<sup>237</sup>, el grupo de investigadores mencionados anteriormente, reporta que extractos de arándano bloquean la síntesis de MMP-3, MMP-9 y elastasa en fibroblastos gingivales humanos tratados con lipopolisacárido obtenido de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

En otras investigaciones<sup>238</sup> se ha demostrado que (-)-epigallocatequina galato, el principal flavonoide presente en el té verde, induce apoptosis de osteoclastos y la modulación de la activación de caspasas en células tumorales. Se demostró



también que (-)-epigallocatequina galato en osteoclastos diferenciados a partir de RAW 264.7 inhibe de manera dependiente de la dosis la supervivencia de los osteoclastos. Con esta investigación la (-)-epigallocatequina previene la resorción del hueso alveolar mediante la inhibición de la supervivencia de osteoclastos a través de la apoptosis mediada por caspasa.

En otras investigaciones<sup>239</sup>, se ha demostrado que el flavonoide quercetina obtenido del cempasúchil, bloquea las acciones de lipopolisacáridos obtenidos de *Porphyromonas gingivalis* en fibroblastos gingivales humanos. Por otra parte, investigaciones realizadas en la Facultad de Odontología de Hong Kong muestran que el flavonoide naringenina bloquea el crecimiento de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y de *Porphyromonas gingivalis* en muy bajas concentraciones<sup>240</sup>.

En un estudio realizado en Fukuoka en Japón, <sup>241</sup> consistió en estudiar el efecto del consumo de la soya y las isoflavonas en la prevalencia de la enfermedad periodontal, para realizar este estudio se evaluaron a 3956 japonesas en el rango de edad de 18 a 22 años, los resultados de esta investigación señalan que la ingesta de isoflavonas produce un decremento en la enfermedad periodontal.

Estudios realizados en el Departamento de Periodoncia en la Escuela de Estomatología de la Universidad de Wuhan en China, mostraron que baicalina disminuye la expresión de COX-2 y de la enzima óxido nítrico sintasa en ratas que padecen enfermedad periodontal y la pérdida de hueso alveolar<sup>242</sup>.

Por otra parte, polifenoles obtenidos de manzana inhiben la producción de PGE2 en células epiteliales gingivales de humanos estimuladas con *Porphyromonas gingivalis*. Los polifenoles presentes en la manzana se caracterizaron como 2-[(2-metilpropanoil)-floroglucinol] 1-O-beta-D-glucopiranosido, quercetina 3-O-beta-D-



glucopiranosido (isoquercitrina) y kaemperol 3-O-beta-glucopiranosido (astragalina), los cuales bloquearon la producción de PGE2 inducida por PGE2<sup>243</sup>.

Por otra parte, carvacrol es una chalcona dimérica presente en una planta medicinal muy popular en Brasil, *Lippia sidoides* y *Myracrodruon urundeuva*, que ha mostrado tener actividades anti-microbiales y anti-inflamatorias, modelos de ratas con enfermedad periodontal se observó que el tratamiento con carvacrol inhibe la pérdida del hueso alveolar y el crecimiento de microorganismos periodontopatógenos.<sup>244</sup>

Así mismo, la quercetina obtenida de la hoja de *Lotus*, inhibe el crecimiento de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Actinomyces viscosus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* y *Actinomyces nucleatum* de manera dependiente de la dosis y desde dosis de 0.125 mg.<sup>245</sup>

Estudios realizados con naringenina obtenida del tomate inhibe la síntesis de citocinas promotoras de respuesta inflamatoria en macrófagos y en células de la sangre, así mismo bloquea la fosforilación de las serina 63 y 73 del proto-oncogene Jun que forma parte del factor de transcripción AP-1.<sup>246</sup>

En otras investigaciones, el tratamiento con baicalina en ratas con enfermedad periodontal, muestra que inhibe la expresión de MMP-2 y MMP-9<sup>247</sup>



## 7 Conclusiones

Los flavonoides son moléculas a las que se les ha demostrado una gran variedad de efectos entre los que se encuentran regular las respuestas inflamatorias, inhibir el desarrollo de tumores, así como la regulación de la presión sanguínea. Muchos de estos efectos se atribuyen a la estructura química, debido al anillo catecol que posee una importante capacidad secuestradora de radicales libres, así mismo el carbonilo en posición 4 y la conjugación del doble enlace entre los carbonos 2 y 3 y la presencia de grupo OH de la posición 5 contribuye en actuar como antioxidante. La conjugación del anillo piránico incrementa la estabilización de los radicales formados,

Entre las múltiples funciones de los flavonoides se encuentran las de su comportamiento como antioxidante para lo cual influye su concentración efectiva en el sitio donde la ERO se forma, la estabilidad del flavonoide al donar átomos de hidrógeno; la solubilidad en lípidos para ser capturados en membranas y de esta forma reparar el daño oxidativo. Sin embargo, aún debe tomarse con cautela los efectos de los flavonoides y realizar investigaciones encaminadas en establecer las dosis efectivas y los efectos tóxicos de los flavonoides por dosis elevadas, ya que en dietas vegetarianas las dosis mínimas quedan rebasadas.

Por otra parte, desde el siglo pasado se han realizado un gran número de investigaciones que señalan que los flavonoides presentan propiedades importantes en regular la expresión de citocinas que promueven respuestas inflamatorias y que inhiben el crecimiento de microorganismos periodontopatógenos. Sin embargo, aún no se cuenta con resultados concluyentes que permita utilizarlos de forma cotidiana en el tratamiento contra la enfermedad periodontal.



## **BIBLIOGRAFIA:**

- 1.- OMS (Enero de 2009.) Cáncer. Nota descriptiva N°297
- 2.- Winkel-Shirley, B. (2001) Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol* 126, 485-93.
- 3.- Middleton, E.M. and Teramura, A.H. (1993) The Role of Flavonol Glycosides and Carotenoids in Protecting Soybean from Ultraviolet-B Damage. *Plant Physiol* 103, 741-752.
- 4.- Hess, S., Alvarez, L., Iturra, G., Romero, M. (2002) Evidence of UV B differential response in *Sophora microphylla* from shady and sunny places. . *Soc. Chil. Quim.* 47, 501-510.
- 5.- Lewin G, Bert M, Dauguet JC, Dolley J, Moinet V, Gauduchon P, Le Talaër JY.(1992) Cytotoxicity of dimers with a chalcane skeleton. *J Nat Prod.* 1992 Nov;55(11):1679-81
- 6.- Miketova P, Schram KH, Whitney J, Li M, Huang R, Kerns E, Valcic S, Timmermann BN, Rourick R, Klohr S. (2000) Tandem mass spectrometry studies of green tea catechins. Identification of three minor components in the polyphenolic extract of green tea. *J Mass Spectrom.* 35(7):860-9.
- 7.- Hósel W, Barz W.(1975) Beta-Glucosidases from *Cicer arietinum* L. Purification and Properties of isoflavone-7-O-glucoside-specific beta-glucosidases. *Eur J Biochem.* 15;57(2):607-16.
- 8.- Lin F, Giusti MM.(2005) Effects of solvent polarity and acidity on the extraction efficiency of isoflavones from soybeans (*Glycine max*). *J Agric Food Chem.* 18;53(10):3795-800.



