



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DEL FLAVONOIDE APIGENINA SOBRE UNA LÍNEA
CELULAR H9C2 DERIVADA DE CARDIOMIOCITOS DE RATÓN
ESTIMULADOS CON LTA**

TESIS

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

PRESENTA

Zeltzin González Rosas



MÉXICO, D.F. 2014.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Marina Gavilanes Ruiz**

VOCAL: **Profesor: Atonatiu Edmundo Gómez Martínez**

SECRETARIO: **Profesor: Gloria Gutiérrez Venegas**

1er. SUPLENTE: **Profesor: María Eva González Trujano**

2° SUPLENTE: **Profesor: José Ignacio Páramo Ramírez**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA,
UNAM**

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Gloria Gutiérrez Venegas

SUSTENTANTE:

Zeltzin González Rosas

ÍNDICE

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	2
2.1 Enfermedad periodontal.....	3
2.1.1 Patogenicidad bacteriana.....	5
2.1.2 Factores de virulencia.....	5
2.1.3 Endotoxinas bacterianas.....	9
2.1.4 Receptores similares a Toll.....	12
2.1.5 Microorganismos periodontopatógenos.....	19
2.2 Endocarditis infecciosa.....	22
2.2.1 Patogenia.....	22
2.2.2 Diagnóstico y tratamiento.....	23
2.3 Relación de las enfermedades periodontales con otros padecimientos sistémicos.....	24
2.4 Flavonoides.....	27
2.4.1 Estructura y propiedades de los flavonoides.....	27
2.4.2 Apigenina.....	30
3. Objetivos.....	32
3.1 Objetivo general.....	32
3.2 Objetivos particulares.....	32
4. Hipótesis.....	32
5. Materiales y métodos.....	33
6. Resultados.....	39
6.1 Efecto de apigenina sobre las proteínas MAPK estimuladas con LTA en células H9c2.....	39
6.2 Efecto de apigenina sobre la activación NF κ B.....	42
6.3 Efecto de apigenina sobre la expresión de IL-1 β y COX-2.....	44
6.4 Efecto de apigenina sobre la activación de la proteína AKT.....	46
6.5 Efecto de inhibición de PLC, PI3K, PKA y NF κ B sobre la expresión de COX-2 inducida por LTA.....	47
6.6 Efecto de apigenina y el LTA sobre la viabilidad celular.....	48
7. Discusión.....	50
8. Conclusión.....	54
9. Bibliografía.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del periodonto.....	3
Figura 2. Gingivitis y periodontitis.....	4
Figura 3. Pared celular de una bacteria Gram positiva.....	10
Figura 4. Estructura de un TLR.....	13
Figura 5. Receptor tipo Toll en el reconocimiento de patógenos pulmonares.....	17
Figura 6. Vía de señalización de cPLA2/COX-2 inducida por LTA.....	18
Figura 7. Desarrollo de la endocarditis infecciosa.....	23
Figura 8. Estructura de un flavonoide.....	28
Figura 9. Clasificación de los flavonoides en base a su estructura.....	28
Figura 10. Estructura y propiedades básicas del flavonoide apigenina.....	31
Figura 11. Ensayo dosis-respuesta del efecto de apigenina sobre la acción de LTA en la activación de JNK en células H9c2.....	39
Figura 12. Ensayo dosis-respuesta del efecto de apigenina sobre la acción de LTA en la activación de p38 en células H9c2.....	40
Figura 13. Ensayo dosis-respuesta del efecto de apigenina sobre la acción de LTA en la activación de ERK1/2 en células H9c2.....	41
Figura 14. Ensayo dosis-respuesta del efecto de apigenina sobre NFκB en células H9c2 estimuladas con LTA.....	43
Figura 15. Ensayo dosis-respuesta del efecto de apigenina sobre la acción de LTA en la expresión de COX-2 en células H9c2.....	44
Figura 16. Ensayo dosis-respuesta del efecto de apigenina sobre la acción de LTA en la expresión de IL-1 β en células H9c2.....	45
Figura 17. Ensayo dosis-respuesta del efecto de apigenina sobre la acción de LTA en la activación de AKT en células H9c2.....	46
Figura 18. Efecto de U73122, Ly290042, H89 y curcumina sobre la acción de LTA en la expresión de COX-2.	47
Figura 19. Efecto de apigenina sobre la viabilidad celular.....	48
Figura 20. Efecto de apigenina y LTA sobre la viabilidad celular.....	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Relación entre factores de virulencia y sus funciones.....	6
Tabla 2. Relación entre enzimas bacterianas con sus funciones.....	7
Tabla 3. Diferencias entre las toxinas bacterianas.....	8
Tabla 4. Características del lípido de anclaje y unidades hidrofílicas de diferentes microorganismos Gram positivos.....	11
Tabla 5. TLR de mamíferos: Expresión y ligandos.....	15
Tabla 6. Microbiota habitual de la saliva humana.....	20
Tabla 7. Identificación bioquímica de diferentes especies de <i>Streptococcus</i>	21
Tabla 8. Efectos farmacológicos de algunos flavonoides.....	29

Abreviaturas

- AKT: Protein cinasa B
- ATCC: American Type Culture Collection
- ATP: Adenosín trifosfato
- CD: Célula dendrítica
- C.end: Célula endotelial
- CIM: Concentración mínima inhibitoria
- CD_i: CD inmadura
- CD_{pl}: CD plasmocitoide
- COX-2: Ciclooxygenasa 2
- CpG: Citosina unida por enlace fosfodiester a Guanina
- cPLA2: Fosfolipasa A citosólica
- DAG: Diacilglicerol
- DMEM: Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco
- DMSO: Dimetilsulfóxido
- Ed: Editorial
- E.E: Error estándar
- EI: Endocarditis infecciosa
- ERK: Cinasa regulada por señales extracelulares
- g: Gramo
- GADPH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
- Gram (+): Gram positiva
- Gram (-): Gram negativa
- h: Horas
- IFN- β : Interferon beta
- IgG: Inmunoglobulina G
- IL-1: Interleucina 1
- IL-1 β : Interleucina 1 beta
- IL-6: Interleucina 6
- iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible

- IP3: Inositol trifosfato
- IRAK: Receptor de IL1 asociado a cinasas
- IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry
- I κ B: I kappa B
- IKK: I kappa B Cinasa
- IRF: Factor de respuesta al hierro
- JNK: Cinasa c-Jun N-terminal
- kDa: Kilodaltones
- LB: Linfocito B
- Log: Logaritmo
- LPS: Lipopolisacárido
- LRR: Región rica de repetición en leucina
- LRR-CT: Región rica en leucina en C-terminal
- LTA: Ácido lipoteicoico
- M: Molar
- MAPK: Protein-cinasas activadas por mitógeno
- min: Minutos
- mM: Milimolar
- mL: Mililitro
- Mo: Monocito
- mRNA: Micro RNA
- MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
- MyD88: Factor de diferenciación mieloide 88
- N: Neutrófilo
- ND: No definido
- NF κ B: Factor nuclear de transcripción kappa B
- NK: Natural killer
- nm: Nanómetro
- NO: Óxido Nítrico
- pAKT: Fosfo-proteína cinasa B

- Pam₂Cys: Lipopéptidosdiacilados
- PAMP: Patrón molecular asociado a patógeno
- PBS: Buffer de fosfatos salino
- PC-PLC: Fosfatidil-colina-fosfolipasa C
- PC-PLD: Fosfatidil-colina-fosfolipasa D
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
- pERK1/2: Fosfo-cinasa regulada por señales extracelulares
- PG: Peptidoglicano
- PGE₂: Prostagladina E₂
- PIP2: Fosfatidil inositol bifosfato
- PI3K: Fosfatidilinositol-3 cinasa.
- pJNK: Fosfo-cinasa c-Jun N-terminal
- PKA: Proteincinasa A
- PKC: Proteincinasa C
- PM: Peso molecular
- PMN: Polimorfonucleares
- PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
- PLC: Fosfolipasa C
- pp38: Fosfo-p38
- p38: Proteína p38
- p42/44: Subunidad 42 y 44
- PRR: Receptores reconocedores de patrones.
- PVDF: Fluoruro de polivinilideno
- Rac1: Sustrato de la toxina botulina C3 asociada a Ras
- Ras: Proteína proto-oncogénica p21
- Redox: Óxido-reducción
- RNA: Ácido ribonucleico
- Rpm: Rotaciones por minuto
- RT: Transcriptasa reversa
- RT-PCR: Transcriptasa reversa- Reacción en cadena de la polimerasa

- SBF: Suero Bovino Fetal
- SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
- sIgA: Inmunoglobulina A secretora
- ssRNA: RNA de cadena sencilla
- TAB: Proteína de unión a TAK
- TAK1: Cinasa 1 activada por el TGF β
- TBST: Buffer Tris Salino con Tween
- TGF β : Factor de crecimiento transformante beta
- TIR: Receptor Toll-interleucina 1
- TIRAP: Proteína adaptadora con un dominio TIR
- TLR: Receptores similares a Toll
- TNF: Factor de necrosis tumoral
- TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa
- TRAF6: Factor 6 del receptor de TNF
- TRAM: Molécula adaptadora relacionada a TRIF
- TRIF: Adaptador con dominio TIR que induce IFN- β
- UVB: Radiación ultravioleta B
- V: Volts
- VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular
- μ g: Microgramo
- μ M: Micromolar
- μ L: Microlitro
- $^{\circ}$ C: Grado centígrado

1. RESUMEN

La placa dentobacteriana está conformada por más de 500 diferentes especies de bacterias, que bajo determinados procedimientos dentales puede ocasionar la diseminación de bacterias al torrente sanguíneo provocando enfermedades cardiacas como la endocarditis infecciosa. *Streptococcus sanguinis* al ser una bacteria Gram positiva contiene ácido lipoteicoico (LTA), que al ser reconocido por el sistema inmune induce mecanismos que conllevan a la expresión de células proinflamatorias. Los flavonoides son compuestos fenólicos presentes en diversos vegetales, a los que se les han conferido propiedades antiinflamatorias. Con el fin de determinar el efecto antiinflamatorio de apigenina en la línea celular H9c2 derivada de cardiomiocitos de ratón, las células fueron estimuladas con LTA obtenido de *S. sanguinis*. Se evaluó su efecto mediante ensayos de Western Blot que detectan la forma fosforilada de AKT, ERK, JNK y p38. Las células H9c2, se trataron con diferentes dosis de apigenina (2, 5, 10 y 15 μ M) durante 30 min. Posteriormente se estimularon con LTA (15 μ g/mL), durante 15 min. Mediante RT-PCR se evaluó la expresión de COX-2 e IL-1 β . Posteriormente se evaluó la expresión de COX-2 al inhibir PLC, PI3K, PKA y NF κ B; y se analizó al complejo NF κ B e I κ B mediante un ensayo de inmunocitoquímica. Finalmente se realizaron ensayos de MTT con el propósito de evaluar el efecto de apigenina y LTA sobre la viabilidad celular. Los resultados mostraron un aumento en la fosforilación de AKT, ERK, JNK y p38 tras la estimulación con LTA, efecto que se contrarrestó con la acción de la apigenina. La expresión de COX-2 e IL-1 β inducidas por LTA, disminuyeron al aumentar la dosis de apigenina. Al evaluar la expresión COX-2 se encontró que PLC, PI3K, PKA y NF κ B están involucradas en su expresión. El ensayo de inmunocitoquímica mostró que al aplicar LTA, I κ B se degradó, permitiendo que NF κ B ingrese al núcleo, igualmente la apigenina revirtió dicho efecto. En los ensayos de MTT, apigenina no alteró la viabilidad celular, sin embargo, contrarresta el efecto de la muerte celular causada por LTA. Los resultados sugieren que la apigenina podría estar actuando vía PI3K, observándose una disminución en la fosforilación de AKT, tras su inducción con LTA. Por consecuencia disminuye la fosforilación de las MAPK y la activación de NF κ B, seguidas de una inhibición de la activación de COX-2 e IL-1 β . Concluimos que el flavonoide apigenina mostró propiedades antiinflamatorias en una línea celular H9c2 derivada de cardiomiocitos de ratón.

2. INTRODUCCIÓN

Entre las enfermedades dentales de mayor prevalencia en el mundo se encuentran la caries y la enfermedad periodontal. La etiología de ambas enfermedades ha sido ampliamente descrita y se ha demostrado que están involucrados microorganismos específicos presentes en la placa dentobacteriana, como *Porphyromonas gingivalis* y *Streptococcus sanguinis*. En la caries dental se produce la desmineralización del esmalte promovida por ácidos que liberan determinadas bacterias presentes en la placa dentobacteriana supragingival entre los que se encuentran los estreptococos y lactobacilos. Por otra parte, la enfermedad periodontal afecta los componentes del periodonto (encía, ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar), lo que conlleva a la pérdida de las piezas dentales. Este padecimiento está asociado a microorganismos entre los que se encuentran *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Streptococcus sanguinis*, entre otros. Este último se ha demostrado que es el primer microorganismo que se instala en superficies dentarias limpias (1).

Tanto la caries como la enfermedad periodontal son ocasionadas por microorganismos que se desarrollan en la placa dental (que cuando colonizan las superficies dentales hasta el borde gingival se denomina placa supragingival y cuando coloniza por debajo del borde gingival se denomina placa subgingival). Sin embargo, estos microorganismos presentes en la placa dentobacteriana no solo pueden ocasionar infecciones a nivel bucal, sino que también pueden causar diferentes patologías sistémicas. Se ha establecido con certeza que los microorganismos presentes en la placa dentobacteriana pueden ocasionar trombosis coronaria, infarto y endocarditis; así como neumonía, afecciones pulmonares, entre otras (2).

2.1 Enfermedad periodontal

El periodonto es el conjunto de tejidos que se encuentran alrededor del diente, el cual tiene la función de brindarle soporte a los órganos dentarios, así como protección. Estos tejidos son cuatro, los cuales se dividen en dos tejidos duros, o mineralizados, el cemento radicular, y el hueso alveolar, y otros dos tejidos blandos, los cuales van a ser las fibras del ligamento periodontal y el tejido epitelial (Figura 1).

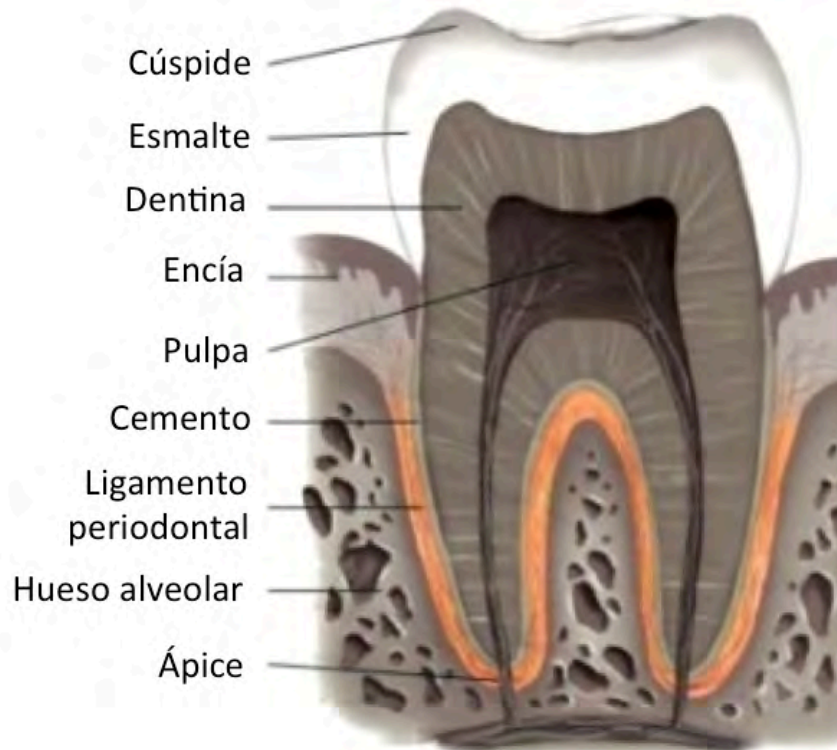


Figura 1. Estructura del Periodonto.

En el esquema se muestra la estructura del periodonto, formado por encía, hueso alveolar, ligamento periodontal y cemento. (<http://www.adam.com>)

Entre los diferentes padecimientos periodontales podemos encontrar 1) Gingivitis, que va a ser una inflamación gingival causada frecuentemente por la acumulación de bacterias o placas bacterianas. Este padecimiento es una de las enfermedades más comunes en la población mundial que se presenta con enrojecimiento de la encía y con sangrado frecuente de la misma; 2) La periodontitis, es una enfermedad que va a comprometer la sujeción de los órganos dentarios, ya que en este padecimiento va a verse una migración del epitelio de unión (47) (Figura 2).

