



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

MODULACIÓN DEL FLAVONOIDE NARINGINA
EN VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULARES
INDUCIDAS POR LTA EN UNA LÍNEA CELULAR
DE CARDIOMIOCITOS H9C2

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACEÚTICA BIOLÓGA
P R E S E N T A
MARÍA FERNANDA OSTOA PÉREZ



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: REBECA ELIZABETH FRANCO Y BOURLAND

VOCAL: ROGELIO GREGORIO PEREDA MIRANDA

SECRETARIO: GLORIA GUTIÉRREZ VENEGAS

1ER. SUPLENTE: ENRIQUE ORTEGA SOTO

2° SUPLENTE: VANESSA REBECA MAYA AMPUDIA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN. FACULTAD DE ODONTOLOGÍA.
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.**

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Gloria Gutiérrez Venegas

SUSTENTANTE:

María Fernanda Ostoa Pérez

La realización del presente proyecto fue financiado por PAPIIT IN209412.

Gracias...

A la Universidad Nacional Autónoma de México

Porque durante mi estancia en ella he aprendido tanto, cosas académicas dentro de sus aulas y experiencias de vida fuera de ellas. Gracias a la Facultad de Química por darme las bases académicas para alcanzar una importante meta de vida. Gracias por ser mi segunda casa, siempre estaré orgullosa de pertenecer a ella.

A la Dra. Gloria Gutiérrez Venegas

Por abrirme las puertas de su laboratorio, por la confianza que depositó en mí, por guiarme en la realización de este proyecto, por ayudarme a alcanzar esta meta y sobre todo por sus consejos, tanto académicos, como personales. Con cariño para usted.

A mis papás, Alejandro y Marisela

Por guiarme a lo largo de toda mi vida, por enseñarme tantas cosas que me hacen ser cada día una mejor persona, por su amor incondicional, por su admirable paciencia, por su infinito apoyo, por sus consejos que siempre me son útiles, por confiar en mí y por ayudarme a levantar cuando he caído. Gracias por haberme dado la oportunidad de estudiar y por motivarme siempre a alcanzar esta importante meta en mi vida. ¡Al fin lo logramos! GRACIAS. Concluir esta etapa es una manera de retribuirles la gran labor que han hecho como padres. Los amo mucho.

A mis hermanos, Alexo y David

Por ser mis cómplices de vida, por enseñarme tantas cosas, por su apoyo en cada momento, por la confianza que existe entre nosotros, por hacerme feliz siempre que lo necesito y por alentarme a alcanzar esta meta. Gracias por existir. Los amo con todo mi corazón. Nanda

A mi mejor amigo, Manu

Amigo después de 65788392 experimentos fallidos lo logramos. Gracias por tu invaluable apoyo en cada momento, por estar siempre conmigo, por tu sinceridad, por tu gran amistad, por tantas experiencias que hemos compartido y sobre todo por permitirme concluir esta etapa a tu lado. Te adoro.

A Cris

Por ser una parte esencial en la conclusión de este proyecto. Gracias por tu incondicional apoyo y ayuda en cada instante. Fue una fortuna haberte encontrado en el laboratorio, pero lo fue más haberte incluido en mi vida. Gracias por brindarme tu amistad, espero que perdure mucho tiempo. Y gracias por hacerme inmortal, recuerda que 15 minutos de risa diarios alargan un día más tu vida. Te quiero mucho mucho.

A Joel

Por constituir un gran apoyo durante este tiempo. Sin ti hubiera sido más complicado lograrlo. Gracias. Con mucho amor para ti.

A Cecilio, Zeltzin, Jairo, Mónica y Diana

Por brindarme su apoyo y amistad durante mi estancia en el laboratorio. Sin duda, son una parte importante de este proyecto.

A Juan

Gracias por todo. Te quiero

A Elías

Por ser alguien importante en mi vida. Ahora nuestros caminos van en direcciones diferentes, pero mientras coincidieron, vivimos muchas experiencias y aprendimos juntos, es por ello, que hoy me siento feliz de compartir contigo un logro más. Gracias por tu apoyo cuando más lo he necesitado. Con cariño para ti.