- 9.- Li J, Ou-Lee TM, Raba R, Amundson RG, Last RL.(1993) Arabidopsis Flavonoid Mutants Are Hypersensitive to UV-B Irradiation.Plant Cell.;5(2):171-179.
- 10.- Aquino R, Morelli S, Tomaino A, Pellegrino M, Saija A, Grumetto L, Puglia C, Ventura D, Bonina F.(2002) Antioxidant and photoprotective activity of a crude extract of *Culcitium reflexum* H.B.K. leaves and their major flavonoids.J Ethnopharmacol. 79(2):183-91.
- 11.- Gronquist M, Bezzerides A, Attygalle A, Meinwald J, Eisner M, Eisner T.(2001) Attractive and defensive functions of the ultraviolet pigments of a flower (*Hypericum calycinum*).Proc Natl Acad Sci U S A. 20;98(24):13745-50..
- 12.- Murphy A, Peer WA, Taiz L.(2000)Regulation of auxin transport by aminopeptidases and endogenous flavonoids.Planta;211(3):315-24.
- 13.- Hamazu Y, Kume C, Yasui H, Fujita T.(2007) Reddish coloration of Chinese quince (*Pseudocydonia sinensis*) procyanidins during heat treatment and effect on antioxidant and antiinfluenza viral activities.J Agric Food Chem. 21;55(4):1221-6.
- 14.- Jurd L, King AD Jr, Mihara K, Stanley WL.(1971) Antimicrobial properties of natural phenols and related compounds.Appl Microbiol. 21(3):507-10.
- 15.- Cingolani GM, Gualtieri F, Pignini M. (1971) Mannich bases of flavanones with antimicrobial activity. Farmaco Sci. 26(8):718-25.
- 16.- Williams RJ, Spencer JP.(2011) Flavonoids, cognition, and dementia: Actions, mechanisms, and potential therapeutic utility for Alzheimer disease.Free Radic Biol Med. Sep 17.
- 17.-Rubio,S. et al. (2006) Phenylbenzopyrones structure-activity studiesidentifybetuletol derivatives as potential antitumoral agents. Eur. J. Pharmacol., 548, 9-20



18.- Mandel SA, Amit T, Weinreb O, Youdim MB.(2011) Understanding the broad-spectrum neuroprotective action profile of green tea polyphenols in aging and neurodegenerative diseases. J Alzheimers Dis. 25(2):187-208.

19.-Pèrez-Sala,D. et al.(1995) Intracellular alkalinization suppresses lovastatin-induced apoptosis in HL-60 cells through the inactivation of a pH dependent endonuclease. J. Biol. Chem, 270, 6235-6242.

20.- Mandel SA, Amit T, Weinreb O, Youdim MB.(2011) Understanding the broad-spectrum neuroprotective action profile of green tea polyphenols in aging and neurodegenerative diseases.J Alzheimers Dis. 25(2):187-208.

21.- Keinan BL, Peeters PH, Mulligan AA, Navarro C, Slimani N (2002) Consumption of soy products in 10 European countries.; EPIC Working Group on Dietary Patterns, Sub-Group on Soy Consumption.IARC Sci Publ. 156:105-8

22.- Chun OK, Floegel A, Chung SJ, Chung CE, Song WO, Koo SI.(2009) Estimation of antioxidant intakes from diet and supplements in U.S. adults. J Nutr. 140(2):317-24.

23.- Laggiou P, Samoli E, Laggiou A, Katsouyanni K, Peterson J, Dwyer J, Trichopoulos D. (2003)Flavonoid intake in relation to lung cancer risk: case-control study among women in Greece.Nutr Cancer. 2004;49(2):139-43.

24.- Peterson J, Laggiou P, Samoli E, Laggiou A, Katsouyanni K, La Vecchia C, Dwyer J, Trichopoulos D.(2003) Flavonoid intake and breast cancer risk: a case--control study in Greece.Br J Cancer. 6;89(7):1255-9



- 25.- Wang Y, Chung SJ, Song WO, Chun OK.(2011) Estimation of daily proanthocyanidin intake and major food sources in the U.S. diet.J Nutr. 141(3):447-52.
- 26.- Hughes LA, Arts IC, Ambergen T, Brants HA, Dagnelie PC, Goldbohm RA, van den Brandt PA, Weijnenberg MP (2008) Higher dietary flavone, flavonol, and catechin intakes are associated with less of an increase in BMI over time in women: a longitudinal analysis from the Netherlands Cohort Study.Am J Clin Nutr.88(5):1341-52.
- 27.- Roach VJ, Cheung TF, Chung TK, Hjelm NM, Waring MA, Loong EP, Haines CJ.(1998) Phytoestrogens: dietary intake and excretion in postmenopausal Chinese women.Climacteric. 1(4):290-5.
- 28.- Johannot L, Somerset SM. (2006) Age-related variations in flavonoid intake and sources in the Australian population.Public Health Nutr.9(8):1045-54
- 29.- Hernández-Ramírez RU, Galván-Portillo MV, Ward MH, Agudo A, González CA, Oñate-Ocaña LF, Herrera-Goepfert R, Palma-Coca O, López-Carrillo L. (2009) Dietary intake of polyphenols, nitrate and nitrite and gastric cancer risk in Mexico City.Int J Cancer. 15;125(6):1424-30.
- 30.- Perez-Vizcaino F, Duarte J. (2010) Flavonols and cardiovascular disease.Mol Aspects Med. 31(6):478-94.
- 31.- Yap S, Qin C, Woodman OL. (2010) Effects of resveratrol and flavonols on cardiovascular function: Physiological mechanisms. Biofactors 36(5):350-9.
- 32.- Arab L, Liebeskind DS.(2010) Tea, flavonoids and stroke in man and mouse.Arch Biochem Biophys. 1;501(1):31-6.



- 33.- Duarte J, Pérez-Palencia R, Vargas F, Ocete MA, Pérez-Vizcaino F, Zarzuelo A, Tamargo J.(2001) Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats.Br J Pharmacol. 133(1):117-24.
- 34.- Knekt P, Isotupa S, Rissanen H, Heliövaara M, Järvinen R, Häkkinen S, Aromaa A, Reunanen A (2000). Quercetin intake and the incidence of cerebrovascular disease. Eur J Clin Nutr. 54(5):415-7.
- 35.- Duarte J, Jiménez R, O'Valle F, Galisteo M, Pérez-Palencia R, Vargas F, Pérez-Vizcaíno F, Zarzuelo A, Tamargo J. (2002) Protective effects of the flavonoid quercetin in chronic nitric oxide deficient rats. J Hypertens. 20(9):1843-54.
- 36.- McKay DL, Chen CY, Saltzman E, Blumberg JB. (2010) Hibiscus sabdariffa L. tea (tisane) lowers blood pressure in prehypertensive and mildly hypertensive adults.J Nutr. 140(2):298-303.
- 37.- Most MM.(2004) Estimated phytochemical content of the dietary approaches to stop hypertension (DASH) diet is higher than in the Control Study Diet.J Am Diet Assoc. 104(11):1725-7.
- 38.- Willcox DC, Willcox BJ, Todoriki H, Suzuki M. (2009) The Okinawan diet: health implications of a low-calorie, nutrient-dense, antioxidant-rich dietary pattern low in glycemic load.J Am Coll Nutr. 28 Suppl:500S-516S.
- 39.- Aoi W, Niisato N, Miyazaki H, Marunaka Y.(2004) Flavonoid-induced reduction of ENaC expression in the kidney of Dahl salt-sensitive hypertensive rat.Biochem Biophys Res Commun. 19;315(4):892-6.