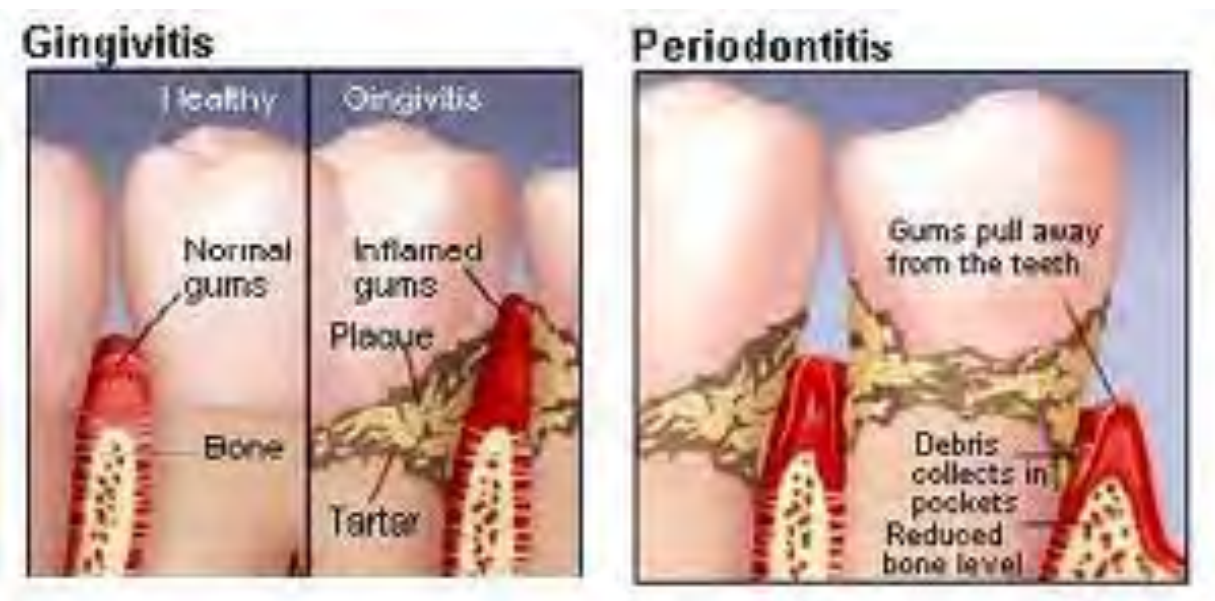


Figura 2. Gingivitis y periodontitis

Esquema que muestra del lado derecho la diferencia entre un tejido sano y uno con gingivitis. Del lado izquierdo se muestra la afección de la periodontitis.

(<http://vijaydentalclinic.tripod.com/id18.html>)

2.1.1 Patogenicidad Bacteriana

Las interacciones bacteria-hospedero son completamente dinámicas, ya que cada uno de ellos modifica sus actividades en función del otro. Por lo tanto, el resultado de esta interacción dependerá de las características del agente y de la capacidad del hospedero de defenderse frente a él. En esta interacción el agente puede ser un patógeno primario, es decir, que puede causar enfermedad en individuos inmunocompetentes que no muestran ningún factor predisponente a la infección, o bien ser un patógeno oportunista que necesita de hospederos cuyos factores defensivos estén alterados (47). Estos patógenos oportunistas muchas veces pertenecen a nuestra microbiota y son capaces de producir enfermedad si el hospedero se lo permite, al abandonar su hábitat natural e instalarse en un sitio diferente (4).

El resultado de las relaciones bacteria-hospedero depende de tres factores principales:

- 1) *El número de organismos presentes en el hospedero*
- 2) *La virulencia del organismo*
- 3) *Las defensas del hospedero frente al organismo*

2.1.2 Factores de virulencia

El grado de patogenicidad se llama virulencia. Los factores de virulencia bacterianos hacen menos o más virulenta a una bacteria, ya que ayudan a la bacteria a invadir al huésped, causar enfermedad y evadir las defensas del huésped (3). Dichos factores se pueden clasificar en aquellos que dañan al hospedero: exotoxinas, enzimas hidrolíticas, endotoxinas y productos bacterianos que desencadenan una respuesta autoinmune. Además las bacterias poseen factores de virulencia que promueven la colonización y proliferación de ellas en nuestro organismo (48) (Tabla 1).

TABLA 1. RELACION ENTRE FACTORES DE VIRULENCIA Y SUS FUNCIONES	
FACTORES DE VIRULENCIA	FUNCIÓN
Pili	Adherencia a superficies mucosas.
Adhesinas no fimbriales	Unión firme a células del hospedero.
Moléculas que inducen el reordenamiento del citoesqueleto de la célula hospedera	Fagocitosis forzada de la bacteria por células que normalmente no son fagocíticas; movimiento de la bacteria dentro del hospedero.
Motilidad y quimiotaxis	Accesibilidad a las superficies mucosas.
Cápsulas	Evitan la ingesta de fagocitos; reducen la activación del complemento.
slgA proteasas	Evasión del atrapamiento de la bacteria en la mucosa.

Adherencia

La adherencia es la capacidad del microorganismo para fijarse y colonizar el o los tejidos del hospedero. La colonización corresponde a la primera etapa de una infección. En esta etapa la bacteria se establece en un sitio de entrada, que puede incluir el tracto digestivo, respiratorio, urogenital, piel o conjuntiva. Para que una bacteria logre adherirse o fijarse a la superficie de células eucariotas, debe emplear propiedades quimiotácticas y estructuras de adherencia llamadas adhesinas, que participan en la fijación a receptores específicos por lo que se requiere de la interacción receptor-ligando (49). Los receptores del hospedero son normalmente carbohidratos o residuos peptídicos a los cuales se fija la bacteria mediante sus adhesinas. Las adhesinas bacterianas corresponden normalmente a componentes de la superficie celular (cápsulas, pared celular, fimbrias, etc.). Ambos, adhesina y receptor interaccionan de una forma específica, similar a lo que ocurre en una reacción enzima sustrato específico o antígeno/ anticuerpo (47).

Invasividad

Una bacteria es capaz de invadir al hospedero si ha completado con éxito la adherencia y multiplicación inicial, ha superado o traspasado los mecanismos de defensa del hospedero, y ha desplegado la capacidad de producir sustancias extracelulares que faciliten la invasión (47,48). Existen enzimas que actúan localmente para dañar las células del hospedero y tienen el efecto inmediato de facilitar el crecimiento y diseminación del patógeno, además pueden actuar en sitios vecinos al área de crecimiento bacteriano y no necesariamente destruyen las células (Tabla 2)

TABLA 2. RELACIÓN DE ENZIMAS BACTERIANAS CON SUS FUNCIONES		
ENZIMA	AGENTE PRODUCTOR	FUNCIÓN
Hialuronidasas	<i>Streptococcus</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Clostridium</i>	Atacan el cemento intersticial del tejido conectivo depolimerizando el ácido hialurónico
Colagenasas	<i>Clostridium hystoliticum</i> <i>Clostridium perfringens</i>	Rompen el colágeno del tejido muscular, lo cual facilita la gangrena gaseosa.
Neuraminidasas	<i>Vibrio cholerae</i> <i>Shigella dysenteria</i>	Degradan el ácido neuramínico, un cemento intercelular del tejido epitelial de la mucosa intestinal.
Estreptoquinasa y Estafiloquinasa	<i>Streptococcus</i> <i>Staphylococcus</i>	Convierten el plasminógeno inactivo a plasmina, la cual digiere la fibrina, previniendo la coagulación de la sangre. La ausencia de fibrina en el sitio de la lesión, permite que el patógeno difunda rápidamente desde el sitio de la infección.

Toxigenicidad

Las toxinas son proteínas solubles secretadas por la bacteria durante su crecimiento exponencial, son de alta actividad biológica sobre sitios alejados del punto original de invasión y crecimiento del patógeno (42). La capacidad de un microorganismo para producir éstas y la potencia de ellas son factores muy importantes en la producción de una enfermedad. Las toxinas bacterianas pueden ser clasificadas en dos grupos:

- 1) Exotoxinas: Toxinas excretadas hacia el medio externo.
- 2) Endotoxinas: Toxinas que forman parte de la estructura bacteriana.

(Tabla 3).

TABLA 3. DIFERENCIAS ENTRE LAS TOXINAS BACTERIANAS	
EXOTOXINAS	ENDOTOXINAS
Secretadas por bacterias Gram (+) y Gram (-)	Forma parte de la estructura Gram (-)
Polipéptidos (PM = 50-10000 kDa)	Lipolisacárido (LPS) (PM= 10kDa)
Proteínas difusibles	Parte de la membrana externa
Relativamente inestables a 60°C	Relativamente estables a 60°C
Generalmente antigénica Estimula la producción de antitoxinas	Estimula la formación de anticuerpos no protectores
Se puede transformar en toxoide	No se transforma en toxoide
Poder tóxico elevado (1 µg)	Toxicidad relativamente baja (> 100 µg)
Alta especificidad	Baja especificidad
Normalmente con actividad enzimática	Sin actividad enzimática
No induce fiebre	Induce fiebre

2.1.3 Endotoxinas bacterianas

Las endotoxinas forman parte de la porción externa de la pared celular de las bacterias, estas son liberadas cuando las bacterias mueren y su pared celular sufre lisis, por lo que liberan la endotoxina, también pueden liberarse durante la multiplicación bacteriana (4).

Ácido lipoteicoico

El peptidoglucano (PG) y el ácido lipoteicoico (LTA) son dos de los componentes de las bacterias Gram positivas que tienen actividades relacionadas con el desarrollo de la sepsis (7). En modelos experimentales *in vivo* e *in vitro*, han mostrado que el LTA estimula respuestas inflamatorias y que de igual forma estos componentes se encuentran asociados a infecciones específicas (5).

El ácido lipoteicoico es un componente único de la pared celular de las bacterias Gram positivas (6). La estructura del LTA se describe como un esqueleto anfifílico, con unidades repetitivas de glicerolfosfato variando entre 16 a 40 unidades, dicha cadena se encuentra glicosilada y contiene dos grupos acilo, el cual está anclado a la membrana citoplasmática mediante interacciones hidrofóbicas (7,8) (Figura 3). La estructura del lípido de anclaje y las unidades hidrofílicas varían entre las bacterias Gram positivas y de manera específica por el género. (Tabla 4).

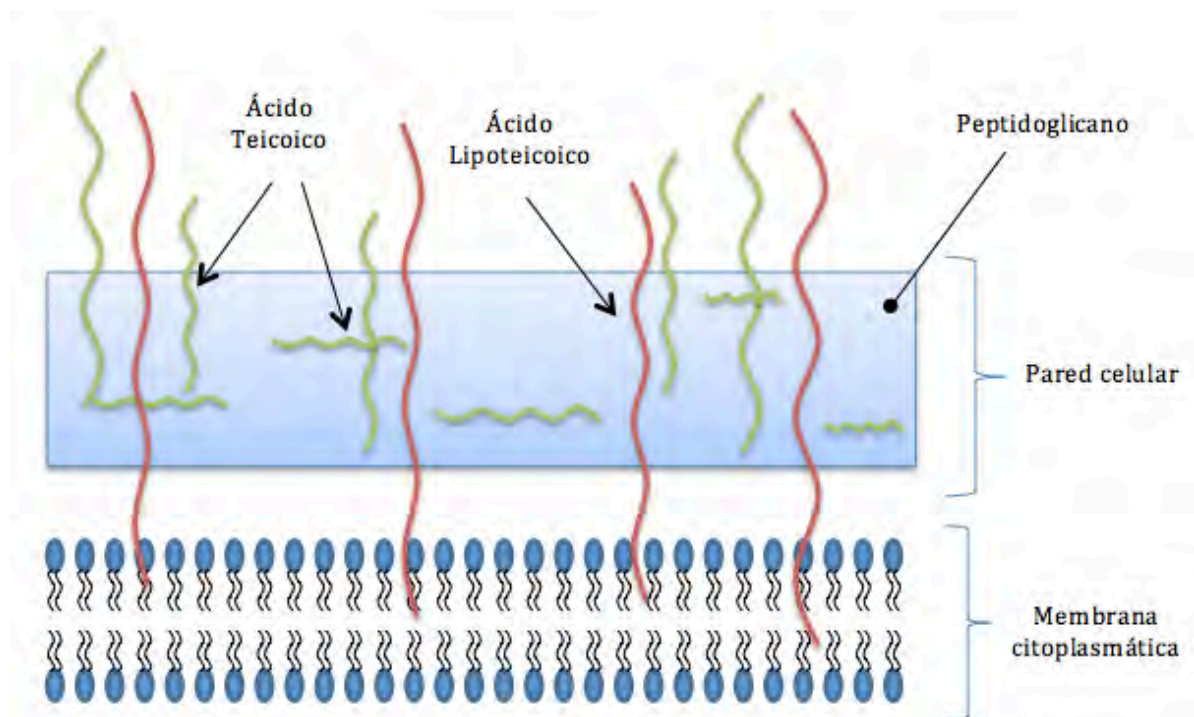


Figura 3. Pared celular de una bacteria Gram positiva

Representación del ácido lipoteicoico. Se muestran dos clases de ácido teicoico unido covalentemente al peptidoglicano de la pared celular. El ácido lipoteicoico atraviesa el péptidoglicano y se ancla a la membrana citoplasmática por interacciones hidrofílicas (8).

TABLA 4. CARACTERÍSTICAS DEL LÍPIDO DE ANCLAJE Y UNIDADES HIDROFÍLICAS DE DIFERENTES MICROORGANISMOS GRAM POSITIVOS		
ORGANISMO	LÍPIDO DE ANCLAJE	UNIDADES HIDROFÍLICAS
<i>Micrococcus spp.</i>	Diacilglicerol	Manano
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Indefinido pero contiene ácidos grasos	Colina y ribitolfosfato
<i>Bifidobacterium spp.</i>	Galactosildiácilglicerol	Glucogalactano
<i>Mycobacterium spp.</i>	Fosfatidilinositol	Arabinomanano
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Indefinido pero contiene ácidos grasos	Arabinomanano
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	Fosfatidilinositol	Manano
<i>Streptococcus sanguinis</i>	Indefinido pero contiene ácidos grasos	Heteropolisacárido
<i>Actinomyces viscosus</i>	Indefinido pero contiene ácidos grasos	Heteropolisacárido

Desde 1993, el LTA se extrae con fenol seguido de una purificación por cromatografía de interacción hidrofóbica (7). La purificación del LTA permitió determinar cómo se activan las células del sistema inmune y estudiar el papel que tiene esta molécula en la síntesis de citocinas. En estudios *in vitro* se demostró que los monocitos expresan interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral (TNF- α) en respuesta al tratamiento con LTA (5).

En contraste, el LTA de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae* no inducen liberación de citocinas. En el mismo estudio se muestra también que la inducción de citocinas no es dependiente de factores del complemento. Por otra parte cuando el LTA es desacilado pierde la capacidad de estimular a monocitos, lo que demuestra que el componente lipídico es el que confiere al LTA la actividad biológica. De igual forma se ha demostrado que la capacidad del LTA para estimular respuestas inmunes depende de la especie (5,7).

Funciones

El LTA presenta una importante participación en la actividad inmunológica. Como posibles funciones del LTA se ha propuesto que regula la función de las autolisinas (enzimas que ocasionan pequeños orificios en la pared celular). La naturaleza anfifílica del LTA parece ser muy importante para esta actividad, ya que ésta se pierde por tratamiento con detergentes. Otra característica del LTA es su naturaleza polianiónica que le permite tener un papel clave en el mantenimiento del balance catión-divalente sobre la superficie celular, posiblemente, a través de la pared celular, mediante una interacción de intercambio iónico. Además de que participan como mediadores de interacciones célula-célula, célula-sustrato y la consecuente virulencia de la bacteria (7).

2.1.4 Receptores similares a Toll

Las células del sistema inmune innato reconocen patrones moleculares comunes y constantes de la superficie de los microorganismos denominados como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), a través de los receptores conocidos como receptores reconocedores de patrones (PRR). Hay distintos tipos de proteínas que presentan características de PRR capaces de reconocer los patrones moleculares asociados a patógenos, entre los cuales, hay que destacar los receptores similares a Toll (TLR).

Los TLR son receptores transmembranales de tipo 1, con tamaños moleculares entre 90- 115 kDa, que presentan homología con la proteína Toll de *Drosophila* y el receptor de IL-1. Estos receptores fueron descritos por primera vez en *Drosophila melanogaster*, como un grupo de moléculas necesarias durante el desarrollo embrionario; posteriormente se observó que algunos de ellos protegían a la mosca adulta de las infecciones por hongos mediante la estimulación de la secreción de péptidos anti-fúngicos (11). Poseen varias Regiones Ricas en Leucina, llamadas LRR y una característica Región Rica en Leucina en C-terminal, llamada LRR-CT; también poseen un dominio intracelular y un dominio del receptor Toll/IL-1, llamado dominio TIR, por su homología con el dominio citoplasmático del receptor de IL-1 (16) (Figura 4).

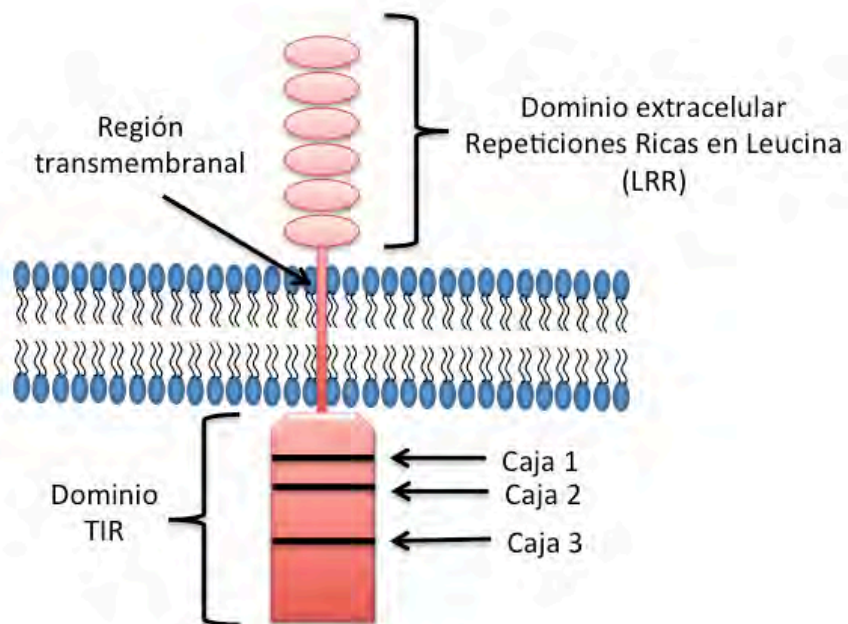


Figura 4. Estructura de un TLR

Esquema de los dominios característicos de un TLR. En la región extracelular, LRR: Regiones Ricas en Leucina; TM: Región transmembranal; En la región intracelular, Dominio TIR (Dominio citoplasmático del receptor IL-1/Toll) (17).