A mis papás y hermanos, con toda mi admiración y amor.

A mi abuelita Petra, con todo mi amor e infinito agradecimiento.

A Diego†, un gran amigo y ser humano, con todo mi cariño.

A mi abuelito Perico †, con todo mi amor, donde quiera que te encuentres.

ÍNDICE

1.	RESUMEN	1
2.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	2
3.	ANTECEDENTES	3
3.1.	Periodonto	3
3.1.1.	Encía	3
3.1.2.	Cemento	4
3.1.3.	Ligamento periodontal	6
3.1.4.	Hueso Alveolar	7
3.2.	Placa dentobacteriana	7
3.3.	Enfermedad periodontal	10
3.3.1.	Clasificación de enfermedades periodontales.	11
3.4.	Efecto de las enfermedades periodontales sobre la salud sistémica.	11
3.4.1.	Asociación entre enfermedad periodontal y enfermedad cardiovascular.....	13
3.5.	Endocarditis Infecciosa	14
3.5.1.	Definición	14
3.5.2.	Epidemiología	14
3.5.3.	Etiología	15
3.5.4.	Patogénesis	16
3.5.5.	Patofisiología	20
3.5.6.	Manifestaciones clínicas.....	21
3.5.7.	Diagnóstico	21
3.5.8.	Tratamiento.....	22
3.5.9.	Prevención.....	23
3.6.	Sistema inmune.....	23
3.7.	Receptores semejantes a Toll	24
Tabla 1.	Criterios Duke modificados para el diagnóstico de la EI	21
3.7.1.	TLR 2	26
3.8.	Ácido lipoteicoico	27
3.9.	Vía de señalización.	28
3.9.1.	Proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPKs).....	29
3.10.	Flavonoides	31
3.10.1.	Clasificación.....	32
3.10.2.	Biosíntesis	33
3.10.3.	Propiedades biológicas.	34
Tabla 2.	Ligandos de los diferentes TLRs	25

3.11.	Naringina	36
3.11.1.	Propiedades biológicas.	36
4.1.	Objetivo general	37
4.2.	Objetivos específicos	37
5.	HIPÓTESIS	38
6.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
6.1.	Población de estudio.....	39
6.2.	Tamaño de la muestra	39
6.3.	Metodología.....	39
6.3.1.	Cultivo celular	39
6.3.2.	Tratamiento celular	39
6.3.3.	Viabilidad celular	39
6.3.4.	Western-blot	40
6.3.5.	Extracción de ARN total.	41
6.3.6.	Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa punto final (RT-PCR).....	41
6.3.7.	Inmunocitoquímica.	42
6.3.8.	Análisis estadístico.	42
7.	RESULTADOS.....	43
7.1.	Efecto de la naringina sobre la viabilidad celular en células H9c2.....	43
7.2.	Efecto de la naringina en la vía de señalización de las MAPK activadas por el estímulo de LTA en células H9c2.....	43
7.3.	Efecto de la naringina sobre la translocación nuclear de NF- κ B.....	46
7.4.	Efecto de la naringina sobre la expresión de IL-1 β	48
8.	DISCUSIÓN	49
9.	CONCLUSIÓN	52
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del diente y periodonto. 3

Figura 2. Modelo de formación de la placa dentobacteriana y proceso de congregación. 9

Figura 3. Colonización bacteriana del endotelio valvular. 20

Figura 4. Estructura del TLR. 26

Figura 5. Estructura del ácido lipoteicoico. 27

Figura 6. Vía de señalización dependiente de MyD88. 30

Figura 7. Estructura química de los flavonoides. 32

Figura 8. Clasificación de los flavonoides 32

Figura 9. Biosíntesis de los flavonoides..... 33

Figura 10. Estructura de la naringina. 36

Figura 11. Efecto de la naringina sobre la viabilidad celular de células H9c2.. 43

Figura 12. Efecto de la naringina sobre la fosforilación de ERK inducida por ácido lipoteicoico..
..... 44

Figura 13. Efecto de la naringina sobre la fosforilación de p38 inducida por ácido lipoteicoico..
..... 45