- 40.- Fujimoto S, Niisato N, Sugimoto T, (2005) Marunaka Y. Quercetin and NPPB-induced diminution of aldosterone action on Na<sup>+</sup> absorption and ENaC expression in renal epithelium. *Biochem Biophys Res Commun.* 21;336(2):401-7.
- 41.- Dohadwala MM, Hamburg NM, Holbrook M, Kim BH, Duess MA, Levit A, Titas M, Chung WB, Vincent FB, Caiano TL, Frame AA, Keaney JF Jr, Vita JA. (2010) Effects of Concord grape juice on ambulatory blood pressure in prehypertension and stage 1 hypertension. *Am J Clin Nutr.* 92(5):1052-9.
- 42.- Zibadi S, Rohdewald PJ, Park D, Watson RR. (2008) Reduction of cardiovascular risk factors in subjects with type 2 diabetes by Pycnogenol supplementation. *Nutr Res.* 28(5):315-20.
- 43.- Liu X, Wei J, Tan F, Zhou S, Würthwein G, Rohdewald P. (2004) Pycnogenol, French maritime pine bark extract, improves endothelial function of hypertensive patients. *Life Sci.* 2;74(7):855-62.
- 44.- Packer L, Rimbach G, Virgili F. (1999) Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritima*) bark, pycnogenol. *Free Radic Biol Med.* 27(5-6):704-24
- 45.- Takahashi A, Masuda A, Sun M, Centonze VE, Herman B. (2004) Oxidative stress-induced apoptosis is associated with alterations in mitochondrial caspase activity and Bcl-2-dependent alterations in mitochondrial pH (pH<sub>m</sub>). *Brain Res Bull.* 15;62(6):497-504



- 46.- Brás A, Monteiro C, Rueff J. (1989) Oxidative stress in trisomy 21. A possible role in cataractogenesis. *Ophthalmic Paediatr Genet.* 10(4):271-7.
- 47.- Shiraki M, Hara Y, Osawa T, Kumon H, Nakayama T, Kawakishi S. (1994) Antioxidative and antimutagenic effects of theaflavins from black tea. *Mutat Res.* 323(1-2):29-34.
- 48.- Zhao BL, Li XJ, He RG, Cheng SJ, Xin WJ. (1989) Scavenging effect of extracts of green tea and natural antioxidants on active oxygen radicals. *Cell Biophys.* 14(2):175-85.
- 49.- Guimarães R, Barros L, Barreira JC, Sousa MJ, Carvalho AM, Ferreira IC. (2010) Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: grapefruit, lemon, lime and orange. *Food Chem Toxicol.* 2010 Jan;48(1):99-106.
- 50.- Jacobs H, Moalin M, van Gisbergen MW, Bast A, van der Vijgh WJ, Haenen GR. (2011) An essential difference in the reactivity of the glutathione adducts of the structurally closely related flavonoids monohesperidin and quercetin. *Free Radic Biol Med.* Sep 17.
- 51.- Howell MA. (1974) Factor analysis of international cancer mortality data and per capita food consumption. *Br J Cancer* 29(4):328-36
- 52.- A S, J C, A S, F C. Nutritional Antioxidants and Adaptive Cell Responses: an Update. *Curr Mol Med.* 2011 Dec 1.
- 53.- Forester SC, Lambert JD. (2011) The role of antioxidant versus pro-oxidant effects of green tea polyphenols in cancer prevention. *Mol Nutr Food Res* 55(6):844-54.
- 54.- Xu G, Huang W, Zhang WM, Lai ZS, He MR, Wang YD, Zhang YL. (2005) Effects of combined use of curcumin and catechin on cyclooxygenase-2 mRNA



expression in dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao.*;25(1):48-52.

55.- Li Y, Sarkar FH. (2002) Down-regulation of invasion and angiogenesis-related genes identified by cDNA microarray analysis of PC3 prostate cancer cells treated with genistein. *Cancer Lett.* 5;186(2):157-64.

56.- Kousidou OC, Mitropoulou TN, Roussidis AE, Kletsas D, Theocharis AD, Karamanos NK. (2005) Genistein suppresses the invasive potential of human breast cancer cells through transcriptional regulation of metalloproteinases and their tissue inhibitors. *Int J Oncol.* 26(4):1101-9.

57.- Pollard M, Luckert PH. (1997) Influence of isoflavones in soy protein isolates on development of induced prostate-related cancers in L-W rats. *Nutr Cancer.* 28(1):41-5.

58.- Zhang JX, Hallmans G, Landström M, Bergh A, Damber JE, Aman P, Adlercreutz H. (1997) Soy and rye diets inhibit the development of Dunning R3327 prostatic adenocarcinoma in rats. *Cancer Lett.* 19;114(1-2):313-4.

59.- Kim JE, Lee DE, Lee KW, Son JE, Seo SK, Li J, Jung SK, Heo YS, Mottamal M, Bode AM, Dong Z, Lee HJ. (2011) Isorhamnetin suppresses skin cancer through direct inhibition of MEK1 and PI3-K. *Cancer Prev Res (Phila).* 4(4):582-91.

60.- Nandakumar V, Vaid M, Katiyar SK. (2011) (-)-Epigallocatechin-3-gallate reactivates silenced tumor suppressor genes, Cip1/p21 and p16INK4a, by reducing DNA methylation and increasing histones acetylation in human skin cancer cells. *Carcinogenesis.* 32(4):537-44.

61.- Huang X, Zhu HL. (2011) Resveratrol and its analogues: promising antitumor agents. *Anticancer Agents Med Chem.* 11(5):479-90



- 62.- Wood LG, Wark PA, Garg ML.(2010) Antioxidant and anti-inflammatory effects of resveratrol in airway disease. *Antioxid Redox Signal.* 15;13(10):1535-48
- 63.- Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM.(1997) Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science.* 10;275(5297):218-20.
- 64.- George J, Singh M, Srivastava AK, Bhui K, Roy P, Chaturvedi PK, Shukla Y. (2011) Resveratrol and Black Tea Polyphenol Combination Synergistically Suppress Mouse Skin Tumors Growth by Inhibition of Activated MAPKs and p53. *PLoS One.*;6(8):e23395
- 65.- Hsu MH, Savas U, Lasker JM, Johnson EF. Genistein, resveratrol, and 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribofuranoside induce cytochrome P450 4F2 expression through an AMP-activated protein kinase-dependent pathway. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011 Apr;337(1):125-36.
- 66.- Wagner, H., Bladt, S., Zgainski, E. M., "Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas"; traducido al inglés por T. A. Scott, Springer-Verlag, BerlinHeidelberg-New York-Tokio, 1984.
- 67.- Matern U, Heller W, Himmelpach K. (1983) Conformational changes of apigenin 7-O-(6-O-malonylglucoside), a vacuolar pigment from parsley, with solvent composition and proton concentration. *Eur J Biochem.* 15;133(2):439-48.
- 68.- Klein M, Martinoia E, Hoffmann-Thoma G, Weissenböck G. (2000) A membrane-potential dependent ABC-like transporter mediates the vacuolar uptake of rye flavone glucuronides: regulation of glucuronide uptake by glutathione and its conjugates. *Plant J.* 21(3):289-304.



- 69.- Klein M, Martinoia E, Hoffmann-Thoma G, Weissenböck G.(2001) The ABC-like vacuolar transporter for rye mesophyll flavone glucuronides is not species-specific. *Phytochemistry*. 56(2):153-9.
- 70.- Ono E, Hatayama M, Isono Y, Sato T, Watanabe R, Yonekura-Sakakibara K, Fukuchi-Mizutani M, Tanaka Y, Kusumi T, Nishino T, Nakayama T.(2006) Localization of a flavonoid biosynthetic polyphenol oxidase in vacuoles. *Plant J*. 45(2):133-43.
- 71.- Marinova K, Kleinschmidt K, Weissenböck G, Klein M. (2007) Flavonoid biosynthesis in barley primary leaves requires the presence of the vacuole and controls the activity of vacuolar flavonoid transport. *Plant Physiol*144(1):432-44.
- 72.- Cosio EG, McClure JW. (1984) Kaempferol glycosides and enzymes of flavonol biosynthesis in leaves of a soybean strain with low photosynthetic rates. *Plant Physiol*. 74(4):877-81.
- 73.- Heller W, Egin-Bühler B, Gardiner SE, Knobloch KH, Matern U, Ebel J, Hahlbrock K.(1979) Enzymes of General Phenylpropanoid Metabolism and of Flavonoid Glycoside Biosynthesis in Parsley: Differential Inducibility by Light during the Growth of Cell Suspension Cultures. *Plant Physiol*. 64(3):371-3.
- 74.- Walton DC. (1968) I-Phenylalanine Ammonia-Lyase Activity During Germination of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol*. 43(7):1120-4.
- 75.- Davis BD. (1951) Aromatic biosynthesis. I. The role of shikimic acid. *J Biol Chem*. 191(1):315-25.
- 76.- Brown SA, Neish AC. (1955) Shikimic acid as a precursor in lignin biosynthesis. *Nature*. 16;175(4459):688-9.