Las LRR se encuentran en tándem y consisten en 20-40 aminoácidos de largo, los que contienen una secuencia consenso de 10 aminoácidos, XLXXLXLXXN, característica de las LRR en todos los TLR. En estas secuencias consenso, inserciones o irregularidades que en ellas se presenten son importantes para la unión de cada TLR con su ligando. Las LRRs en su conjunto forman una estructura tipo “herradura” para el dominio extracelular del receptor (18). También contienen una secuencia consenso, la LRR-CT, importante para mantener el dominio extracelular cerca de la membrana plasmática. El dominio TIR posee tres regiones funcionales de importancia: caja 1, caja 2 y caja 3, que son conservadas en los TLR de mamíferos y importantes en la interacción con proteínas de señalización (19).

Los TLR son expresados en diversas células como: neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, células epiteliales, mucosas, células B, células T, plaquetas, entre otras (19). En la actualidad se han clonado 11 diferentes tipos de TLR´s en humanos (TLR1-TLR11), cada uno de ellos se une a una familia distinta de moléculas microbianas (11,12). (Tabla 5).

TABLA 5. TLR DE MAMÍFEROS: EXPRESIÓN Y LIGANDOS			
RECEPTOR	EXPRESIÓN (mRNA)	LIGANDO	ORIGEN DEL LIGANDO
TLR1 (con TLR2)	Mo, N, LB, NK, CD _i , CD _{pl}	Lipopéptido triacilados (Pam ₃ Cys) Factores solubles	Bacterias y micobacterias <i>Neisseria meningitidis</i>
TLR2	PMN, Mo, CD, CD _i	Lipoproteínas y lipopéptidos Peptidoglicado (PG) Ácido lipoteicoico (LTA) Lipoarabidomanano Modulina soluble en fenol Glocoinositol fosfolípidos Glicolípidos Porinas Lipopolisacárido atípico Lipopolisacárido atípico Zymosan	Varios patógenos Bacterias Gram + Bacterias Gram + Mycobacteria <i>S. epidermidis</i> <i>T. cruzi</i> <i>T. maltophilum</i> <i>Neisseria</i> <i>Leptospira interrogans</i> <i>P. gingivalis</i> Hongos
TLR3	CD, CD _i	RNA viral de doble cadena Poli (I:C)	Virus sintético
TLR4	C.End, Mo, N, CD	Lipopolisacárido (LPS) Proteína de fusión Proteína de envoltura HSP60	Bacterias Gram – Virus sincitial respiratorio Virus de tumor mamario <i>Chlamydia pneumoniae</i>
TLR5	Mo, CD, CD _i	Flagelina	Bacterias
TLR6 (con TLR2)	Mo, CD _i , CD _{pl}	Lipopéptidos diacilados (Pam ₂ Cys) LTA Zymosan	Mycoplasma Bacterias Gram + Hongos
TLR7	CD _{pl}	Imidazoquinolina Ss RNA	Compuesto sintético Virus
TLR8	Mo, CD _i	Imidazoquinolina ssRNA	Compuesto sintético Virus
TLR9	Mo, CD _{pl}	DNA con motivos CpG	Bacterias y virus
TLR10	CD _i	ND	ND
TLR11	Epitelio renal*	ND	Bacterias uropatogénicas

Mo: monocito, N: neutrófilo, CD: célula dendrítica, CD_i: CD inmadura, CD_{pl}: CD plasmocitoide, C.end: célula endotelial, NK: Natural killer, LB: Linfocito B, PMN: Polimorfonucleares, ssRNA: RNA de cadena sencilla, ND: No definido. *Murino. En humanos se expresa una forma truncada de la proteína.

Mecanismo de activación

La unión de los ligandos al TLR induce la dimerización de sus dominios extracelulares (13). Seguido de la dimerización, sufren un cambio conformacional requerido para el reclutamiento de la cascada de señalización (12). Las proteínas adaptadoras que se han descrito en mamíferos son MyD88 (Factor de diferenciación mieloide 88), TIRAP (Proteína adaptadora con un dominio TIR), TRIF (Adaptador con dominio TIR que induce IFN- β) y TRAM (Molécula adaptadora relacionada a TRIF) (19).

El adaptador mejor caracterizado por su participación en la señalización de la mayoría de los TLR es MyD88, el cual recluta al receptor de IL-1 asociado a cinasas (IRAK), factor 6 del receptor de TNF (TRAF6) y la cinasa 1 activada por el TGF β (TAK1). A partir de aquí se activan las cuatro principales vías de señalización: la vía del factor nuclear de transcripción κ B (NF κ B) y tres vías de proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK) como ERK1/2, p38 y JNK. TLR3 y TLR4 poseen una vía de señalización independiente de MyD88 y dependiente del activador de interferón asociado al receptor Toll (TRIF) y la molécula asociada al receptor Toll (TRAM) (17) (Figura 5).

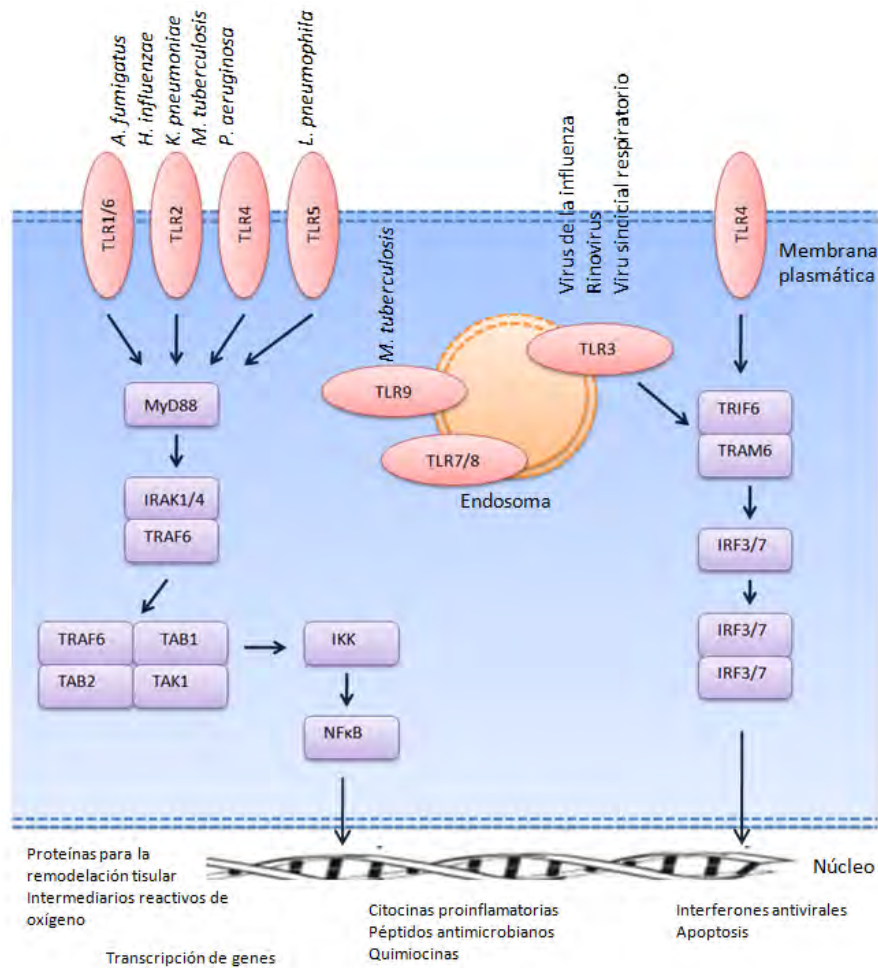


Figura 5. Receptor tipo Toll en el reconocimiento de patógenos pulmonares.

Los TLR reconocen una variedad de patrones moleculares conservados en los microorganismos. Enseguida, los receptores inician cascadas de señalización que culminan con la translocación del NFκB al núcleo para la activación de la transcripción de genes correspondientes a los programas inmunológicos disponibles para cada tipo celular (14).

TLR2

TLR2 es un miembro de la familia de los TLR con un gran número de diferentes ligandos identificados hasta ahora. El gen del TLR2 en humanos se localiza en el cromosoma 4q32. La activación de dicho receptor se da por presencia de alguna clase de PAMPs, como ácido lipoteicoico, lipopolisacárido, peptidoglucano, entre otros.

Para el caso de LTA, una vez que se une al receptor TLR2, se activa la fosfatidilcolina-fosfolipasa C (PC-PLC) y la fosfatidil-colina-fosfolipasa D (PC-PLD) para inducir la activación de PKC y simultáneamente ocurre la activación de cinasas de residuos de tirosina. Estos efectos resultan necesarios para la consecuente fosforilación de las MAPK p42/44 y p38. La cascada de fosforilaciones resulta en la estimulación de NFκB, la subsecuente expresión de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y la liberación de prostaglandina E₂ (PGE₂).

Se ha demostrado que el LTA se une como un homodímero de TLR2, activándose la vía de fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3K), dando como resultado la producción de PGE₂ e IL-6. (Figura 6). Igualmente, es capaz de formar heterodímeros con receptores como TLR1 o TLR6 para la detección de PAMP's (26).

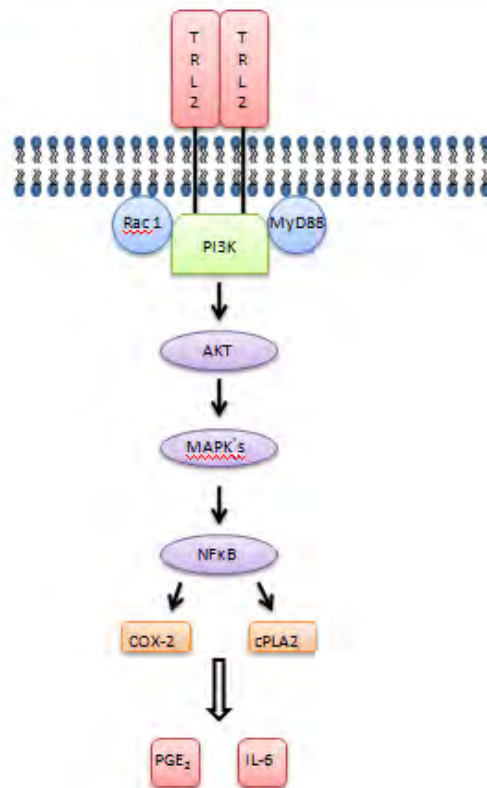


Figura 6. Vía de señalización de cPLA2/COX-2 inducida por LTA.

El LTA activa la vía TLR2/MyD88/PI3K/Rac1/Akt aumentando la fosforilación de ERK1/2, p38 MAPK, y JNK, iniciando la activación de NF-κB y la producción de PGE₂ e IL-6 dependiente de cPLA2/COX-2 en fluido broncoalveolar de ratón (24).

2.1.5 Microorganismos periodontopatógenos

Las bacterias que se encuentran en la cavidad oral pueden estar organizadas de dos maneras; por una parte, las que se encuentran en la saliva suspendidas en la fase líquida, adoptando una forma que se denomina planctónica (forma de crecimiento de las bacterias cuando flotan suspendidas en un medio líquido); o bien, las bacterias que se encuentran sobre una superficie dura (diente, reconstrucciones, prótesis e implantes) formando una película gelatinosa adherente: la placa dental (9).

Un milímetro cúbico de placa dental contiene cerca de 100 millones de bacterias (10) y puede servir como un reservorio para la persistencia de los posibles agentes patógenos. Los microorganismos que componen la placa dentobacteriana están conformados por más de 500 especies que se agrupan en 22 géneros. La placa coloniza la superficie de los dientes y el epitelio mucoso formando la placa supra y subgingival.

La cavidad bucal es estéril en el momento del nacimiento, pero entre las 6 y 10 horas se establece una flora microbiana compuesta principalmente por organismos aerobios. Los anaerobios aparecen en algunas bocas en los 10 primeros días (9). Con la edad, aumentan los anaerobios, pero los de tipo facultativo siguen predominando numéricamente. El cálculo microscópico de microorganismos presentes en la saliva oscila de entre 43 millones a 5 500 millones de microorganismos por mililitro, con un promedio de 750 millones (Tabla 6). En la tabla se resume la información obtenida de un censo representativo de la población bacteriana de la saliva.

TABLA 6. MICROBIOTA NATURAL DE LA SALIVA HUMANA		
GRUPO BACTERIANO	AISLADOS PREDOMINANTES DEL GRUPO	PORCENTAJE
Cocos facultativos Gram-positivos	Los estreptococos representan 41% de todos los aislados y se componen de <i>Streptococcus salivarius</i> , <i>Streptococcus mitis</i> y pequeñas cantidades de enterococos; el resto son estafilococos	46.2
Cocos anaerobios Gram-negativos	<i>Veillonella</i>	15.9
Cocos anaerobios Gram-positivos	<i>Peptostreptococcus</i> , <i>Peptococcus</i>	13
Bacterias facultativas Gram-positivas	<i>Difteroides</i> , <i>Actinomyces</i>	11.8
Bacterias anaerobias Gram-negativas	<i>Campylobacter sputorum</i> , <i>Porphyromonas</i> , <i>Fusobacterium</i>	4.8
Bacterias anaerobias Gram-positivas	Propionibacterias, <i>Actinomyces</i>	4.8
Bacterias facultativas Gram-negativas	No identificadas	2.3
Cocos facultativos Gram-negativos	No identificadas	1.2

Streptococci

Los Streptococci son cocos Gram positivos, que a diferencia de los Staphylococci son catalasa negativos. Constituyen la principal población en la cavidad oral con varias especies asociadas a diferentes nichos en la boca. *Streptococcus sanguinis* (anteriormente conocido como *Streptococcus sanguis*) y *Streptococcus mutans* son encontrados en la placa dentobacteriana, mientras que *S. salivarius* está presente en la lengua y *S. mitis* en la mucosa.

2.2 Endocarditis infecciosa

La endocarditis infecciosa (EI) es la infección endovascular (endocardio) de las estructuras cardíacas en contacto con el flujo sanguíneo, causada por bacterias u hongos (23, 37). La endocarditis puede afectar el músculo cardíaco, las válvulas o el revestimiento del corazón (38).

De acuerdo a la evolución clínica se divide en:

- Aguda: Sintomatología menor a 6 semanas, generalmente con un curso fulminante, estado tóxico sistémico. Generalmente sin lesión cardíaca subyacente.
- Subaguda: Sintomatología mayor a 6 semanas, evolución insidiosa, curso indolente, generalmente existe enfermedad cardíaca previa o antecedente de cirugía cardíaca.

2.2.1 Patogenia

Un paso clave en el desarrollo de la endocarditis infecciosa consiste en la adherencia bacteriana en válvulas dañadas (Figura 7). Se estimula la inmunidad humoral y celular. *Streptococcus parasanguinis* y *Streptococcus sanguinis* se asocian y contribuyen al desarrollo de lesiones en las válvulas cardíacas. Las especies de estreptococos producen glucanos que se adhieren a coágulos derivados de las plaquetas y promueven también la agregación plaquetaria (5). Los compuestos inmunitarios se depositan en la región subepitelial. El cuadro clínico es resultado de efectos destructivos locales de infección intracardiaca, embolia de fragmentos blandos o sépticos que produce infartos o infección, diseminación hematológica que produce bacteremia y/o respuesta de los anticuerpos al microorganismo (38).

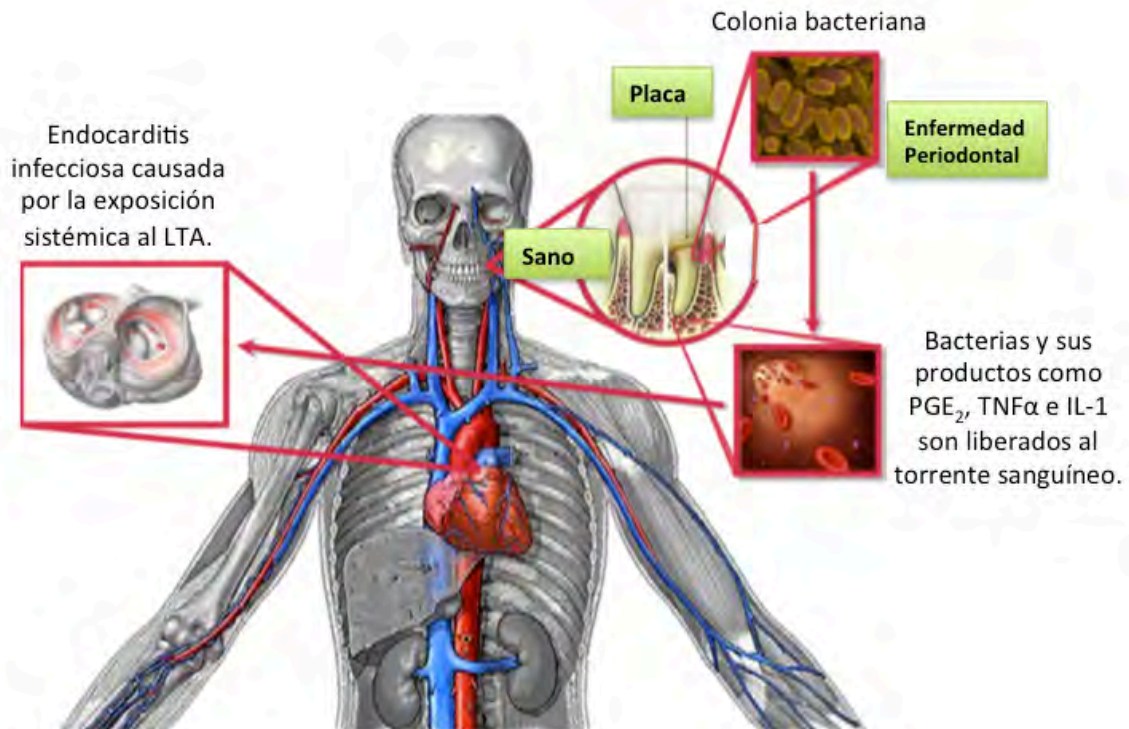


Figura 7. Desarrollo de la endocarditis infecciosa

Las bacterias bucales poseen unos mecanismos de adherencia muy específicos y como resultado colonizan y provocan enfermedades principalmente en la cavidad bucal. Cuando se realizan procedimientos dentales en los cuales exista hemorragia, estas bacterias y sus productos como PGE₂, TNF-α, IL-1β, etc, pueden ser liberados al torrente sanguíneo y provocar enfermedades sistémicas. También se sabe que estas bacterias son agentes causales de endocarditis infecciosa, enfermedades coronarias y/o arterosclerosis (5).

2.2.2 Diagnóstico y tratamiento

El cuadro clínico se caracteriza por fiebre mayor a 39.5°C remitente sin escalofrío, soplos cardiacos, esplenomegalia, petequias, lesiones de Janeway (lesiones hemorrágicas indoloras en palmas de manos y plantas de pies), manchas de Roth (lesiones hemorrágicas en retina) (37).

El grado de sospecha se incrementa en el momento en el que existen antecedentes de una cardiopatía congénita, consumo intravenoso de drogas, fiebre reumática o una intervención dental reciente (5).

Los estudios a solicitar generalmente son (37):

- Biometría hemática completa.
- Hemocultivo repetitivo y pruebas de sensibilidad.
- Examen general de orina.
- Factor reumatoide.
- Observación de fondo de ojo.
- Electrocardiograma (búsqueda de vegetaciones, abscesos del miocardio).
- Radiografía del tórax.

Tratamiento (37):

- Usar antibióticos bactericidas y evitar antibióticos bacteriostáticos.
- Administración de tratamiento intravenoso por 4 a 6 semanas.
- En el tratamiento empírico siempre deben utilizarse combinaciones sinergistas.
- Al aislar germen es necesario solicitar patrón de susceptibilidad y concentraciones mínimas inhibitorias (CIM).
- No se debe cambiar de esquema antimicrobiano por el solo hecho que la fiebre no ceda a las 48-72 h, ya que la fiebre puede tardar hasta 10 días en desaparecer.

De no tratarse correctamente, se llegan a presentar complicaciones como arritmias, bloqueo cardiaco, absceso renal, choque séptico, infarto agudo al miocardio y la muerte (38).

2.3 Relación de las enfermedades periodontales con otros padecimientos sistémicos

Los pacientes que padecen enfermedad periodontal pueden aumentar el riesgo de desarrollar enfermedades sistémicas como la diabetes mellitus, enfermedad pulmonar, enfermedad del corazón y derrame cerebral (45). También parece tener

una relación directa con otras enfermedades crónicas como la osteoporosis, la artritis y la enfermedad de Alzheimer (44).

La diabetes mellitus es el resultado de una degeneración del metabolismo de la glucosa debido a la disminución de la producción o de respuesta a la hormona insulina liberada por células especializadas dentro de los islotes de Langerhans en el páncreas. Puede conducir a la ceguera, neuropatía periférica, nefropatía, infecciones secundarias, las enfermedades del corazón y enfermedad periodontal. La diabetes incontrolada se piensa que es un factor de riesgo grave para periodontitis (45). De un punto de vista médico, la enfermedad periodontal podría influir en el curso de la diabetes. La evidencia sugiere que los padecimientos periodontales se asocian con mal control glucémico en prediabéticos y el tratamiento de la enfermedad periodontal mejora el control glucémico en pacientes diabéticos (45, 51).

Las enfermedades respiratorias (especialmente neumonía) es una causa común de mortalidad en los adultos mayores. La cavidad oral es proximal y contigua a la tráquea, es un potencial punto de entrada de patógenos respiratorios y los dientes pueden servir como un importante reservorio de estos patógenos (52). Estas colonias de biofilms se encuentran en las superficies, tales como prótesis o dientes. Una vez establecido en biofilms, los agentes patógenos pueden ser aspirados o derramados en la parte inferior de las vías respiratorias, aumentando el riesgo de infección (52,53).

Azarpazhooh y Leake (54) llevaron a cabo una revisión sistemática en la que encontraron que la mejora de la higiene bucal y la frecuencia de atención de profesionales en el cuidado de la salud oral redujo la progresión o aparición de enfermedades respiratorias entre los adultos de edad avanzada que se encontraban en alto riesgo de desarrollar enfermedades respiratorias y vivían en hogares de ancianos.

La higiene bucal y la frecuencia de profesionales de atención de la salud oral también pueden ser buenas para el corazón y la salud del cerebro. Los estudios epidemiológicos han encontrado una fuerte asociación entre la enfermedad periodontal y las enfermedades cardiovasculares o accidentes cerebro-vasculares, especialmente en jóvenes de sexo masculino (51, 54).

En un estudio radiográfico, con radiografía panorámica de pacientes de 60 a 75 años de edad, los investigadores encontraron una correlación entre la pérdida de hueso alveolar y un aumento del riesgo de experimentar enfermedades cardiovasculares (54).

La enfermedad periodontal, que induce la recesión gingival y las posteriores caries radiculares también podría conducir a un mayor riesgo de experimentar enfermedades cardíacas (55). Los investigadores en un estudio encontraron 1.5 veces el aumento de probabilidades de sufrir aterosclerosis y las enfermedades coronarias en los adultos mayores que habían sufrido tanto la periodontitis y la pérdida de dientes (52).

Uno de los peligros de la aterosclerosis es un mayor riesgo de sufrir un accidente cerebrovascular, las enfermedades periodontales podrían estar asociadas con este aumento del riesgo. Un estudio caso-control encontró que los hombres menores de 60 años que habían tenido periodontitis severa presentaban un aumento de 4,3 veces en el riesgo de sufrir un accidente cerebrovascular que los pacientes del mismo grupo de edad que habían presentado la enfermedad leve o no la habían padecido (55).

La artritis severa también puede disminuir la calidad de vida de los pacientes, y la pérdida de hueso alveolar se ha asociado con artritis (56). Bartold y colaboradores (57) plantaron la hipótesis de que existe una común des-regulación de las vías

proinflamatorias, tanto en la periodontitis como en la artritis, y sugieren firmemente que aquellos pacientes que tienen artritis tienen grandes probabilidades de padecer periodontitis.

La enfermedad periodontal se asocia significativamente con la pérdida de hueso alveolar y el auto-reporte de osteoporosis (58). Algunos estudios indican que la terapia de reemplazo hormonal para la prevención de la osteoporosis en las mujeres también reduce el riesgo de sufrir la pérdida de los dientes, (59) pero los estrógenos no han sido utilizado como un agente potencial de reducir la pérdida de dientes en las mujeres de edad avanzada.

2.4 Flavonoides

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular producidos en todas las plantas. Se les ha caracterizado como metabolitos secundarios, es decir, no tienen función reconocida o directa en los procesos de crecimiento o reproducción (27). Las funciones biológicas que estos metabolitos secundarios tienen en los organismos que los producen no han sido claramente establecidas. Sin embargo, existe evidencia de las propiedades protectoras de estos compuestos en los tejidos vegetales contra la irradiación UV-B, como antibacterianos, además de la coloración y sabor característico de las partes vegetales que los poseen (28). Flavo proviene del latín *flavus* que significa amarillo, aunque producen una amplia gama de coloraciones desde rojo hasta el azul (29).

2.4.1 Estructura y propiedades de los flavonoides

Los flavonoides están compuestos de dos anillos de fenilos (A y B), ligados mediante un anillo de pirano (C), lo cual nos deja un esqueleto de difenilpiranos: C6-C3-C6 (Figura 8), característico de los flavonoides (30).

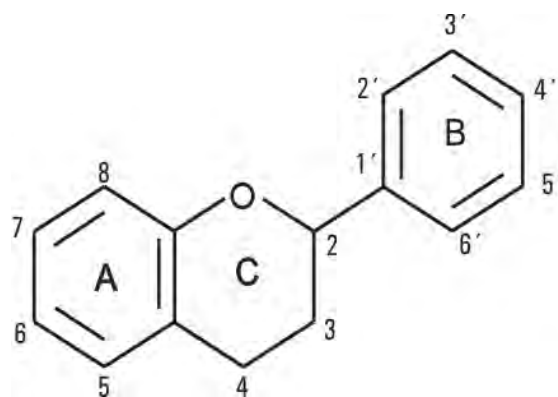


Figura 8. Estructura de un flavonoide

Se muestran la enumeración y especificación de cada heterociclo. A y B son anillos de fenilo, mientras C es un anillo de pirano (39).

Actualmente se han reportado alrededor de 10,000 variantes estructurales de flavonoides (31), los cuales se han clasificado en 6 grupos basándose en la variación del pirano (30), (Figura 9).

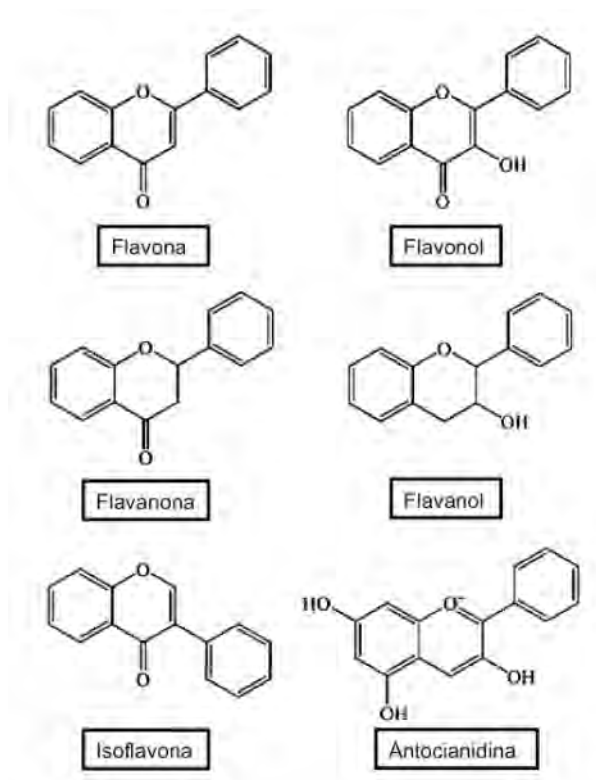


Figura 9. Clasificación de los flavonoides con base en su estructura

Se han clasificado en seis grupos, flavona, flavonol, flavanona, flavanol, isoflavona y antocianidina, de acuerdo a la variación del anillo de pirano (32).

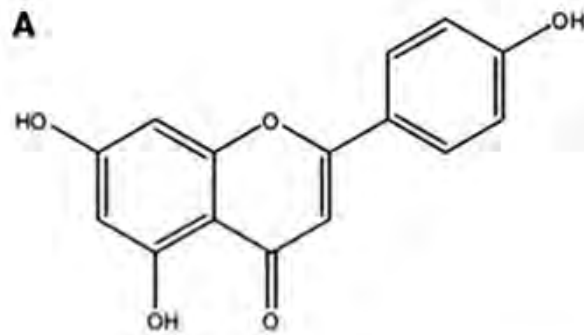
Esta variedad estructural está relacionada con las diversas actividades biológicas que poseen los flavonoides, entre las cuales destacan, tal vez por ser una de las más estudiadas, sus propiedades antiinflamatorias. Desde 1948 se describieron las propiedades antiinflamatorias de la hesperidina, la naringenina y la nobiletina, presentes en la fracción soluble en agua de casi todas las especies de *Citrus*; a partir de entonces son muchos los estudios *in vivo* e *in vitro* que describen las propiedades antiinflamatorias de los flavonoides y sus mecanismos (33). Además de sus propiedades antiinflamatorias se ha descrito una variedad de efectos producidos por estos metabolitos (Tabla 8).

TABLA 8. EFECTOS FARMACOLÓGICOS DE ALGUNOS FLAVONOIDES	
EFFECTOS	FLAVONOIDE
Antineoplásico	Quercetina, kaempferol, fisetina
Cardiotónicos	3-metil-quercetina
Disminuyen la fragilidad capilar	Rutina, quercetina, naringenina
Antitrombóticas	Tangeretina, hesperidina, rutina
Disminución del colesterol	Liquiritigenina
Protección y regeneración hepática	Silimarina, apigenina
Antiulcéricos	Kaempferol, quercetina
Antimicrobianos	Quercetina, baicalina
Antibacterial	Crisina, rutina
Antiviral	Crisoeriol
Antifúngica	Cloroflavonina, apigenina
Antiinflamatorios	Hesperidina, luteolina, quercetina, apigenina
Analgésico	Hesperidina
Anticancerígeno	Quercetina

Las acciones biológicas de los flavonoides se han atribuido a sus propiedades antioxidantes; debidas principalmente al potencial quelante que les confiere su estructura química, de tal manera que la actividad antioxidante puede deberse a sus capacidades reductoras *per se* o por influenciar el estado de oxidación/reducción (*redox*) intracelular. Este potencial antioxidante ha sido asociado con la reducción del riesgo de ciertas enfermedades crónicas, la prevención de algunas enfermedades cardiovasculares y de algunas clases de cáncer (33).

2.4.2 Apigenina

El compuesto 4',5,7-trihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-4H-1-benzopiran-4-ona, comúnmente nombrado apigenina (Figura 10), está presente en un amplio rango de plantas (35). En fuentes naturales, la apigenina se produce en una forma glicosídica, donde la estructura del núcleo tricíclico está ligado a un resto de azúcar a través de grupos hidroxilo (O-glucósidos) o directamente a un carbono (C-glucosídicos), esta modificación parece ser crítica para el almacenamiento y transporte de apigenina en plantas (36). Entre los principales alimentos que son fuente de apigenina encontramos, tomillo, cerezas, aceitunas, legumbres, apio, brocoli, siendo más abundante en el perejil y en flores secas de manzanilla (35).



B

Estructura molecular	$C_{15}H_{10}O_5$
Masa molecular	270.24g/mol
Apariencia	Cristalino, amarillo.
Punto de fusión	315° C
Solubilidad en agua	Insoluble
Solubilidad	DMSO, etanol

Figura 10. Estructura y propiedades básicas del flavonoide apigenina

(A) Estructura de la apigenina (5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-4H-1-benzopiran-4-ona).

(B) Principales propiedades de la apigenina (35).

El flavonoide apigenina ha mostrado propiedades antiinflamatorias, antiasmáticas, antidermatitis y antineurodegenerativas en diferentes tipos celulares. La apigenina inhibe mediadores proinflamatorios como NO, iNOs, PGE₂, COX-2 y TNF, a través de la supresión del factor nuclear κ B (NF κ B) (34).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Caracterizar el efecto de apigenina sobre las vías de señalización activadas por ácido lipoteicoico en cardiomiocitos de ratón.

3.2 Objetivos particulares

- Determinar el efecto de la apigenina sobre la activación de las MAPK estimuladas con LTA.
- Determinar el efecto de la apigenina sobre la activación de AKT estimulada con LTA.
- Evaluar el efecto de la apigenina sobre la expresión de IL- β y COX-2 estimuladas con LTA.
- Determinar el efecto de la apigenina sobre el complejo NF κ B-I κ B tras la aplicación de LTA.
- Analizar el efecto de la apigenina y LTA sobre la viabilidad celular.

4. HIPÓTESIS

Si la endocarditis es un padecimiento de naturaleza inflamatoria ocasionado por microorganismos bucodentales, entonces el tratamiento con apigenina, compuesto con actividad antiinflamatoria, disminuirá la acción inflamatoria del LTA obtenidos de microorganismos bucodentales.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Población en estudio: La línea celular H9c2 derivada de cardiomiocitos de ratón la cual se obtuvo de ATCC (CRL-1446).

Selección de Variables:

- Independiente: Tiempo y Dosis.
- Dependiente: Densidad óptica.

Tamaño de la Muestra: 1×10^6 células.

Método de recolección de datos: Tabulación y Matriz.

Criterios de Inclusión: Cultivo celular sub-confluyente, medio translúcido.

Criterios de Exclusión: Cultivo confluyente, medio ácido.

Criterios de Eliminación: Medio de cultivo turbio.

Método de Procesamiento de los datos: Programas de Cómputo Digi Doc-it (versión 1.1.27, UVP, Inc.), Labs Work (versión 4.0.0.8; Ultraviolet Products Inc., Upland, CA) Excel.

Material

- Agitador magnético (Thermolyne).
- Balanza GA200 (Ohaus).
- Balanza (Sartorius).
- Baño de agitación (Precision Scientific).
- Baño (Riossa)
- Biofotómetro (Eppendorf).
- Cajas de cultivo celular de 6 pozos (Costar).
- Cámara de electroforesis horizontal (Life Technologies).
- Cámara de electroforesis vertical (Hoeffer).
- Cámara de transferencia (Bio-Rad).
- Campana de flujo laminar (The Baker Company).
- Celdas UV-VIS (eppendorff).
- Centrifuga (Thermo scientific).
- Espectrofotómetro (Pharmacia Biotech).
- Gendarme (Costar).
- Gradillas (Nalgene).
- Incubadora (Sanyo).
- Microscopio de objetos invertidos C22 (Olympus).
- Micropipetas (Eppendorf).
- Lector de placas (BioTek ELx808).
- Orbit Shaker (Labline).
- Pipetas de 10 mL y 5 mL (Finnipipette).
- Potenciómetro (Science Med).
- Probetas graduadas.
- Propipeta (Pepet-aid).
- Sonicador (Ultrasonic Processor).
- Termociclador (Perkin Elmer 2400).
- Timer (EAI)

- Tubos clínicos.
- Tubos de ensayo.
- Tubos Eppendorf.
- Vasos de precipitado.
- Vortex (Scientific industries).

MÉTODOS

Cultivo celular: La línea celular H9c2 derivada de cardiomiocitos de ratón se obtuvo de ATCC (CRL-1446). Se creció en medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 2 mM de L-glutamina, penicilina (100 U/ml)/estreptomicina (100 mg/ml)/ fungizona (1 mg/ml) y 10% de suero bovino fetal. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂. Los cultivos se mantuvieron hasta la confluencia.