- 77.- Buszewski B, Kawka S, Supryniewicz Z, Wolski T.(1993) Simultaneous isolation of Rutin and Esculin from plant material and drugs using solid-phase extraction. *J Pharm Biomed Anal.* 11(3):211-5.
- 78.- Adamson GE, Lazarus SA, Mitchell AE, Prior RL, Cao G, Jacobs PH, Kremers BG, Hammerstone JF, Rucker RB, Ritter KA, Schmitz HH.(1999) HPLC method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity. *J Agric Food Chem.* 47(10):4184-8.
- 79.- Chakir S, Leroy P, Nicolas A, Ziegler JM, Labory P.(1987) High-performance liquid chromatographic analysis of glucuronic acid conjugates after derivatization with 4-bromomethyl-7-methoxycoumarin. *J Chromatogr.* 12;395:553-61.
- 79.- He J, Giusti MM. (2011) High-purity isolation of anthocyanins mixtures from fruits and vegetables - A novel solid-phase extraction method using mixed mode cation-exchange chromatography. *J Chromatogr A.* 4;1218(44):7914-22.
- 80.- Johns P, Dowlati L, Wargo W.(2003) Determination of isoflavones in ready-to-feed soy-based infant formula. *J AOAC Int.* 86(1):72-8.
- 81.- Weber G, Koniecznyński P. (2003) Speciation of Mg, Mn and Zn in extracts of medicinal plants. *Anal Bioanal Chem*375(8):1067-73.
- 82.- Magalhães PJ, Vieira JS, Gonçalves LM, Pacheco JG, Guido LF, Barros AA. (2010) Isolation of phenolic compounds from hop extracts using polyvinylpyrrolidone: characterization by high-performance liquid chromatography-diode array detection-electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 7;1217(19):3258-68.
- 83.- García LA, Vélez AJ, de Roza MP.(1985)[Extraction and quantification of polyphenols from coffee pulp]. *Arch Latinoam Nutr.* 1985 Sep;35(3):491-5



- 84.- Ishii K, Furuta T, Kasuya Y. (2003) High-performance liquid chromatographic determination of quercetin in human plasma and urine utilizing solid-phase extraction and ultraviolet detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 25;794(1):49-56.
- 85.- Kimmich GA, Carter-Su C, Randles J. (1977) Energetics of Na<sup>+</sup>-dependent sugar transport by isolated intestinal cells: evidence for a major role for membrane potentials. *Am J Physiol.* 233(5):E357-62.
- 86.- Williamson G, Dionisi F, Renouf M. (2011) Flavanols from green tea and phenolic acids from coffee: critical quantitative evaluation of the pharmacokinetic data in humans after consumption of single doses of beverages. *Mol Nutr Food Res.* 2011 Jun;55(6):864-73.
- 87.- Palafox-Carlos H, Ayala-Zavala JF, González-Aguilar GA. (2011) The role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable antioxidants. *J Food Sci.* 76(1):R6-R15
- 88.- Reinboth M, Wolfram S, Abraham G, Ungemach FR, Cermak R. (2010) Oral Bioavailability of quercetin from different quercetin glycosides. *Br. J. Nutr.* 16: 1-6.
- 89.- Welt K, Weiss J, Martin R, Dettmer D, Hermsdorf T, Asayama K, Meister S, Fitzl G. (2004) Ultrastructural, immunohistochemical and biochemical investigations of the rat liver exposed to experimental diabetes and acute hypoxia with and without application of Ginkgo extract. *Exp Toxicol Pathol.* 55(5):331-45.
- 90.- Yao P, Li K, Song F, Zhou S, Sun X, Zhang X, Nüssler AK, Liu L. (2007) Heme oxygenase-1 upregulated by Ginkgo biloba extract: potential protection against ethanol-induced oxidative liver damage. *Food Chem Toxicol.* 45(8):1333-42.



- 91.- Naik SR, Panda VS. (2007) Antioxidant and hepatoprotective effects of Ginkgo biloba phytosomes in carbon tetrachloride-induced liver injury in rodents. *Liver Int.* 27(3):393-9.
- 92.- Basarkar PW, Nath N. (1981) Cholesterol lowering action of vitamin P-like compounds in rats. *Indian J Exp Biol.* 9(8):787-9.
- 93.- Kawai Y. (2011) Immunochemical detection of food-derived polyphenols in the aorta: macrophages as a major target underlying the anti-atherosclerotic activity of polyphenols. *Biosci Biotechnol Biochem* 75(4):609-17.
- 94.- Lippi G, Franchini M, Favalaro EJ, Targher G. (2010) Moderate red wine consumption and cardiovascular disease risk: beyond the "French paradox". *Semin Thromb Hemost.* 2010 Feb;36(1):59-70.
- 95.- Guo H, Liu L, Shi Y, Sun A, Xu F, Chi J, Huang D. (2010) Chinese yellow wine and red wine inhibit matrix metalloproteinase-2 and improve atherosclerotic plaque in LDL receptor knockout mice. *Cardiovasc Ther.* 28(3):161-8.
- 96.- Detre Z, Jellinek H, Miskulin M, Robert AM. (1986) Studies on vascular permeability in hypertension: action of anthocyanosides. *Clin Physiol Biochem.* 4(2):143-9.
- 97.- Yi L, Jin X, Chen CY, Fu YJ, Zhang T, Chang H, Zhou Y, Zhu JD, Zhang QY, Mi MT. (2011) Chemical Structures of 4-Oxo-Flavonoids in Relation to Inhibition of Oxidized Low-Density Lipoprotein (LDL)-Induced Vascular Endothelial Dysfunction. *Int J Mol Sci.* 12(9):5471-5489.
- 98.- Korkina L, Kostyuk V, De Luca C, Pastore S. (2011) Plant Phenylpropanoids as Emerging Anti-Inflammatory Agents. *Mini Rev Med Chem.* Jul 15.



99.- González R, Ballester I, López-Posadas R, Suárez MD, Zarzuelo A, Martínez-Augustin O, Sánchez de Medina F. (2011) Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 51(4):331-62.

100.- Chen YC, Shen SC, Lee WR, Hou WC, Yang LL, Lee TJ. (2011) Inhibition of nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide induced inducible NOS and cyclooxygenase-2 gene expressions by rutin, quercetin, and quercetin pentaacetate in RAW 264.7 macrophages. *J Cell Biochem.* 82(4):537-48.

101.- Chen YC, Shen SC, Chen LG, Lee TJ, Yang LL. (2011) Wogonin, baicalin, and baicalein inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 gene expressions induced by nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide. *Biochem Pharmacol.* 1;61(11):1417-27.

102.- Tetsuka T, Baier LD, Morrison AR. (1996) Antioxidants inhibit interleukin-1-induced cyclooxygenase and nitric-oxide synthase expression in rat mesangial cells. Evidence for post-transcriptional regulation. *J Biol Chem.* 17;271(20):11689-93.

103.- Lee KW, Chun KS, Lee JS, Kang KS, Surh YJ, Lee HJ. (2004) Inhibition of cyclooxygenase-2 expression and restoration of gap junction intercellular communication in H-ras-transformed rat liver epithelial cells by caffeic acid phenethyl ester. *Ann N Y Acad Sci.* 1030:501-7.

104.- Rossi A, Ligresti A, Longo R, Russo A, Borrelli F, Sautebin L. (2002) The inhibitory effect of propolis and caffeic acid phenethyl ester on cyclooxygenase activity in J774 macrophages. *Phytomedicine.* 9(6):530-5.

105.- Ikuta S, Edamatsu H, Li M, Hu L, Kataoka T. (2008) Crucial role of phospholipase C epsilon in skin inflammation induced by tumor-promoting phorbol ester. *Cancer Res.* 1;68(1):64-72.



106.- Griner EM, Kazanietz MG.(2007) Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer.Nat Rev Cancer. 4):281-94.