Tratamiento: Las células H9c2 fueron crecidas en cajas de 6 pozos en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de SBF, hasta obtener una confluencia del 70% al 80%. Posteriormente fueron ayunadas con DMEM al 2% de Suero Bovino Fetal (SBF) durante 24 h. Se trataron a diferentes dosis de apigenina 0, 2, 5, 10 y 15 µM durante 30 min. Finalmente se estimularon con LTA a una concentración de 15 µg/mL, en los ensayos de Western Blot se incubó durante 15 min y en RT-PCR se incubó 4 h. Todos los reactivos se obtuvieron de Sigma Aldrich.

Ensayo de Western-Blot. Los cardiomiocitos H9c2 se crecieron en cajas de 6 pozos. Después del tratamiento, el medio se aspiró y las células se desprendieron ayudados con un gendarme en buffer de fosfatos salino (PBS) + 1 mM ortovanadato de sodio, la muestra se centrifugó a 5,000 rpm durante 10 min y la pastilla se colocó con 50 µL de buffer de lisis (0.05 M Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5 M PMSF, 10 µg/ml leupeptina, 0.4 mM ortovanadato de sodio, 10 mM de fluoruro de sodio y 10 mM de pirofosfato de sodio), todos estos reactivos se obtuvieron de Sigma Aldrich. La muestra se sonicó (1 s x 30)

en un baño con hielo. Para el ensayo de Western Blot se utilizaron 50 µg de proteína que se mezcló 1:1 con buffer de muestra 2x (20% glicerol, 4% SDS, 10% 2-mercaptoetanol, 0.05% azul de bromofenol y 1.25 M Tris-HCl, pH 6.8; todos los reactivos se obtuvieron de Sigma Aldrich), las muestras se colocaron en un baño seco a 65°C durante 5 min. Se realizó una separación por electroforesis y se cargaron las muestras en un gel al 10% SDS-PAGE de acrilamida y a 80 V. Las proteínas celulares se transfirieron a una membrana de PVDF (Amersham) 30 min a 15 V en una cámara de transferencia Bio-Rad semiseca. Para verificar que se colocó igual concentración de proteína, las membranas se tiñeron con Rojo de Ponceau (Sigma Aldrich). Posteriormente, la membrana se bloqueó con 150 mM NaCl, 100 mM Tris- HCl, pH 7.8 (TBST) y 5% de suero de albúmina de bovino por 1 h. Se lavó y se incubó con el anticuerpo primario, se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti ratón-monoclonal fosfo-ERK (tirosina-204) (1:5000) ó anti-conejo policlonal ERK 1/2 (1:1000); ó anti-ratón monoclonal fosfo-p38 (Tyr182) (1: 5000) ó anti-p38 (1:1000) ó anti- mouse monoclonal fosfo-AKT (Ser 403) (1:1000) ó anti-cabra policlonal (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology). Las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C y posteriormente se lavaron durante 3 ocasiones con buffer de lavado (Tris-HCl NaCl, Tween, pH 7.8) (Sigma Aldrich) y se incubaron durante 1 h con el anticuerpo secundario, conjugado anti-ratón IgG (1:1000) ó anti- conejo IgG (1:1000) ó anti-cabra IgG (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology). Se realizaron 3 lavados con buffer del lavado. Las bandas inmunoreactivas se revelaron utilizando el sustrato de quimio-luminiscencia (Santa Cruz Biotechnology) y la autoradiografía se obtuvo después de exponer la película (GE Healthcare) durante 2 min. Los experimentos se realizaron en 3 ocasiones por separado. Las muestras se analizaron con el sistema digital Lab-Works versión 4.0.0.8; Ultraviolet Products Inc., Upland, CA.

Inmunocitoquímica: Las células se crecieron en cubreobjetos. Posteriormente se trataron con el LTA y/o el flavonoide a los tiempos y dosis indicados en los pies de figura. Se fijaron por 30 min con 2% de formaldehído en PBS a 4°C y se lavaron 3 ocasiones con PBS. Posteriormente se permeabilizaron durante 5 min con Triton 0.1% en PBS y se lavaron 3 ocasiones con PBS. Para la visualización de NF-κB e

I κ B las células se trataron durante 1 h con anticuerpo anti-conejo-I κ B, anti-cabra- NF- κ B diluidos 1:100 en PBS, posteriormente se lavaron en cinco ocasiones con PBS. Las células se incubaron durante 45 min con anti-conejo IgG acoplado a fluoresceína ó anti-cabra acoplado a rodamina (Santa Cruz Biotechnology) se utilizaron en dilución 1:100 en PBS. Las muestras se montaron en portaobjetos y se observaron por microscopía confocal.

Ensayo RT-PCR. El RNA total se aisló de las células usando el método de Chomczynski y Sacchi (60). El RNA total (1 μ g) fue transcrito en forma inversa (RT) usando el equipo Termociclador (Perkin Elmer 2400). La reacción de la polimerasa en cadena (PCR) se realizó utilizando los oligonucleótidos 5'-ACC TCA CAA GCA GAG CAC AA-3' (sentido codificante) y 5'-TTG GCC GAG GAC TAA GGA GT-3' (sentido anticodificante) derivado del gen de IL-1 β ; 5'- CAG ATT GCT GGC CGG GTA A-3' (sentido codificante) y 5'- ACC TAA AAC CCT TCC TAA ACC TTG-3' (sentido anticodificante) derivado del gen de COX-2; 5'-GCG CCC CAC TAA CAT CA-3' (sentido codificante) y 5'-GAG TTG GGA TAG GGC CTC TCT T-3' (sentido anticodificante) derivado del gen GADPH.

Las condiciones de la amplificación fueron las siguientes: desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento a 55°C por 1 min y extensión a 72°C por 1.5 min. El PCR se efectuó por 35 ciclos y como resultado del RT-PCR se obtuvo una banda sencilla de 1033 pares de bases para COX-2, una banda sencilla de 287 pares de bases para IL-1 β y una banda sencilla de 309 pares de bases para GADPH. La identidad del fragmento se caracterizó por su tamaño aparente en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio (GIBCO).

Cuantificación de Proteínas. Se cuantificaron las proteínas por el método de Bradford (77).

Ensayo de MTT. Los cardiomiocitos se crecieron durante 24 h en cajas de 96 pozos. Fueron expuestos a diferentes tiempos (24, 48 y 72 h) y diferentes concentraciones del flavonoide apigenina (-Log 8, 7, 6 y 5 M). En los casos en los que las células se trataron con LTA, éste se adicionó 30 min después de la aplicación del flavonoide. Se absorbió el medio a los pozos para agregar 100 μ L de una solución de MTT (5 mg/mL) y se incubaron durante 4 h. El medio fue eliminado, dejando cristales de formazán, los cuales fueron disueltos en 100 μ L de DMSO. Se midió la absorbancia a 540 nm utilizando un lector de placas (BioTek ELx808) . Se realizó un sextuplicado tres veces.

Análisis estadístico. Los datos se expresaron como la media \pm E.E (error estándar). Las diferencias significativas se determinaron con la prueba t de Student. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1 Efecto de la apigenina sobre las proteínas MAPK estimuladas con LTA en células H9c2

Con el propósito de evaluar el efecto de la apigenina sobre la activación de las proteínas MAPK en células H9c2 tratadas con LTA, se realizaron ensayos de Western Blot que reconocen a las formas fosforiladas de estas proteínas. Los resultados muestran que la apigenina promovió la disminución en la fosforilación de p38, JNK y ERK 1/2, de manera dependiente de la dosis, en células H9c2 estimuladas con LTA. Desde una dosis de 2 μM se observa una diferencia significativa con respecto a la estimulación con LTA. El mayor efecto se muestra a la dosis 15 μM (Figura 11, 12,13).

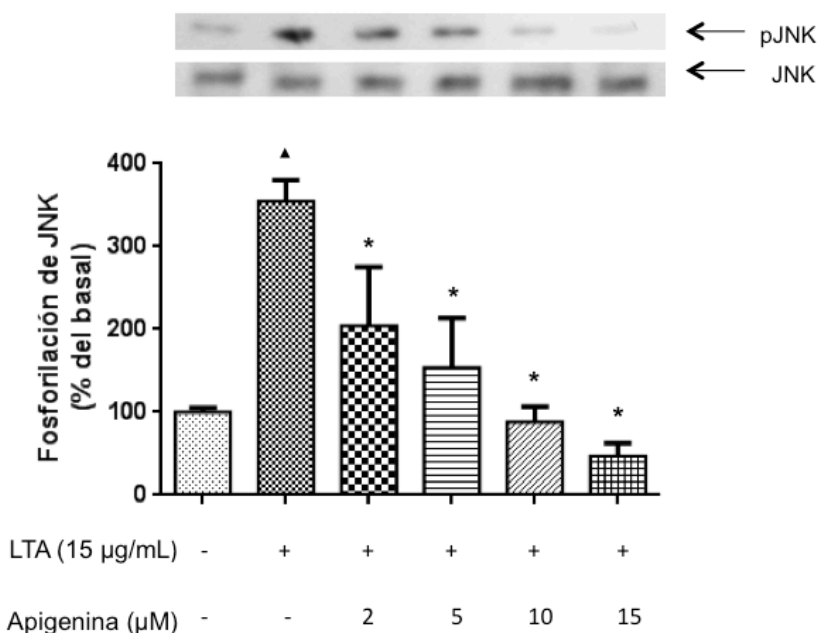


Figura 11. Ensayo dosis-respuesta del efecto de apigenina sobre la acción de LTA en la activación de JNK en células H9c2

Las células H9c2 fueron crecidas en cajas de 6 pozos en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de SBF, hasta obtener una confluencia del 70% – 80%. Posteriormente fueron ayunadas con DMEM al 2% de SBF durante 24 h. Se trataron a diferentes dosis de apigenina (2, 5, 10 y 15 μM) durante 30 min. Finalmente se estimularon durante 15 min con LTA (15 $\mu\text{g/mL}$). Las células fueron procesadas para su análisis por Western Blot. Los resultados se analizaron por densitometría mediante el sistema digital Lab-Works (versión 4.0.0.8; Ultraviolet Products Inc., Upland, CA). Los experimentos se realizaron 3 veces por separado. Se muestra una imagen correspondiente al valor de la media \pm E.E. de la fosforilación de JNK. Los resultados se analizaron mediante t-student con una [^] $p < 0.05$ comparada con respecto al control y * $p < 0.05$ comparada con respecto al tratamiento de LTA.

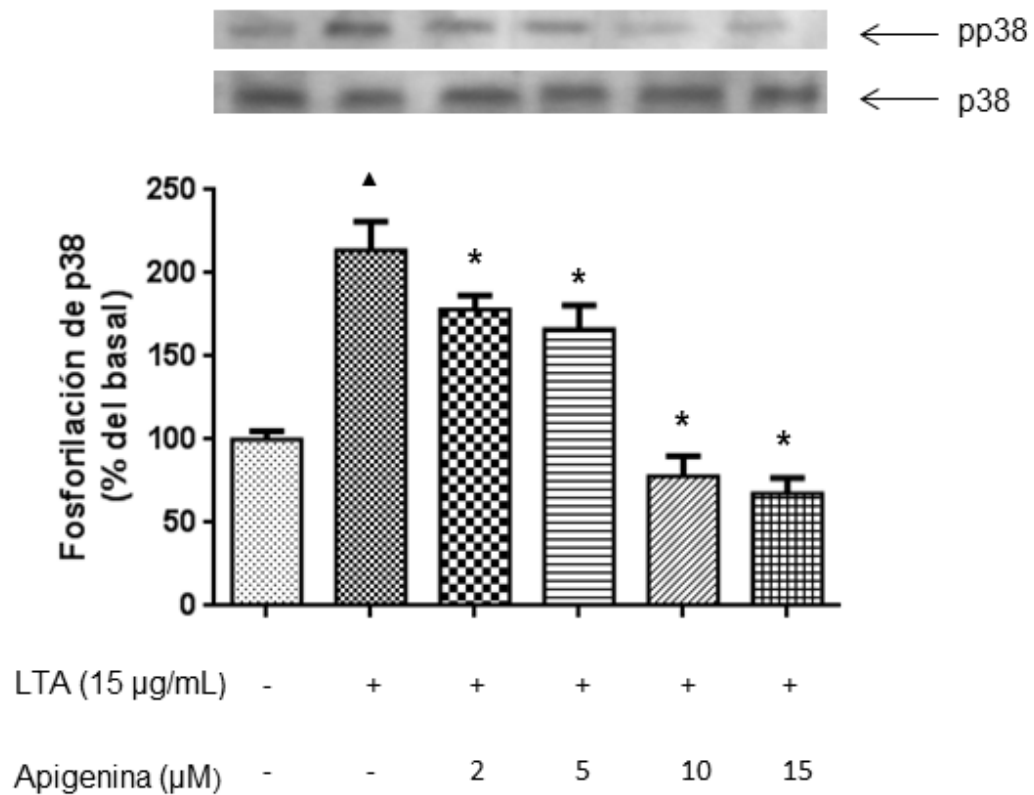


Figura 12. Ensayo dosis-respuesta del efecto de apigenina sobre la acción de LTA en la activación de p38 en células H9c2

Las células H9c2 fueron crecidas en cajas de 6 pozos en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de SBF, hasta obtener una confluencia del 70% – 80%. Posteriormente fueron ayunadas con DMEM al 2% de SBF durante 24 h. Se trataron a diferentes dosis de apigenina (2, 5, 10 y 15 µM) durante 30 min. Finalmente se estimularon durante 15 min con LTA (15 µg/mL). Las células fueron procesadas para su análisis por Western Blot. Los resultados se analizaron por densitometría mediante el sistema digital Lab-Works (versión 4.0.0.8; Ultraviolet Products Inc., Upland, CA). Los experimentos se realizaron 3 veces por separado. Se muestra una imagen correspondiente al valor de la media ± E.E. de la fosforilación de p38. Los resultados se analizaron mediante t-student con una [▲] p<0.05 comparada con respecto al control y * p<0.05 comparada con respecto al tratamiento de LTA.

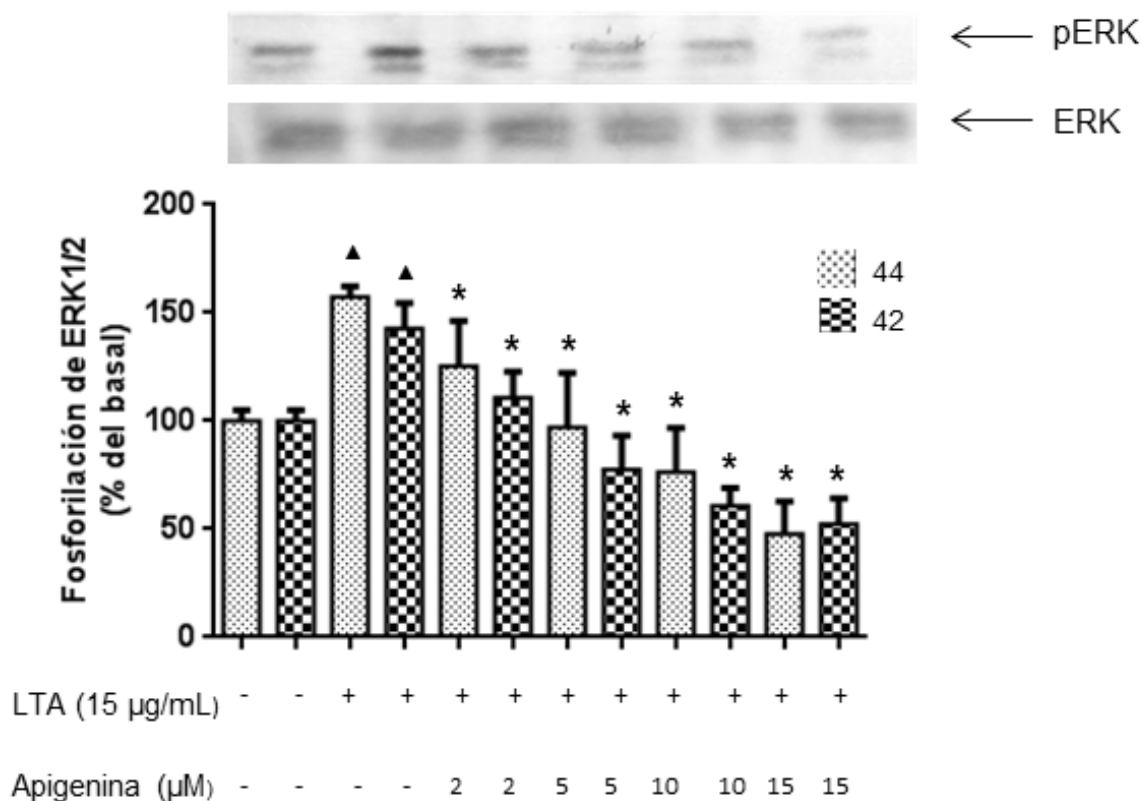


Figura 13. Ensayo dosis respuesta del efecto de apigenina sobre la acción de LTA en la activación de ERK1/2 en células H9c2

Las células H9c2 fueron crecidas en cajas de 6 pozos en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de SBF, hasta obtener una confluencia del 70% – 80%. Posteriormente fueron ayunadas con DMEM al 2% de SBF durante 24 h. Se trataron a diferentes dosis de apigenina (2, 5, 10 y 15 µM) durante 30 min. Finalmente se estimularon durante 15 min con LTA (15 µg/mL). Las células fueron procesadas para su análisis por Western Blot. Los resultados se analizaron por densitometría mediante el sistema digital Lab-Works (versión 4.0.0.8; Ultraviolet Products Inc., Upland, CA.). Los experimentos se realizaron 3 veces por separado. Se muestra una imagen correspondiente al valor de la media ± E.E. de la fosforilación de las subunidades 44 y 42 de ERK. Los resultados se analizaron mediante t-student con una [▲] p<0.05 comparada con respecto al control y * p<0.05 comparada con respecto al tratamiento de LTA.

6.2 Efecto de la apigenina sobre la activación NFκB

Uno de los resultados de la fosforilación de las proteínas MAPK es la activación del factor nuclear kappa B (NFκB). NFκB es un factor de transcripción regulador de la expresión genética proinflamatoria. La síntesis de citocinas como TNFα, IL-1β, IL-6 e IL-8 es mediada directamente por NFκB, así como la expresión de COX-2. (41). Debido a ello, se evaluó el efecto de la apigenina sobre el complejo formado por NFκB e IκB, mediante un ensayo de inmunocitoquímica. Los resultados muestran que en un estado basal NFκB e IκB se encuentran formando un complejo ubicándose en el citosol. Tras el estímulo con LTA (15 μg/mL), IκB es degradado mientras que NFκB ingresa al núcleo. La aplicación de la apigenina revierte dicho efecto, observándose que a una concentración de 15 μM del flavonoide, NFκB se encuentra nuevamente en el citosol e IκB ya no es degradado (Figura 14).

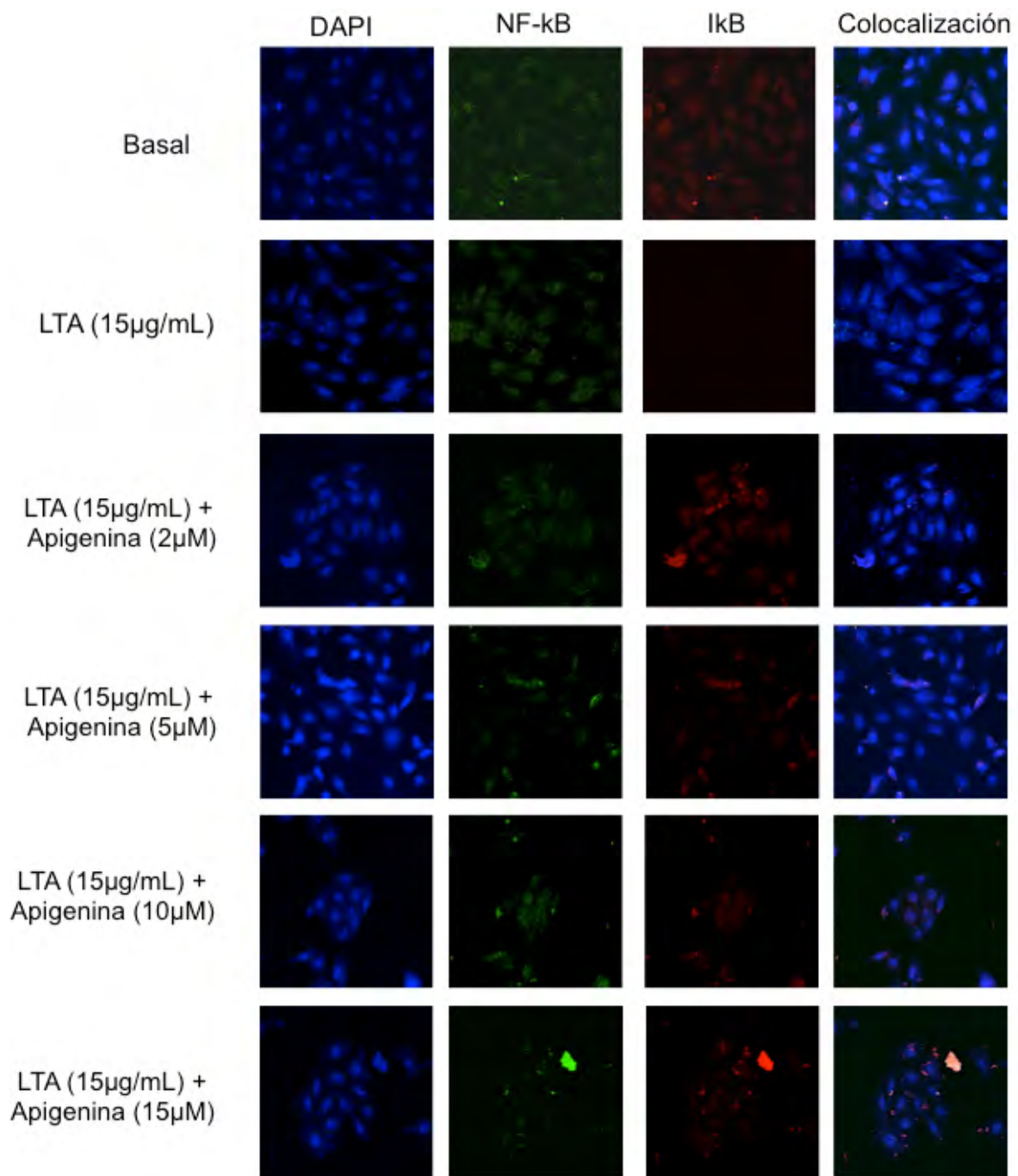


Figura 14. Ensayo dosis-respuesta del efecto de la apigenina sobre NFκB en células H9c2 estimuladas con LTA

Las células H9c2 fueron crecidas sobre cubreobjetos en cajas de 12 pozos en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de SBF, hasta obtener una confluencia del 70% – 80%. Posteriormente fueron ayunadas con DMEM al 2% de SBF durante 24 h. Se trataron a diferentes dosis de apigenina (2, 5, 10 y 15 µM) durante 30 min. Finalmente se estimularon durante 15 min con LTA (15 µg/mL). Las células fueron procesadas mediante un ensayo de inmunocitoquímica. Se muestra la imagen representativa, analizada mediante microscopia confocal.

6.3 Efecto de la apigenina sobre la expresión de IL-1 β y COX-2

Como se mencionó anteriormente, NF κ B media la expresión de diferentes mediadores proinflamatorios como IL-1 β y COX-2 (41), por ello se evaluó su expresión mediante un ensayo de RT-PCR con el objetivo de determinar si la apigenina tiene efecto sobre dicha expresión. Los resultados muestran que la apigenina disminuye la expresión de IL-1 β y COX-2 inducida por LTA, desde una concentración de 2 μ M (Figura 15, 16).

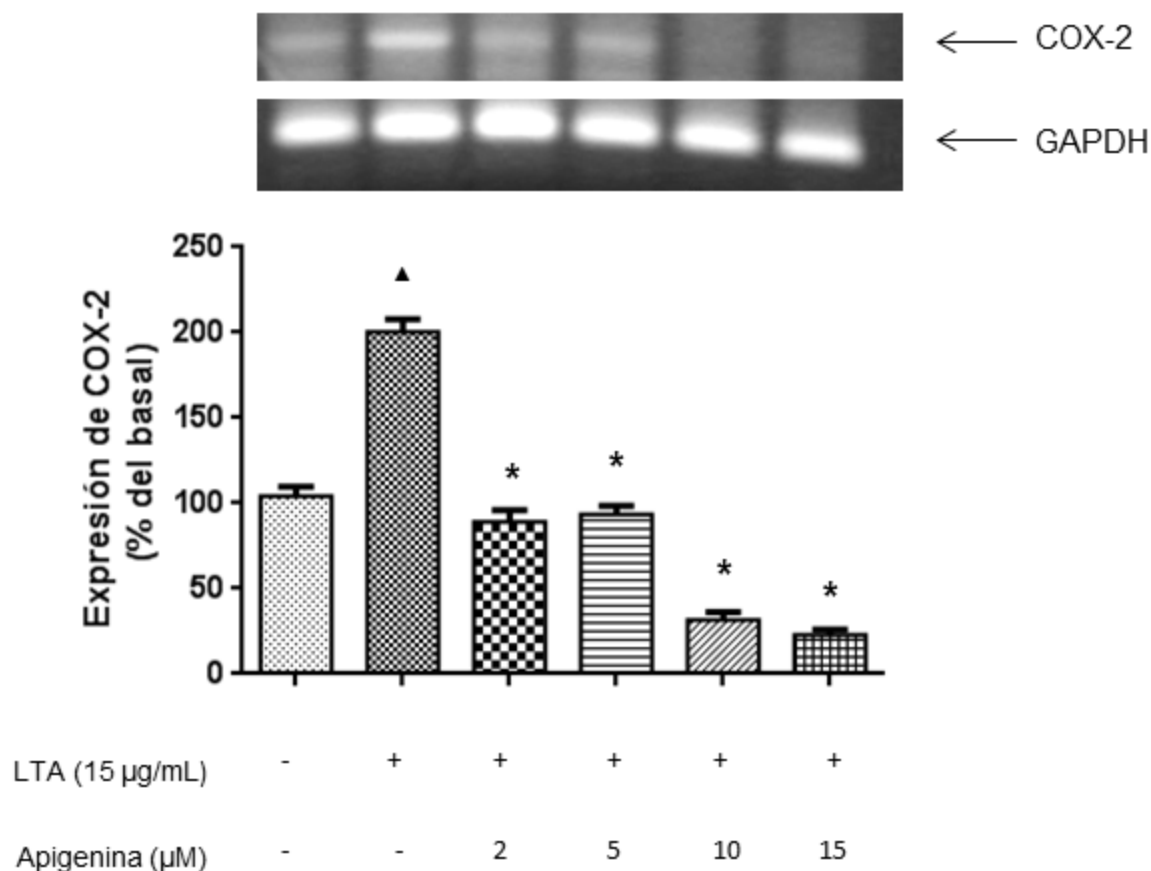


Figura 15. Ensayo dosis-respuesta del efecto de apigenina sobre la acción de LTA en la expresión de COX-2 en células H9c2

Las células H9c2 fueron crecidas en cajas de 6 pozos en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de SBF, hasta obtener una confluencia del 70% – 80%. Posteriormente fueron ayunadas con DMEM al 2% de SBF durante 24 h. Se trataron a diferentes dosis de apigenina (2, 5, 10 y 15 μ M) durante 30 min. Finalmente se estimularon durante 4 h con LTA (15 μ g/mL). Las células fueron procesadas mediante un ensayo de RT-PCR. Los resultados se analizaron por densitometría mediante el sistema digital Lab-Works. Los experimentos se realizaron 2 veces por separado. Se muestra una imagen correspondiente al valor de la media \pm E.E. de la expresión de COX-2. Los resultados se analizaron mediante t-student con una [▲] $p < 0.05$ comparada con respecto al control y * $p < 0.05$ comparada con respecto al tratamiento de LTA.

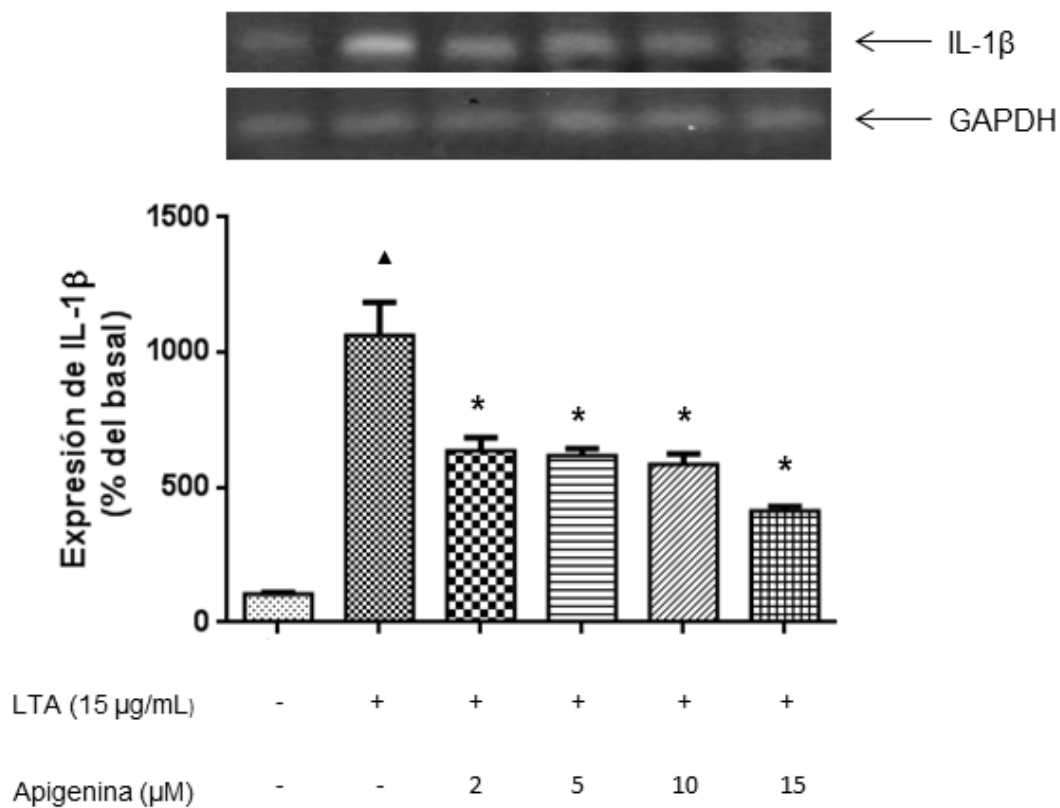


Figura 16. Ensayo dosis-respuesta del efecto de apigenina sobre la acción de LTA en la expresión de IL-1 β en células H9c2

Las células H9c2 fueron crecidas en cajas de 6 pozos en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de SBF, hasta obtener una confluencia del 70% – 80%. Posteriormente fueron ayunadas con DMEM al 2% de SBF durante 24 h. Se trataron a diferentes dosis de apigenina (2, 5, 10 y 15 μ M) durante 30 min. Finalmente se estimularon durante 4 h con LTA (15 μ g/mL). Las células fueron procesadas mediante un ensayo de RT-PCR. Los resultados se analizaron por densitometría mediante el sistema digital Lab-Works. Los experimentos se realizaron 2 veces por separado. Se muestra una imagen correspondiente al valor de la media \pm E.E. de la expresión de IL-1 β . Los resultados se analizaron mediante t-student con una [▲] $p < 0.05$ comparada con respecto al control y * $p < 0.05$ comparada con respecto al tratamiento de LTA.

6.4 Efecto de la apigenina sobre la activación de la proteína AKT

Estudios previos han demostrado que las proteínas MAPK pueden ser activadas vía PI3K (24). Con el propósito de determinar si la apigenina podría estar actuando sobre esta vía, se evaluó la activación de la proteína AKT mediante un ensayo de Western Blot. Los resultados mostraron un aumento en la fosforilación tras la estimulación con LTA, efecto que va disminuyendo tras la aplicación de la apigenina, mostrando resultados significativos desde una concentración de 2 μM , siendo mayor el efecto a una concentración de 15 μM (Figura 17).

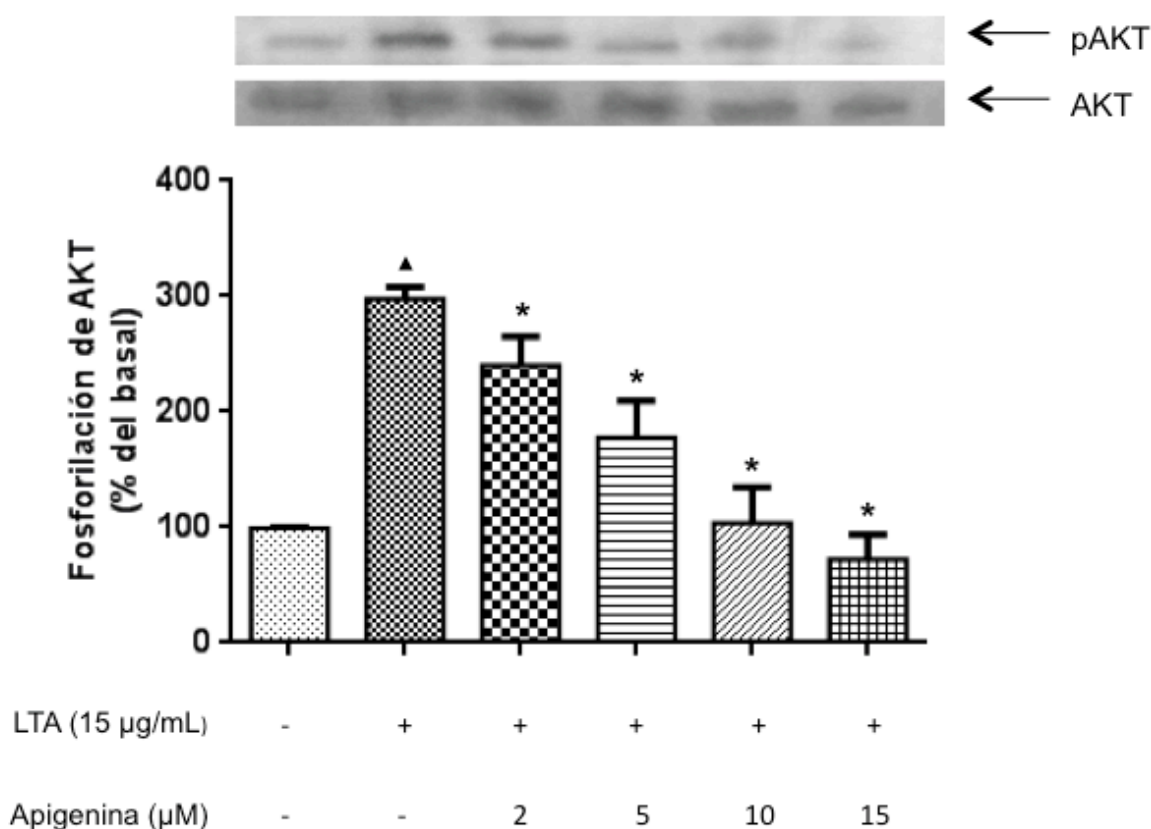


Figura 17. Ensayo dosis-respuesta del efecto de apigenina sobre la acción de LTA en la activación de la proteína AKT en células H9c2

Las células H9c2 fueron crecidas en cajas de 6 pozos en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de SBF, hasta obtener una confluencia del 70% – 80%. Posteriormente fueron ayunadas con DMEM al 2% de SBF durante 24 h. Se trataron a diferentes dosis de apigenina (2, 5, 10 y 15 μM) durante 30 min. Finalmente se estimularon durante 15 min con LTA (15 $\mu\text{g/mL}$). Las células fueron procesadas para su análisis por Western Blot. Los resultados se analizaron por densitometría mediante el sistema digital Lab-Works (versión 4.0.0.8; Ultraviolet Products Inc., Upland, CA.). Los experimentos se realizaron 3 veces por separado. Se muestra una imagen correspondiente al valor de la media \pm E.E. Los resultados se analizaron mediante t-student con una Δ $p < 0.05$ comparada con respecto al control y * $p < 0.05$ comparada con respecto al tratamiento de LTA.