107.- Aziz MH, Manoharan HT, Sand JM, Verma AK.(2007) Protein kinase Cepsilon interacts with Stat3 and regulates its activation that is essential for the development of skin cancer. Mol Carcinog. 46(8):646-53

108.- Lee SF, Lin JK. (1997) Inhibitory effects of phytopolyphenols on TPA-induced transformation, PKC activation, and c-jun expression in mouse fibroblast cells.Nutr Cancer. 1997;28(2):177-83.

109.- Ferriola PC, Cody V, Middleton E Jr. (1989) Protein kinase C inhibition by plant flavonoids. Kinetic mechanisms and structure-activity relationships. Biochem Pharmacol. 15;38(10):1617-24

110.- de Wet H, McIntosh DB, Conseil G, Baubichon-Cortay H, Krell T, Jault JM, Daskiewicz JB, Barron D, Di Pietro A. (2001) Sequence requirements of the ATP-binding site within the C-terminal nucleotide-binding domain of mouse P-glycoprotein: structure-activity relationships for flavonoid binding. Biochemistry. 28;40(34):10382-91.

111.- Raspaglio G, Ferrandina G, Ferlini C, Scambia G, Ranelletti FO. (2003) Epidermal growth factor-responsive laryngeal squamous cancer cell line Hep2 is more sensitive than unresponsive CO-K3 one to quercetin and tamoxifen apoptotic effects.Oncol Res. 14(2):83-91.

112.- Rogers JC, Williams DL Jr. (1989) Kaempferol inhibits myosin light chain kinase. Biochem Biophys Res Commun. 16;164(1):419-25.



- 113.- Devika PT, Mainzen Prince PS. (2008) (-)-Epigallocatechin gallate (EGCG) prevents isoprenaline-induced cardiac marker enzymes and membrane-bound ATPases. *J Pharm Pharmacol.* 60(1):125-33.
- 114.- Mezesova L, Bartekova M, Javorkova V, Vlkovicova J, Breier A, Vrbjar N. (2010) Effect of quercetin on kinetic properties of renal Na,K-ATPase in normotensive and hypertensive rats. *J Physiol Pharmacol.* 61(5):593-8.
- 115.- Choi JH, Cha BK, Rhee SJ. (1998) Effects of green tea catechin on hepatic microsomal phospholipase A2 activities and changes of hepatic phospholipid species in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 44(5):673-83.
- 116.- Ha TJ, Shimizu K, Ogura T, Kubo I. (2010) Inhibition mode of soybean lipoxygenase-1 by quercetin. *Chem Biodivers.* 7(8):1893-903
- 117.- Jin YR, Han XH, Zhang YH, Lee JJ, Lim Y, Chung JH, Yun YP. (2007) Antiplatelet activity of hesperetin, a bioflavonoid, is mainly mediated by inhibition of PLC-gamma2 phosphorylation and cyclooxygenase-1 activity. *Atherosclerosis.* 2007 Sep;194(1):144-52.
- 118.- Guabiraba R, Campanha-Rodrigues AL, Souza AL, Santiago HC, Lugnier C, Alvarez-Leite J, Lemos VS, Teixeira MM.(2010) The flavonoid dioclein reduces the production of pro-inflammatory mediators in vitro by inhibiting PDE4 activity and scavenging reactive oxygen species. *Eur J Pharmacol.* 10;633(1-3):85-92.
- 119.- Kim DC, Rho SH, Shin JC, Park HH, Kim D. (2011) Inhibition of melanogenesis by 5,7-dihydroxyflavone (chrysin) via blocking adenylyl cyclase activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 22;411(1):121-5.
- 120.- Nagai T, Miyaichi Y, Tomimori T, Yamada H.(1989) Inhibition of mouse liver sialidase by plant flavonoids. *Biochem Biophys Res Commun.* 30;163(1):25-31.



- 121.- Nagai T, Yamada H, Otsuka Y.(1989) Inhibition of mouse liver sialidase by the root of *Scutellaria baicalensis*. *Planta Med* 55(1):27-9.
- 122.- Aoyagi T, Hazato T, Kumagai M, Hamada M, Takeuchi T.(1975) Isoflavone rhamniosides inhibitors of beta-galactosidase produced by actinomycetes. *J Antibiot (Tokyo)*. 28(12):1006-8.
- 123.- Nones J, Stipursky J, Costa SL, Gomes FC.(2010) Flavonoids and astrocytes crosstalking: implications for brain development and pathology. *Neurochem Res*.35(7):955-66.
- 124.- Hou DX, Yanagita T, Uto T, Masuzaki S, Fujii M (2005) Anthocyanidins inhibit cyclooxygenase-2 expression in LPS-evoked macrophages: structure-activity relationship and molecular mechanisms involved. *Biochem Pharmacol* 70:417-425.
- 125- Ruiz PA, Haller D. (2006) Functional diversity of flavonoids in the inhibition of the proinflammatory NF-kappaB, IRF, and Akt signaling pathways in murine intestinal epithelial cells. *J Nutr* 136:664-671.
- 126.- Sánchez-Campos S, López-Acebo R, González P, JM Culebras, MJ Tuñón, González-Gallego J. (1998) Cholestasis and alterations of glutathione metabolism induced by tacrolimus (FK506) in the rat. *Transplantation* 15: 66(1) 84-88
- 127.- Simões A, Porawski M, Alonso M, Collado PS, Marroni N, González-Gallego J (2005) Quercetin decreases oxidative stress, NF-kappaB activation, and iNOS overexpression in liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nutr* 135:299-304.
- 38.- Szabó C, Billiar TR. (1999) Novel roles of nitric oxide in hemorrhagic shock. *12 (1) :1-9*.
- 39.- Mauriz JL, Matilla B, Culebras JM, González P, González-Gallego (2001) Dietary glycine inhibits activation of nuclear factor kappa B and prevents liver injury



in hemorrhagic shock in the rat *Free Radic Biol Med* 15; 31 (10):1236-124.-  
Beighton, D. (2005). The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process. *Community Dent. Oral Epidemiol.* 33:248-255.

125.- Belli, W. A., D. H. Buckley, and R. E. Marquis. (1995). Weak acid effects and fluoride inhibition of glycolysis by *Streptococcus mutans* GS-5. *Can. J. Microbiol.* 41:785-791

126.- Belli, W. A., and R. E. Marquis. (1991). Adaptation of *Streptococcus mutans* and *Enterococcus hirae* to acid stress in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1134-1138.

127.- Bencini, D. A., M. S. Shanley, J. R. Wild, and G. A. O'Donovan. (1983) New assay for enzymatic phosphate release: application to aspartate transcarbamylase and other enzymes. *Anal. Biochem.* 132:259-264. 5. Bender,

128.- G. R., S. V. Sutton, and R. E. Marquis. (1986) Acid tolerance, proton permeabilities, and membrane ATPases of oral streptococci. *Infect. Immun.* 53:331-338.

129.- Bennick, A. (2002). Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 13:184-196.

130.- Bowen, W. H. (2002). Do we need to be concerned about dental caries in the coming millennium? *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 13:126-131.

131.- Lemos, J. A., J. Abranches, and R. A. Burne. (2005) Responses of cariogenic streptococci to environmental stresses. *Curr. Issues Mol. Biol.* 7:95-107.

132.- Lemos, J. A., and R. A. Burne. (2008) A model of efficiency: stress tolerance by *Streptococcus mutans*. *Microbiology* 154:3247-3255

133.- Loesche, W. J. (1986) Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol. Rev.* 50:353-380.



- 134.- Hamada, S., and H. D. Slade. (1980) Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol. Rev. 44:331-384.
- 135.- Schilling KM, Bowen WH.(1992) Glucans synthesized in situ in experimental salivary pellicle function as specific binding sites for *Streptococcus mutans*. Infect Immun. 60(1):284-95.
- 136.- Dashper, S. G., and E. C. Reynolds. (1992) pH regulation by *Streptococcus mutans*. J. Dent. Res. 71:1159-1165.
- 137.- Kobayashi, H. (1985) A proton-translocating ATPase regulates pH of the bacterial cytoplasm. J. Biol. Chem. 260:72-76.
- 138.- Kobayashi, H., T. Suzuki, and T. Unemoto. (1986) Streptococcal cytoplasmic pH is regulated by changes in amount and activity of a proton-translocating ATPase. J. Biol. Chem. 261:627-630
- 139.- Griswold, A. R., Y. Y. Chen, and R. A. Burne. (2004) Analysis of an agmatine deiminase gene cluster in *Streptococcus mutans* UA159. J. Bacteriol. 186:1902-1904.
- 140.- Griswold, A. R., M. Jameson-Lee, and R. A. Burne. (2006) Regulation and physiologic significance of the agmatine deiminase system of *Streptococcus mutans* UA159. J. Bacteriol. 188:834-841.
- 141.- Jones, C., K. Woods, G. Whittle, H. Worthington, and G. Taylor. (1999) Sugar, drinks, deprivation and dental caries in 14-year-old children in the north west of England in 1995. Community Dent. Health 16:68-71.
- 142.- Chen, A., J. D. Hillman, and M. Duncan. (1994). I-(+)-lactate dehydrogenase deficiency is lethal in *Streptococcus mutans*. J. Bacteriol. 176:1542-1545.
- 143.- Hillman, J. D., A. Chen, and J. L. Snoep. (1996). Genetic and physiological analysis of the lethal effect of I-(+)-lactate dehydrogenase deficiency in *Streptococcus mutans*: complementation by alcohol dehydrogenase from *Zymomonas mobilis*. Infect. Immun. 64:4319-4323.



- 144.- Lemos, J. A., J. Abranches, and R. A. Burne. (2005) Responses of cariogenic streptococci to environmental stresses. *Curr. Issues Mol. Biol.* 7:95-107.
- 145.- Matsumoto-Nakano, M., K. Fujita, and T. Ooshima. (2007) Comparison of glucan-binding proteins in cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol. Immunol.* 22:30-35.
- 146.- DePaola, P. F., et al. (1993) The relative anticaries effectiveness of sodium monofluorophosphate and sodium fluoride as contained in currently available dentifrice formulations. *Am. J. Dent.* 6(Spec. No.):S7-S12.
- 147.- Featherstone, J. D. (2009) Remineralization, the natural caries repair process—the need for new approaches. *Adv. Dent. Res.* 21:4-7.
- 148.- Newbrun, E. (1989) Effectiveness of water fluoridation. *J. Public Health Dent.* 49:279-289.
- 149.- ten Cate JM. (2009) The need for antibacterial approaches to improve caries control. *Adv Dent Res.* 21(1):8-12.
- 150.- Graham, H. N. (1992) Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Prev. Med.* 21:334-350.
- 151.- Hamilton-Miller, J. M. (2001) Anti-cariogenic properties of tea (*Camellia sinensis*). *J. Med. Microbiol.* 50:299-302.
- 152.- Hamilton-Miller, J. M. (1995) Antimicrobial properties of tea (*Camellia sinensis* L.). *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:2375-2377.
- 153.- Rasheed A, Haider M. (1998) Antibacterial activity of *Camellia sinensis* extracts against dental caries. *Arch Pharm Res.* 21(3):348-52.
- 154.- Sakanaka, S., M. Kim, M. Taniguchi, and T. Yamamoto. (1989) Antibacterial substances in Japanese green tea extract against *Streptococcus mutans*, a cariogenic bacterium. *Agric. Biol. Chem.* 53:2307-2311.
- 155.- Taylor, P. W., J. M. Hamilton-Miller, and P. D. Stapleton. (2005) Antimicrobial properties of green tea catechins. *Food Sci. Technol. Bull.* 2:71-81
- 156.- Wu, C. D., and G. Wei. (2009) Tea as a functional food for oral health, p. 396-417. *In* M. Wilson (ed.), *Food constituents and oral health: current status and future prospect*. Woodhead Publishing, Cambridge, United Kingdom.



- 157.- Wu, C. D., and G. X. Wei. (2002) Tea as a functional food for oral health. *Nutrition* 18:443-444.
- 158.- Ooshima T, Minami T, Aono W, Izumitani A, Sobue S, Fujiwara T, Kawabata S, Hamada S. (1993) Oolong tea polyphenols inhibit experimental dental caries in SPF rats infected with mutans streptococci. *Caries Res.* 27(2):124-9.
- 159.- Ooshima T, Minami T, Matsumoto M, Fujiwara T, Sobue S, Hamada S. (1998) Comparison of the cariostatic effects between regimens to administer oolong tea polyphenols in SPF rats. *Caries Res.* 1998;32(1):75-80.
- 160.- Otake S, Makimura M, Kuroki T, Nishihara Y, Hirasawa M. (1991) Anticaries effects of polyphenolic compounds from Japanese green tea. *Caries Res.* 25(6):438-43.
- 161.- Rosen, S., M. Elvin-Lewis, F. M. Beck, and E. X. Beck. (1984) Anticariogenic effects of tea in rats. *J. Dent. Res.* 63:658-660.
- 162.- Jones, C., K. Woods, G. Whittle, H. Worthington, and G. Taylor. (1999) Sugar, drinks, deprivation and dental caries in 14-year-old children in the north west of England in 1995. *Community Dent. Health* 16:68-71
- 163.- Parajas, I. L. (1995) Caries preventive effect of wild tea (tsaang-gubat) among school children. *J. Philipp. Dent. Assoc.* 47:3-13.
- 164.- Hattori, M., I. T. Kusumoto, T. Namba, T. Ishigami, and Y. Hara. (1990) Effect of tea polyphenols on glucan synthesis by glucosyltransferase from *Streptococcus mutans*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 38:717-720.
- 165.- He, Q., Y. Lv, and K. Yaa. (2007) Effects of tea polyphenols on the activities of  $\alpha$ -amylase, pepsin, trypsin and lipase. *Food Chem.* 101:1178-1182.
- 166.- Muroi, H., and I. Kubo. (1993) Combination effects of antibacterial compounds in green tea flavor against *Streptococcus mutans*. *J. Agric. Food Chem.* 41:4.
- 167.- Nakahara, K., et al. (1993) Inhibitory effect of oolong tea polyphenols on glycosyltransferases of mutans streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:968-973.



168.- Zhang, J., and S. Kashket. (1998) Inhibition of salivary amylase by black and green teas and their effects on the intraoral hydrolysis of starch. *Caries Res.* 32:233-238.

169.- Knight JA.(2000) Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Ann Clin Lab Sci.* 30(2):145-58.

170.-Halliwell B, Gutteridge J. *Free radicals in Biology and Medicine.* 3 ed. Oxford: Science Publication; 1998.

171.-Gutteridge J, Halliwell B. *Antioxidant protection and oxygen radical signaling: reactive oxygen species in biological systems: an interdisciplinary approach.* New York: Plenum Publishers; 1999.

172.-Gamaley IA, Kluybin IV. Roles of reactive oxygen species: signaling and regulation of cellular functions. *Int Review Cytology* 1999; 188:203-55.

173.-Stadtman ER, Berlett BS, Fenton C.(1991) Amino acid oxidation. *J Biol Chem*; 266 (26): 17201-11.

174.-Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of aging. *Nature* 2000; 408:239-47.

175.-Mates JM, Sánchez-Jiménez F.(1999) Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Frontiers in Bioscience.* 4:339-45.

176.-Boffill M. (2000) Los flavonoides, antioxidantes naturales. *Boletín de Educación Bioquímica.* 19(2):95-100.

177,-Salonen JT. (1995) Risk of cancer in relation to serum concentration of selenium and vitamins A and E: matched case control analysis of prospective data. *Brit Med J* 290:417.