6.5 Efecto de la inhibición de PLC, PI3K, PKA y NFκB sobre la expresión de COX-2 inducida por LTA

Continuando con el análisis de la vía de PI3K, se evaluó la expresión de COX-2 al colocar los siguientes inhibidores: U73122 (10 μM) inhibidor de PLC, Ly294002 (1 μM) inhibidor de PI3K, H89 (10 μM) inhibidor de PKA y Curcumina (30 μM) inhibidor de NFκB (40). Los resultados mostraron un aumento en la expresión de COX-2 al colocar el LTA, posteriormente la acción de los inhibidores disminuyó la su expresión (Figura 18).

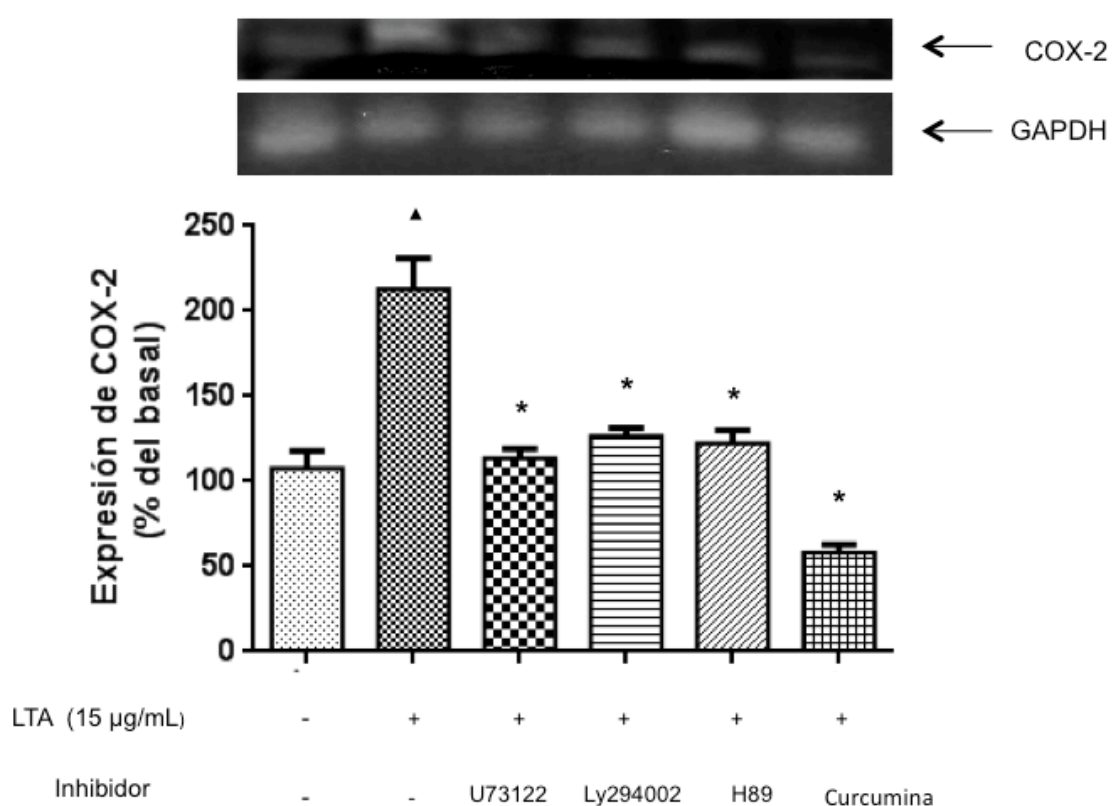


Figura 18. Efecto U73122, Ly294002, H89 y curcumina sobre la acción de LTA en la expresión de COX-2

Las células H9c2 fueron crecidas en cajas de 6 pozos en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de SBF, hasta obtener una confluencia del 70% – 80%. Posteriormente fueron ayunadas con DMEM al 2% de SBF durante 24 h. Se trataron con U73122 10 μM, Ly294002 1 μM, H89 10 μM y Curcumina 30 μM durante 30 min. Finalmente se estimularon durante 15 min con LTA (15 μg/mL). Las células fueron procesadas para su análisis por RT-PCR. Los resultados se analizaron por densitometría mediante el sistema digital Lab-Works. Los experimentos se realizaron 2 veces por separado. Se muestra una imagen correspondiente al valor de la media ± E.E. de la expresión de COX-2. Los resultados se analizaron mediante t-student con una [▲] p<0.05 comparada con respecto al control y * p<0.05 comparada con respecto al tratamiento de LTA.

6.6 Efecto de la apigenina y el LTA sobre la viabilidad celular

Estudios previos han demostrado que el LTA promueve la muerte celular. Con el objetivo de determinar si la apigenina contrarresta la muerte celular causada por LTA, se realizaron ensayos de MTT analizando la viabilidad celular. En la Figura 19 se realizó un ensayo dosis-respuesta con apigenina. Los resultados muestran que en un rango de concentraciones de 0.01 μM a 10 μM , el flavonoide no tiene efecto significativo sobre la viabilidad celular. Posteriormente se evaluó el efecto de la apigenina y el LTA en viabilidad celular (Figura 20). En este ensayo se utilizaron dosis en un rango de 0.1 μM a 10 μM y posteriormente se agregó LTA (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Los resultados muestran que la apigenina contrarresta la disminución de la viabilidad celular causada por el LTA.

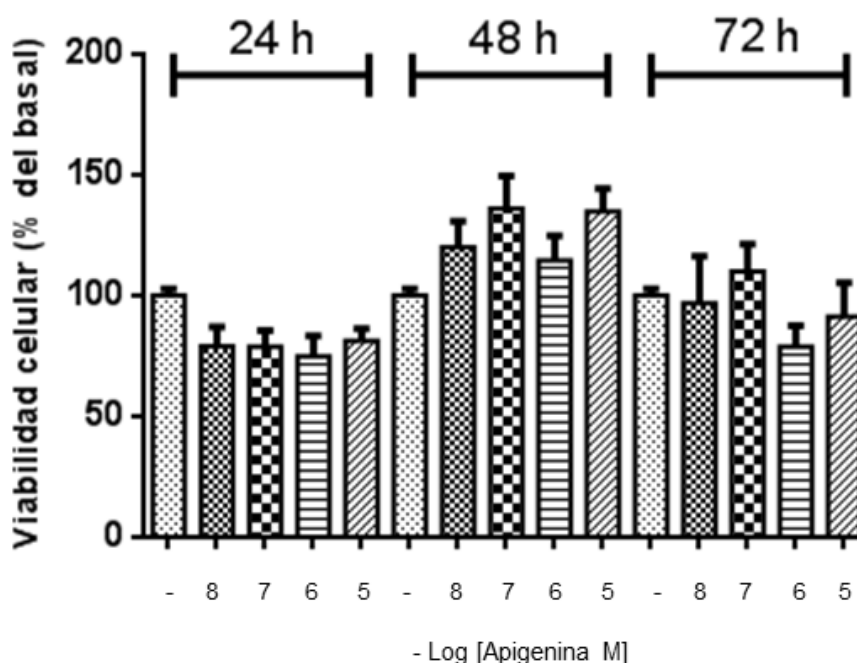


Figura 19. Efecto de apigenina sobre la viabilidad celular

Las células H9c2 fueron crecidas en cajas de 96 pozos durante 24 h en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de SBF. Posteriormente fueron expuestas a diferentes tiempos (24, 48 y 72 h). Se muestra el tratamiento a diferentes dosis de apigenina (-Log 8, 7, 6 y 5 M). Las células fueron procesadas para su análisis mediante el ensayo de MTT. Los resultados se analizaron en un lector de placas midiéndose su absorbancia a 540 nm. El experimento se realizó por sextuplicado tres veces. Se muestra una imagen correspondiente al valor de la media \pm E.E. Los resultados se analizaron mediante t-student con una $\Delta p < 0.05$ comparada con respecto al control.

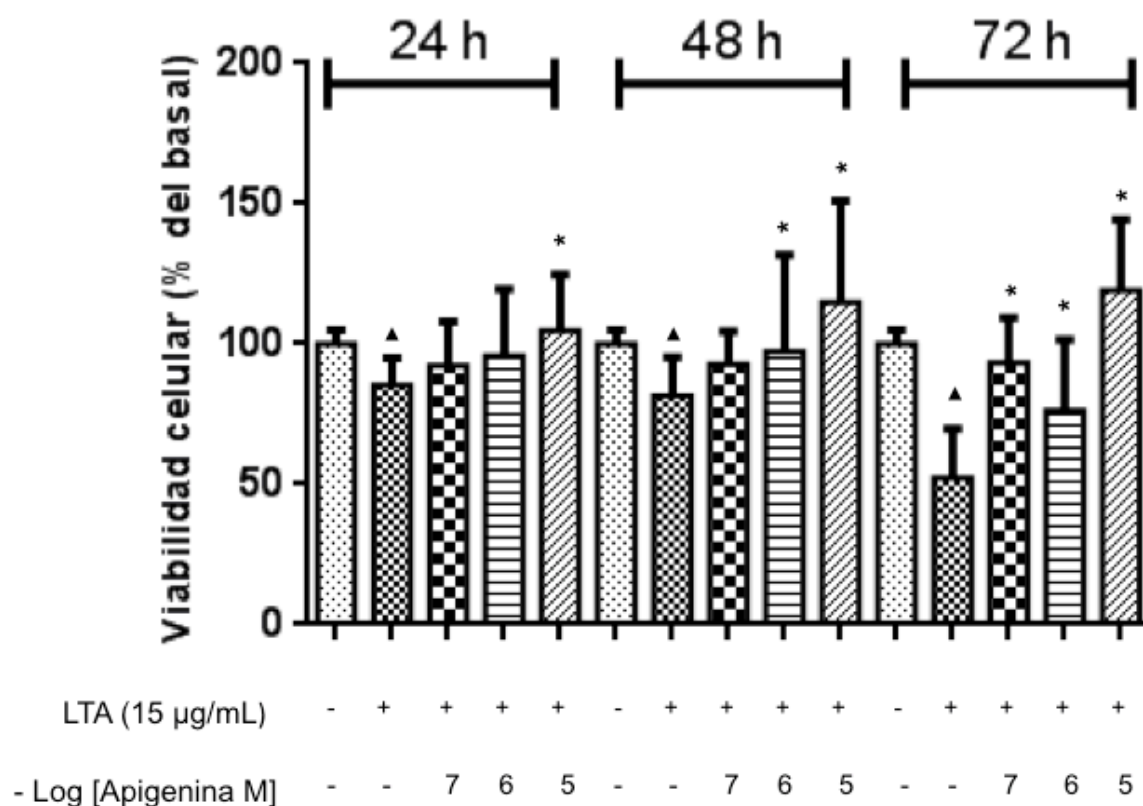


Figura 20. Efecto de apigenina y LTA sobre la viabilidad celular

Las células H9c2 fueron crecidas en cajas de 96 pozos durante 24 h en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de SBF. Posteriormente fueron expuestas a diferentes tiempos (24, 48 y 72 h). Se adicionaron diferentes dosis de apigenina (-Log 7, 6 y 5 M) durante 30 min, posteriormente se adicionó LTA (15 µg/mL). Las células fueron procesadas para su análisis mediante el ensayo de MTT. Los resultados se analizaron en un lector de placas midiéndose su absorbancia a 540 nm. El experimento se realizó por sextuplicado tres veces. Se muestra una imagen correspondiente al valor de la media ± E.E. Los resultados se analizaron mediante t-student con una [▲] p<0.05 comparada con respecto al control y * p<0.05 comparada con respecto al tratamiento de LTA.

7. Discusión

Streptococcus sanguinis, miembro de la microbiota de la cavidad oral humana, conocido por ser el primer colonizador en la formación de la placa dental, es también uno de los principales agentes causantes de la endocarditis infecciosa (EI) (61). Al ser un microorganismo Gram positivo presenta en su pared celular ácido teicoico y ácido lipoteicoico (LTA), sin embargo, el LTA es el que predomina y su biosíntesis es menos dependiente de las condiciones de crecimiento bacteriano, en comparación con los ácidos teicoicos; además de que sus actividades están relacionadas con el desarrollo de la sepsis (7). La interacción entre el LTA y el receptor TLR2 promueve la activación de vías de señalización como MyD88, y MAPK, quienes activan factores de transcripción como NF κ B. La inducción de estas vías es requerida para la expresión de células proinflamatorias como COX-2 e IL-1 β (62).

En el presente estudio se demostró que la apigenina disminuye la fosforilación de las cinasas AKT, ERK, JNK y p38 causada por el ácido lipoteicoico, así como la disminución de la degradación de I κ B y el ingreso de NF κ B al núcleo, en consecuencia una disminución en la expresión de IL-1 β y COX-2. Debido a que las cinasas antes mencionadas están directamente implicadas en la transcripción y traducción de genes de respuesta inflamatoria y como los flavonoides se unen con alta afinidad al sitio de fijación de ATP por, consecuencia regularan el funcionamiento de estas cinasas.

Apigenina pertenece al grupo de los flavonoides, compuestos fenólicos presentes en las plantas, a los cuales se les han conferido propiedades antioxidantes, anticancerígenas, antibacteriales, antifúngicas y antiinflamatorias, entre otras (63). En este estudio se valoró la propiedad antiinflamatoria de la apigenina. Debido a que las MAPK están implicadas en el proceso inflamatorio, se evaluó su activación mediante ensayos de Western blot. Qingxin Liu y su equipo (69) demostraron que la apigenina disminuye la fosforilación de JNK, ERK y p38 en células de músculo liso de vejiga humana estimuladas con adenovirus, a una dosis de 50 μ M y

tratadas durante toda la noche. Sin embargo, en las células H9c2 encontramos diferencias significativas en la disminución de la fosforilación de las MAPK desde una concentración de 2 μM siendo mayor a una concentración de 15 μM . La disminución de la activación de las MAPK se relaciona a la capacidad del flavonoide de inhibir el sitio de unión de ATP a diversas proteínas cinasas, lo que impide su fosforilación (64).

Como se mencionó anteriormente, las MAPK son capaces de activar a $\text{NF}\kappa\text{B}$. Por ello, mediante un ensayo de inmunocitoquímica se evaluó el efecto de apigenina y LTA sobre el ingreso de $\text{NF}\kappa\text{B}$ al núcleo. Tras el estímulo con LTA, $\text{I}\kappa\text{B}$ se degrada, mientras que a $\text{NF}\kappa\text{B}$ se sitúa en el núcleo. En su forma inactiva $\text{NF}\kappa\text{B}$ se encuentra en el citosol asociada con una proteína inhibitoria conocida como $\text{I}\kappa\text{B}$, después de la estimulación de diversas cinasas las como MAPK, ocurre la activación de $\text{I}\kappa\text{B}$ cinasa (IKK). Cuando $\text{I}\kappa\text{B}$ es fosforilado por IKK, se promueve su ubiquitinización y es degradado por el proteosoma, permitiendo la liberación de $\text{NF}\kappa\text{B}$. Posteriormente $\text{NF}\kappa\text{B}$ migra al núcleo, ubicándose en secuencias consenso de un gran número de genes relacionados con apoptosis, tumorigénesis e inflamación (65). En un estudio realizado por Megumi Funakoshi (70) se demuestra que en una línea celular de fibroblastos derivada de cultivos de embrión de ratón, la apigenina a una concentración de 20 μM y 30 μM disminuye la activación de $\text{NF}\kappa\text{B}$ promovida por $\text{TNF}\alpha$, sin embargo, a una concentración de 10 μM no es efectivo. Al compararlo con nuestros resultados, en H9c2 estimulados con LTA, encontramos que apigenina sí inhibe la activación de $\text{NF}\kappa\text{B}$ desde una concentración de 10 μM , siendo mayor el efecto a una concentración de 15 μM . Estas diferencias en la dosis efectiva del funcionamiento del LTA podrían deberse a la diferencia en el número sitios presentes en los diferentes tipos celulares o a la constante de afinidad.

Continuando con el estudio, se procedió a evaluar la expresión de COX-2 e IL-1 β , las cuales actúan como células proinflamatorias y son reguladas por la activación de $\text{NF}\kappa\text{B}$ (41, 62). Se realizó un ensayo dosis respuesta evaluando el efecto que

tiene la apigenina sobre la acción del LTA en la expresión de COX-2 e IL-1 β . Los resultados muestran que el estímulo con LTA promueve la expresión de COX-2 e IL-1 β , lo que concuerda con estudios realizados en un cultivo primario de microglia (66) el cual se estimuló con LTA de *Staphylococcus aureus*. Posteriormente la aplicación de dosis crecientes de apigenina disminuyeron la expresión de COX-2 e IL-1 β . Al igual que apigenina, se han realizado estudios con el flavonoide fisetina (67) y se ha demostrado que disminuye la expresión de COX-2 y la producción de IL-1 β causada por una estimulación con lipopolisacárido (LPS).

En el año 2005 Shang-Jyh y su equipo de trabajo demostraron que en una línea celular de macrófagos de ratón, el LTA es capaz de activar la vía de PI3K/AKT, la cual posteriormente activa a las MAPK (68). Además, estudios realizados en una línea celular de cáncer de mama humano, han demostrado que apigenina es capaz de disminuir la fosforilación de AKT (71). Por esta razón se evaluó la fosforilación de AKT mediante ensayos de Western Blot. Los resultados mostraron que tras la estimulación con LTA, AKT aumentó aproximadamente 3 veces su fosforilación. Al realizar el ensayo de dosis respuesta con apigenina, se observó que la fosforilación disminuyó de forma dependiente de la dosis. Lo que nos sugiere que apigenina podría estar actuando desde la vía de PI3K/AKT.