- 178.-Kubota T, Nombra T, Takahashi T, Hara K. (1996) Expression of mRNA for matrix metalloproteinases and their inhibition of metalloproteinases in periodontitis-affected human gingival tissue. *Arch Oral Biol* 41:253-62.
- 179.-Ryan ME, Ramamurty S, Golub LM. (1996) Matrix metalloproteinases and their inhibition in periodontal treatment. *Curr Opin Periodontol* 3:85-96.
- 180.-García BE. (1998) La peroxidación lipídica en la etiopatogenia de la enfermedad periodontal inflamatoria. *Rev Cubana Estomatol* 35(1):25-9.
- 181.-Shapira L. (1991) Superoxide formation and chemiluminescence of peripheral polymorphonuclear leukocytes in rapidly progressive periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 18:44-8.
- 182.-Tonetti M, Monbelli A. (1999) Early onset periodontitis. *Ann Periodontol* 4(1):39-53.
- 183.- Firatli E, Unal T, Onan U. (1994) Antioxidant activities of some chemotherapeutics. A possible mechanism in reducing gingival inflammation. *J Clin Periodontol* 21:680
- 184.-González ME, Toledo B, Nazco C. (2002) Enfermedad periodontal y factores locales y sistémicos asociados. *Rev Cubana Estomatol*. 2002;39:193-202.
- 185.-Martínez G, Delgado R, Pérez GD, Garrido G, Núñez-Sellés AJ, León OS.(2000) Evaluation of the in vitro antioxidant activity of *Mangifera indica* L.extract (Vimang). *Phytother. Res* 14:424-7.
- 186.-Sánchez GM, Giuliani A, León OS, Pérez-Davison GD, Núñez-Sellés AJ. (2001) Effect of *Mangifera indica* L. extract (Vimang) on protein and hepatic microsomes peroxidation. *Phytother Res*. 15:581-5.
- 187.-Sánchez GM, Re L, Giuliani A, Núñez-Sellés AJ, Pérez-Davison G, León OS.(2000) Protective effect of *Mangifera indica* L. extract, mangiferin and selected



antioxidants against TPA-induced biomolecules oxidation and peritoneal macrophage activation in mice. *Pharmacol Res.*42:565-73.

188.-Guha S, Ghosal S, Chattopadhyay U. (1996) Antitumor, immunomodulatory and anti-HIV effect of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone. *Chemother Basel.* 42:443-9.

189.-Garrido G, González D, Delporte C, Backhouse N, Quintero G, Núñez-Sellés AJ, et al. (2001) Analgesic and anti-inflammatory effects of *Mangifera indica* L. extract (Vimang). *Phytother Res.* 15:18-21.

190.-Bairy I, Reeja S, Siddharth I, Rao PS, Bhat M, Shivananda PG. (2002) Evaluation of antibacterial activity of *Mangifera indica* on anaerobic dental microflora based on in vivo studies. *Indian J Pathol Microbiol.* 45:307-10.

191.-Novak MJ, Donley TG. (2002) Using host response modifiers in the treatment of periodontal disease. *Pract Proced Aesthet Dent.* 14:suppl 3-10.

192.-Gemmell E, Yamazaki K, Seymour GJ. (2002) Destructive periodontitis lesions are determined by the nature of the lymphocytic response. *Crit Rev Oral Biol Med.* 13:17-34.

193.-Okuda K, Kato T, Ishihara K. (2004) Involvement of periodontopathic biofilm in vascular diseases. *Oral Dis.*10:5-12.

194.-Garlet GP, Martins W Jr, Ferreira BR, Milanezi CM, Silva JS.(2003) Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. *J Periodontal Res.* 38:210-7.

195.-Novak MJ, Johns LP, Miller RC, Bradshaw MH. (2002) Adjunctive benefits of subantimicrobial dose doxycycline in the management of severe, generalized, chronic periodontitis. *J Periodontol.* 73:762-9.

196.-Lindberg P, Kinnby B, Lecander I, Lang NP, Matsson L. (2001) Increasing expression of tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 2 in dog gingival tissues with progressive inflammation. *Arch Oral Biol.*46:23-31.



- 197.-Grayson R, Douglas CW, Heath J, Rawlinson A, Evans GS. (2003) Activation of human matrix metalloproteinase 2 by gingival crevicular fluid and *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Periodontol.* 30:542-50.
- 198.-Kinane DF, Darby IB, Said S, Luoto H, Sorsa T, Tikanoja S, et al. (2003) Changes in gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8 levels during periodontal treatment and maintenance. *J Periodontal Res.*38:400-4.
- 199.-Liu RK, Cao CF, Meng HX, Gao Y. (2001) Polymorphonuclear neutrophils and their mediators in gingival tissues from generalized aggressive periodontitis. *J Periodontol.* 72:1545-53.
- 200.-Shibutani T, Imai K, Kanazawa A, Iwayama U. (1998) Use of hyaluronic acid binding protein for detection of hyaluronan in ligature-induced periodontitis tissue. *J Periodont Res.* 33:265-73.
- 201.-Marklund S, Marklund G. (1980) Involvement of the superoxide anion radical in autoxidation of pirogallol as a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem.* 47:469-74.
- 202.-Sobaniec H, Sobaniec-üotowska ME.(2000) Morphological examinations of hard tissues of paradontium and evaluation of selected processes of lipid peroxidation in blood serum of rats in the course of experimental periodontitis. *Med Sci Monit.* 6: 875-81.
- 203.-Slots J, Jorgensen M G. (2000) Effective, safe, practical and affordable periodontal therapy: where are we going, and are we there yet? *Periodontol* 12(4):32
- 204.- Weyna E, Dabrowski W, Braun J, Strezelecka G, Giedrys-Galant S. (1981) Effect of Oleflavit on certain immunological indices of inflammatory periodontal diseases. *Stomatol DDR.* Sep;31(9):678-83



- 205.- Michel JF, Yardin M, Bothemine F, Dumaugouer X. Action of a capillary protective agent on the vessels of the marginal periodontium].Actual Odontostomatol (Paris). 1978;(123):423-42.
- 206.- Wanscher B. Contact dermatitis from propolis.Br, J Dermatol. 1976 Apr;94(4):451-5.
- 207.- Banach J, Weyna E. (1976) Therapeutic value of Oleflavit in the treatment of periodontal diseases].Czas Stomatol. Apr;29(4):363-7.
- 208.- Cahana J. (1976) Flavanoids in the management of periodontal diseases. Rev Stomatol Chir Maxillofac. Mar;77(2):517-9.
- 209.- Cadenat H. (1975) Resivit in stomatology.Rev Odontostomatol Midi Fr. (1):65-74.
- 210.- Nowakowska A, Olko S, Poniewska A.(1974) Oleflavit in the treatment of periodontal abscesses. Czas Stomatol. Oct;27(10):1139-41
- 211.- Bar U, Negro GC.(1966) The use of bioriboflavinoids in the treatment of gingivitis and marginal periodontitis. Minerva Stomatol. Aug;15(8):550-4..
- 212.- Tsao TF, Newman MG, Kwok YY, Horikoshi AK (1982 Effect of Chinese and western antimicrobial agents on selected oral bacteria. J Dent Res. Sep;61(9):1103-6.
- 213.- Parisis DM, Pritchard ET. (1983) Activation of rutin by human oral bacterial isolates to the carcinogen-mutagen quercetin. Arch Oral Biol. 28(7):583-90.
- 214.- Gineste M, de Crousaz P, Duffort JF, Guilhem A, Herbage D, Nordmann H. (1984) Influence of 3-methoxy 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavan (ME) on experimental periodontitis in the golden hamster. J Biol Buccale. Sep;12(3):259-65.



- 215.- Vishniak GN, Kharlamova KE, Gurosheva GT, Zavernaia AM, Golovnia IA. Camben and galascorbin in the combined treatment of ulcerative-necrotic lesions of the oral mucosa]. *Stomatologija (Mosk)*. 1993 Jul-Sep;72(3):24-6.
- 216.- Makimura M, Hirasawa M, Kobayashi K, Indo J, Sakanaka S, Taguchi T, Otake S. (1993) Inhibitory effect of tea catechins on collagenase activity. *J Periodontol*. Jul;64(7):630-6.
- 217.- Chung CP, Park JB, Bae KH. (1995) Pharmacological effects of methanolic extract from the root of *Scutellaria baicalensis* and its flavonoids on human gingival fibroblast. *Planta Med*. Apr;61(2):150-3.
- 218.- Krahwinkel T, Willershausen B.(2000) .The effect of sugar-free green tea chew candies on the degree of inflammation of the gingiva. *Eur J Med Res*. nov 30;5(11):463-7.
- 219.- Yamamoto H, Ogawa T. (2002) Antimicrobial activity of perilla seed polyphenols against oral pathogenic bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem*. Apr;66(4):921-4.
220. Kimbrough C, Chun M, dela Roca G, Lau BH.(2002) PYCNOGENOL chewing gum minimizes gingival bleeding and plaque formation. *Phytomedicine*. Jul;9(5):410-3.
- 221.- Hirasawa M, Takada K, Makimura M, Otake S.(2002) Improvement of periodontal status by green tea catechin using a local delivery system: a clinical pilot study. *J Periodontal Res*. 37(6):433-8.
- 222.- Mao TK, Van de Water J, Keen CL, Schmitz HH, Gershwin ME. (2002) Effect of cocoa flavanols and their related oligomers on the secretion of interleukin-5 in peripheral blood mononuclear cells. *J Med Food*. 5(1):17-22.



- 223.- Perugini P, Genta I, Conti B, Modena T, Pavanetto F. (2003) Periodontal delivery of ipriflavone: new chitosan/PLGA film delivery system for a lipophilic drug. *Int J Pharm.* 18;252(1-2):1-9.
- 224.- Song SE, Choi BK, Kim SN, Yoo YJ, Kim MM, Park SK, Roh SS, Kim CK. (2003) Inhibitory effect of procyanidin oligomer from elm cortex on the matrix metalloproteinases and proteases of periodontopathogens. *J Periodontal Res.* 38(3):282-9
- 225.- Sakanaka S, Okada Y. (2004) Inhibitory effects of green tea polyphenols on the production of a virulence factor of the periodontal-disease-causing anaerobic bacterium *Porphyromonas gingivalis*. *J Agric Food Chem.* 24;52(6):1688-92.
- 226.- Li CZ, Cao ZG, Yang R, Shang ZH, Jin LJ, Cobert EF. (2004) Effects of baicalin on the expression of pro-MMP-1 and MMP-3 in human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 39(3):197-200.
- 227.- Gunjima M, Tofani I, Kojima Y, Maki K, Kimura M. (2004) Mechanical evaluation of effect of grape seed proanthocyanidins extract on debilitated mandibles in rats. *Dent Mater J.* 23(2):67-74.
- 228.- Yun JH, Pang EK, Kim CS, Yoo YJ, Cho KS, Chai JK, Kim CK, Choi SH. (2004) Inhibitory effects of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate on the expression of matrix metalloproteinase-9 and on the formation of osteoclasts. *J Periodontal Res.* 39(5):300-7.
- 229.- Smith PC, Santibañez JF, Morales JP, Martinez J. (2004) Epidermal growth factor stimulates urokinase-type plasminogen activator expression in human gingival fibroblasts. Possible modulation by genistein and curcumin. *J Periodontal Res.* 39(6):380-7.



- 230.- Hung SL, Cheng YY, Peng JL, Chang LY, Liu TY, Chen YT.(2005) Inhibitory effects of areca nut extracts on phagocytosis of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ATCC 33384 by neutrophils. *J Periodontol.* 76(3):373-9.
- 231.- Takahama U, Hirota S, Oniki T. (2006) Quercetin-dependent scavenging of reactive nitrogen species derived from nitric oxide and nitrite in the human oral cavity: interaction of quercetin with salivary redox components. *Arch Oral Biol.* 51(8):629-39.
- 232.- Wang GF, Wu ZF, Wan L, Wang QT, Chen FM.(2006) Influence of baicalin on the expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand in cultured human periodontal ligament cells. *Pharmacology.* 77(2):71-7
- 233.- Gutiérrez-Venegas G, Kawasaki-Cárdenas P, Arroyo-Cruz SR, Maldonado-Frías S.(2006) Luteolin inhibits lipopolysaccharide actions on human gingival fibroblasts. *Eur J Pharmacol.* 10;541(1-2):95-105.
- 234.- Houde V, Grenier D, Chandad F. (2006) Protective effects of grape seed proanthocyanidins against oxidative stress induced by lipopolysaccharides of periodontopathogens. *J Periodontol.* 77(8):1371-9.
- 235.- Zhu G, Li C, Cao Z. (2007) Inhibitory effect of flavonoid baicalin on degranulation of human polymorphonuclear leukocytes induced by interleukin-8: potential role in periodontal diseases. *J Ethnopharmacol.* 19;109(2):325-30.
- 236.- Bodet C, Chandad F, Grenier D.(2007) Cranberry components inhibit interleukin-6, interleukin-8, and prostaglandin E production by lipopolysaccharide-activated gingival fibroblasts. *Eur J Oral Sci.* 115(1):64-70.
- 237- Bodet C, Chandad F, Grenier D.(2007) Inhibition of host extracellular matrix destructive enzyme production and activity by a high-molecular-weight cranberry fraction. *J Periodontal Res.* 2007 Apr;42(2):159-68.



- 238.- Yun JH, Kim CS, Cho KS, Chai JK, Kim CK, Choi SH.(2007) (-)- Epigallocatechin gallate induces apoptosis, via caspase activation, in osteoclasts differentiated from RAW 264.7 cells. *J Periodontal Res.*42(3):212-8.
- 239- Gutiérrez-Venegas G, Jiménez-Estrada M, Maldonado S. (2007) The effect of flavonoids on transduction mechanisms in lipopolysaccharide-treated human gingival fibroblasts. *Int Immunopharmacol.* 7(9):1199-210.
- 240- Tsui VW, Wong RW, Rabie AB. (2008) The inhibitory effects of naringin on the growth of periodontal pathogens in vitro. *Phytother Res.* 22(3):401-6.
- 241.- Tanaka K, Sasaki S, Murakami K, Okubo H, Takahashi Y, Miyake Y; Freshmen in Dietetic Courses Study II Group Relationship between soy and isoflavone intake and periodontal disease: the Freshmen in Dietetic Courses Study II. *BMC Public Health.* 2008 Jan 29;8:39.
- 242.- Cai X, Li C, Du G, Cao Z. (2008) Protective effects of baicalin on ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontal Res.* 2008 Feb;43(1):14-21.
- 243.- Inaba H, Tagashira M, Honma D, Kanda T, Kou Y, Ohtake Y, Amano A.(2008) Identification of hop polyphenolic components which inhibit prostaglandin E2 production by gingival epithelial cells stimulated with periodontal pathogen. *Biol Pharm Bull.* 31(3):527-30.
- 244.- Botelho MA, Rao VS, Montenegro D, Bandeira MA, Fonseca SG, Nogueira NA, Ribeiro RA, Brito GA.(2008) Effects of a herbal gel containing carvacrol and chalcones on alveolar bone resorption in rats on experimental periodontitis. *Phytother Res.* 22(4):442-9.
- 245.- Li M, Xu Z.(2008) Quercetin in a lotus leaves extract may be responsible for antibacterial activity. *Arch Pharm Res.* 31(5):640-4



246.- Bodet C, La VD, Epifano F, Grenier D. (2008) Naringenin has anti-inflammatory properties in macrophage and ex vivo human whole-blood models. *J Periodontal Res.* 43(4):400-7.

247.- Cai X, Li CZ, Cao ZG, Du GF, Liu LH.(2008) Protective effect of baicalin on experimental periodontitis in rats and its possible mechanisms. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 3(5):281-5.