En el mismo estudio de Shang-Jyh (68), se menciona que el LTA es capaz de activar a NF κ B mediante dos vías. La primera es por medio de la activación de la PLC, la cual al hidrolizar al fosfatidil inositol bifosfato (PIP2) produce diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3) que activan a PKC, lo que provoca la activación de NF κ B. La segunda implica la vía de PI3K, donde AKT es fosforilada e induce la activación de las MAPK, como consecuencia se promueve la degradación de I κ B y el ingreso de NF κ B al núcleo. En otro estudio realizado por Yong Chool y su equipo mencionan que PI3K activa a PKA y a AKT (72), en células endoteliales de aorta bovina en respuesta al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Siguiendo dicho planteamiento se evaluó el efecto del LTA sobre la expresión de COX-2 inhibiendo a PLC, PI3K, PKA y NF κ B. Los resultados mostraron que tras la

inhibición de estas proteínas, la expresión de COX-2 estimulada con LTA disminuye. Por lo cual nuestros resultados sugieren que tanto la vía de PI3K como la de PLC están involucradas en la acción del LTA en la línea celular H9c2 y que apigenina podría estar actuando en la vía de PI3K, porque se observa una disminución en la fosforilación de AKT, en consecuencia, disminuye la fosforilación de las MAPK y la activación de NF κ B, seguido de una inhibición de la expresión de COX-2 e IL-1 β .

Estudios previos han demostrado que el LTA promueve la muerte celular (72). Por esta razón se evaluó el efecto de apigenina y LTA sobre la viabilidad celular. Primero se evaluó únicamente a apigenina. Aparentemente el flavonoide aumenta la viabilidad celular, sin embargo, al realizar un análisis estadístico se observa que la diferencia no es significativa. En el año 2009 se publicó un estudio donde se evaluó el efecto de apigenina a concentraciones de 10 μ M a 50 μ M durante 24 h, en este estudio se reporta que el flavonoide no ejerce efecto alguno sobre la viabilidad en células de ligamento periodontal humano (74). Posteriormente se evaluó el efecto de apigenina tras la aplicación de LTA. Los resultados muestran que el LTA disminuye la viabilidad celular, efecto que se contrarresta con la acción de apigenina, siendo más notorio a un tiempo de 72 h a una concentración de 10 μ M. Lo que nos sugiere que apigenina al inhibir a COX-2 e IL-1 β podría brindarle a las células un efecto protector ante la muerte celular causada por LTA.

8. Conclusión

La endocarditis infecciosa (EI) es una enfermedad con múltiples complicaciones como insuficiencia cardíaca, problemas neurológicos, embolias sistémicas, abscesos cardíacos e incluso la muerte, teniendo una tasa de mortalidad entre 15% y 40% en países desarrollados (75,76). Los flavonoides son compuestos naturales a los cuales se les han atribuido diversas propiedades, entre ellas antiinflamatorias (70). Al evaluar el efecto de la apigenina en una línea celular H9c2 derivada de cardiomiocitos de ratón, se demostró que inhibe vías de señalización involucradas en el proceso inflamatorio provocado por el ácido lipoteicoico obtenido de *Streptococcus sanguinis*, una de las bacterias causantes de EI. Por lo tanto, la apigenina, por sus propiedades antiinflamatorias, es un candidato a fármaco para el tratamiento de la endocarditis infecciosa.

9. Bibliografía

1. M. Negroni. (2009): Microbiología Estomatológica: Fundamentos y Guía Práctica. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires.
2. L. Lang. T. Karring. (2009): Periodontología Clínica e Implantología Odontológica. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires.
3. R. Baez. (2002): Identificación de bacterias del género *Vibrio* asociadas al cultivo de la almeja. Caracterización y patogénesis. Facultad de Biología, Universidad de Santiago.
4. G. Tortora. (2007): Introducción a la Microbiología. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires.
5. C. Giroshi. (2009): Efecto de los flavonoides sobre la activación de señales intracelulares por ácido lipoteicoico en cardiomiocitos (H9c2). Facultad de Odontología, UNAM.
6. S. Morath, S. Aulock, T. Hartung. (2005): Structure function relationships of lipoteichoic acids. *Journal of Endotoxin Research*. 11: 348-356.
7. G. Gutiérrez, P. Cardoso. (2006): Ácido lipoteicoico: receptores y mecanismos de transducción. *Revista de Educación Bioquímica*. 25: 41-49.
8. Y. Tapia. (2005): Ácido lipoteicoico; estructura, mecanismo de transducción y actividad biológica. Facultad de Odontología, UNAM.
9. F. Enrile, V. Fuenmayor. (2009): Higiene Bucal. Ed. Médica Panamericana. Madrid.
10. T. Velzen, A. Inpijn. (1984): Plaque and systemic disease: a reappraisal of the focal infection concept. *Journal of Clinical Periodontopathology*. 11: 209-220.
11. M. Mesa, P. Patiño. (2006): Receptores tipo Toll: entre el reconocimiento de lo no propio infeccioso y las señales endógenas de peligro. *Inmunología*. 25: 115-130.
12. D. Hyun, J. Lee. (2012): Sensing of microbial molecular patterns by Toll-like receptors. *Immunological Reviews*. 250: 216-229.
13. C. Ruíz, G. Gutiérrez. (2003): Receptores Toll de transducción en la inmunidad innata. *Revista de Educación Bioquímica*. 22: 67-75.

14. E. Juárez, J. López, M. Torres, E. Sada. (2009): Receptores de la inmunidad innata en procesos infecciosos pulmonares. *Revista del Instituto de Enfermedades Respiratoria de México*. 22: 366-378.
15. B. Beutler, H. Wagner. (2002): *Toll-like Receptor Family Members and Their Ligands*. Springer. Alemania.
16. S. Akira, S. Uematsu, O. Takeuchi. (2006): Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 124: 783-801.
17. M. Herrero. (2010): ABC de los Toll-like receptors: relación con el desarrollo y progresión de enfermedades autoinmunes. *Inmunología*. 11: 135-143.
18. J. Bell, G. Mullen, C. Leifer, A. Mazzoni, D. Davies, D. Segal. (2003): Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends in Immunology*. 24: 528-533.
19. C. Salazar. (2011): Clonamiento de los receptores tipo Toll: TLR1, TLR2, TLR5 de membrana y TLR5 soluble en *Salmosalar*. Análisis de su expresión en células SHK-1 infectadas con *P. salmonis*. Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile.
20. M. Newman, R. Nisemgard. (1994): *Oral Microbiology Immunology*. Saunders. United States of America.
21. C. Sieber. (2012): Recuento de *Streptococcus mutans* en muestras de biofilm sobre dientes restaurados con resina compuesta oclusal versus dientes sanos mediante el método de cubeta. Facultad de odontología. Universidad de Chile.
22. B. Rosan, R. Lamont. (2000): Dental plaque formation. *Microbes and Infection*. 2: 1599-1607.
23. H. Vélez, W. Rojas, J. Borrero, R. Restrepo. (2004): *Fundamentos de Medicina: Cardiología*. Ed. Corporación para Investigaciones Biológicas. Colombia.
24. I. Lee, C. Wen, W. Hsuan, S. Wu, C. Lin, J. Shu. (2010): Cooperation of TLR2 with MyD88, PI3K, and Rac1 in lipoteichoic acid-induced cPLA₂/COX-2-dependent airway inflammatory responses. *The American Journal of Pathology*. 176: 1671-1684

25. M. Kovach, T. Standiford. (2011): Toll like receptors in diseases of the lung. *International Immunopharmacology*. 11: 1399-1406.
26. M. Sheng, M. Li, C. Zheng. (2012): Herpes viral infection and Toll-like receptor 2. *Protein and Cell*. 3: 590-601.
27. L. Taiz, E. Zeiger. (2006): *Fisiología vegetal*. Universitat Jaume. Castelló.
28. A. Romo. (2006): *Química de la Flora Mexicana*. Ed. Investigaciones en el Instituto de Química de la UNAM. México.
29. A. Guarnizo, P. Martínez. (2009): *Experimentos de Química Orgánica con Enfoque en Ciencias de la Vida*. Ed. Elizcom. Colombia.
30. C. Escamilla, E. Cuevas, J. Guevara. (2009): Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Medigraphic*. 52: 73-75.
31. L. Weston, U. Mathesius. (2013): Flavonoids: Their structure, biosynthesis and role in the rhizosphere, including allelopathy. *Journal of Chemical Ecology*. 39: 283-297.
32. M. Lu, T. Xiao, H. Zhang. (2013): Where do health benefits of flavonoids come from? Insights from flavonoid targets and their evolutionary history. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 432: 701-704.
33. R. Reyes, D. Suarez, A. Araujo. (2012): Los flavonoides y el sistema nervioso central. *Salud Mental*. 35: 375-384.
34. G. Jeong, S. Lee, S. Jeong, Y. Kim, E. Kim. (2009): Anti-inflammatory effects of apigenin on nicotine- and lipopolysaccharide-stimulated human periodontal ligament cell via heme oxygenase-1. *International Immunopharmacology*. 9: 1374-1380.
35. E. Lefort, J. Blay. (2013): Apigenin and its impact on gastrointestinal cancers. *Molecular Nutrition and Food Research*. 57: 126-144.
36. S. Shukla, S. Gupta. (2010): Apigenin: A promising molecule for cancer prevention. *National Institutes of Health*. 27: 962-978.
37. F. Gómez. (2011): *Guía para el tratamiento de la endocarditis infecciosa*. Hospital infantil de México. México.
38. E. Braunwald. (2000): *Tratado de Cardiología*. Ed. Mc Graw Hill. España.
39. G. Pérez. (2003): Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*. 1: 22

40. Z. Chen, L. Yang, Y. Liu, A. Tang, J. Zhang, Z. Yang. (2013): Ly294002 and rapamycin promote coxsackievirus-induced cytopathic effect and apoptosis via inhibition and PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 10.1007: 11010-013-1825-1.
41. R. Orlando. (2010): El factor de transcripción nuclear kappa en las enfermedades humanas. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 48: 55-60.
42. R. Romero. (2007): *Microbiología y Parasitología Humana*. Ed. Médica Panamericana. México.
43. P. Parham. (2006): *Inmunología*. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires.
44. P. Stein, M. Steffen, C. Smith, G. Jicha, J. Ebersole, E. Abner, L. Dawson. (2012): Serum antibodies to periodontal pathogens are risk factor for Alzheimer's disease. *National Institutes Of Health*. 8: 196-203.
45. S. Engebretson, M. Gelato, L. Hyman, B. Michalowicz, E. Schoenfeld. (2013): Design features of the diabetes and periodontal therapy trial (DPTT): A multicenter randomized single-masked clinical trial testing the effect of nonsurgical periodontal therapy on glycosylated hemoglobin (HbA1c) levels in subjects with type 2 diabetes and chronic periodontitis. *Contemporary Clinical Trials*. 30: 2-12.
46. K. Lee, E. Kim, J. Kim, Y. Choi, A. Mechant, K. Song, H. Lee. (2013): The relationship between metabolic conditions and prevalence of periodontal disease in rural Korean elderly. *Archives of Gerontology and Geriatrics*. 30: 2907-2912.
47. G. Rossi. (2004). *Atlas de Odontología Restauradora y Periodoncia*. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires.
48. M. Madigan, J. Martinko, P. Dunlap, D. Clark. (2009). *Brok Biología de los microorganismos*. Pearson. Madrid.
49. D. Cárdenas. (2003): *Fundamentos de Odontología: Odontología pediátrica*. Ed. Corporación para investigaciones Biológicas. Colombia.
50. M. Barrancos. (2006): *Operatoria Dental: Integración Clínica*. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires.

51. M. Shaik, S. Ahmad, S. Gan, A. Abuzenadah, E. Ahmad, S. Tabrez, F. Ahmed, M. Kamal. (2013): How do periodontal infections affect the progression of type 2 diabetes and Alzheimer's disease? *Neurological Disorders Drug Targets*. 13: 437-49.
52. M. Mani, H. Tejnani, R. Pawar, P. Marawar. (2013): The relationship between periodontitis and systemic diseases- hype or hope? *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 7: 758-762.
53. D. Kinane, G. Marshall. (2001): Periodontal manifestations of systemic disease. *The Australian Dental Journal*. 46: 2-12.
54. A. Azarpazhooh, J. Leake. (2006): Systematic review of the association between respiratory diseases and oral health. *Journal of Periodontology*. 77: 1465-1482.
55. M. Khosravi, F. Jalali, S. Seyyed, S. Hoseini, F. Dabbagh. (2013): The relationship between acute myocardial infarction and periodontitis. *Caspian Journal of Internal Medicine*. 4: 667-671.
56. S. Arvikar, D. Collier, M. Fisher, S. Unizony, G. Cohen, G. McHungh, T. Kawai, K. Strle, A. Steere. (2013): Clinical correlations with *Porphyromonas gingivalis* antibody responses in patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Research and Therapy*. 15: 1011-1017.
57. S. Kaur, S. White, P. Bartold. (2013): Periodontal disease and rheumatoid arthritis: a systematic review. *Journal of Dental Research*. 92: 399-408.
58. E. Marjanovic, H. Southern, P. Coates, J. Adams, T. Walsh, K. Horner, H. Devlin. (2013): Do patients with osteoporosis have an increased prevalence of periodontal disease? A cross-sectional study. *Osteoporosis International*. 24: 1973-1979.
59. V. Esfahanian, M. Shamami. (2012): Relationship between osteoporosis and periodontal disease: review of the literature. *Journal of Dentistry of Tehran University of Medical Sciences*. 9: 256-264.
60. P. Chomczynski, N. Sacchi. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*. 9: 156-162.

61. L. Chen, X. Ge, X. Wang, J. Patel, P. Xu. (2012): SpxA involved in hydrogen peroxide production, stress tolerance and endocarditis virulence in *Streptococcus sanguinis*. Public Library of Science One 7: 40034-10.
62. G. Gutiérrez, C. Bando. (2010): The flavonoids luteolin and quercetagenin inhibit lipoteichoic acid actions on H9c2 cardiomyocytes. International Immunopharmacology. 10: 1003-1009.
63. M. Reza, S. Saman, A. Nazari. (2013): Simultaneous isocratic separation of phenolic acid and flavonoids using micellar liquid chromatography. Journal of Separation Science. 10: 1-6.
64. O. Alonso. (2012): Efecto de la miricetina sobre la expresión de COX-2 y síntesis de IL-1 β en fibroblastos gingivales humanos (HGF) estimulados con ácido lipoteicoico (LTA) obtenido de *Streptococcus sanguinis*. Facultad de Odontología, UNAM. México.
65. H. Fukushima, A. Matsumoto, W. Wei. (2012): SCF^{Fbw7} modulates the NF κ B signaling pathway by targeting NF κ B2 for ubiquitination and destruction. Cell Reports. 1: 434-443.
66. B. Ren, C. Fang, H. Yun, W. Pei, S. Suo, C. Rei, C. Lin, W. Lan, D. Yuu. (2013): Interaction of inflammatory and anti-inflammatory responses in microglia by *Staphylococcus aureus*-derived lipoteichoic acid. Toxicology and Applied Pharmacology. 296: 43-50.
67. G. Gutiérrez, A. Contreras. (2013): Luteolin and fisetin inhibit the effects of lipopolysaccharide obtained from *Porphyromonas gingivalis* in human gingival fibroblasts. Molecular Biology Reports. 40: 477-485.
68. S. Jyh, H. Chieh, C. Tzu, M. Shyan, B. Chang, Y. Chong, W. Ta, C. Huang. (2005): Lipoteichoic acid induces nuclear factor- κ B activation and nitric oxide synthase expression via phosphatidylinositol 3-kinase, AKT and p38 MAPK in RAW 264.7 macrophages. Immunology. 115: 366-374.
69. Q. Liu, X. Chen, G. Yang, X. Min, M. Deng. (2011): Apigenin inhibits cell migration through MAPK pathways in human bladder smooth muscle cells. Biocell. 5: 71-79.

70. M. Funakoshi, K. Nakamura, K. Tago, T. Mashino, T. Kasahara. (2011): Anti-inflammatory activity of structurally related flavonoids, apigenin, luteonin and fisetin. *International Immunopharmacology*. 11: 1150-1159.
71. W. Jiunn, W. Kang, C. Jong, W. Lung, T. Hwa. (2008): Apigenin inhibits HGF-promoted invasive growth and metastasis involving blocking PI3K/AKT pathway and β 4 integrin function in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Science Direct*. 226: 178-191.
72. Y. Chool, J. Hwang, M. Sykes, B. Michell, B. Kemp, H. Lum, H. Jo. (2002): Shear stress stimulates phosphorylation of eNOS at Ser⁶³⁵ by a protein kinase A dependent mechanism. *American Journal of Physiology*. 283: 1819-1828.
73. N. Dmitrieva, M. Timofeev, N. Briko. (2007): Lipoteichoic and teichoic acids of pathogenic streptococci: structure, functions, and role interaction of the infectious agent with organism. *Immunobiology*. 6: 100-107.
74. G. Saeng, S. Hoon, S. Nyum, Y. Chul, E. Cheol. (2009): Anti-inflammatory effects of apigenin on nicotine and lipopolysaccharide-stimulated human periodontal ligament cells via heme oxygenase-1. *International Immunopharmacology*. 9: 1374-1380.
75. H. Fernández, P. Tornos. (2013): Epidemiology of infective endocarditis in Spain in the last 20 years. *Revista Española de Cardiología*. 66: 728-733.
76. S. Varini, D. Ferrante. (2002): Consenso de endocarditis infecciosa: comisión de diagnóstico y evaluación. *Revista Argentina de Cardiología*. 70: 1-12.
77. M. Bradford. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.