Figura 14. Efecto de la naringina sobre la fosforilación de JNK inducida por ácido lipoteicoico..
..... 46

Figura 15. Efecto de la naringina sobre la activación de NF- κ B por ácido lipoteicoico mediante
ensayo de inmunocitoquímica..... 47

Figura 16. Efecto de la naringina sobre la expresión de IL-1 β inducida por ácido lipoteicoico.. 48

ABREVIATURAS

AAP	Academia Americana de Periodoncia
ABIN2	proteína A20 inhibidora de la activación de NF- κ B
ADN	ácido desoxirribonucleico
AP-1	proteína activadora-1
ARN	ácido ribonucleico
CHI	chalcona isomerasa
CHS	chalcona sintetasa
CoA	Coenzima-A
COX-2	ciclooxigenasa 2
D.E.	desviación estándar
DD	dominio de muerte
dsARN	ARN de cadena doble
E2	enzima conjugadora de ubiquitina
E3	ubiquitina ligasa
EI	endocarditis infecciosa
ERK	cinasa activada por señales extracelulares
ETNB	endocarditis trombótica no bacteriana
FT	factor tisular
GAPDH	gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
HMGB1	proteína de alta movilidad del grupo b1
ICAM-1	molécula de adhesión intracelular 1
IKK $\alpha/\beta/\gamma$	cinasa de I κ B alfa/beta/gamma
IL-1 β	interlucina-1 beta
IL-6	interlucina-6
IL-8	interlucina-8
iNOS	óxido nítrico sintasa inducible
IRAK-4	cinasa asociada al receptor de IL-1, 4
I κ B	inhibidor de NF- κ B
JNK	cinasa c-jun N-terminal
K63	lisina 63
LPS	lipopolisacárido
LRR	repeticiones ricas en leucina
LRR-CT	repeticiones ricas en leucina C-terminal
LRR-NT	repeticiones ricas en leucina N-terminal
LTA	ácido lipoteicoico
Mal	adaptador similar a MyD88
MAPK	proteína cinasa activada por mitógenos
MAPKK	cinasa MAPK
MAPKKK	cinasa cinasa MAPK
mARN	ARN mensajero
MHC	complejo mayor de histocompatibilidad
MIP-1	proteína inflamatoria de macrófagos-1
MSCRAMMS	componentes microbianos superficiales reconocedores de moléculas adherentes de la matriz

MTT	bromuro de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio
MyD88	proteína de diferenciación mieloide 88
NEMO	modulador esencial de NF- κ B
NF- κ B	factor nuclear kappa
NLR	receptores tipo nod
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAAP	proteína asociada a la agregación plaquetaria
PAL	L-fenilalanina amonio liasa
PAMP	patrones moleculares asociados a patógenos
p-ERK	cinasa activada por señales extracelulares fosforilada
PGE2	prostaglandinas E2
PGP	Poliglicerolfosfato
p-JNK	cinasa c-jun N-terminal fosforilada
PKC	proteína cinasa C
PMP	proteínas microbicidas plaquetarias
Poly (I:C)	ácido policitidílico polinosínico
RT-PCR	reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
SNC	sistema nervioso central
ssARN	ARN de cadena sencilla
TAB	proteína de unión a TAK
TAK1	cinasa activada 1 del factor de crecimiento transformante - β
TIR	receptor Toll/interlucina-1
TIRAP	proteína adaptadora con dominio TIR
TLR 2	receptor semejante a toll 2
TNF- α	factor de necrosis tumoral-alfa
TPL2	tumor progression locus 2
TRAF-6	factor asociado al receptor de TNF, 6
Ub	Ubiquitina
UFC	unidades formadoras de colonias

1. RESUMEN

Investigaciones recientes, fundamentadas en estudios epidemiológicos, sostienen que una infección local dental, como la periodontitis, incrementa el riesgo de presentar una infección crónica sistémica, por ejemplo, la endocarditis infecciosa, que se desarrolla como resultado de la diseminación por vía hematológica de bacterias de la flora bucal, a causa de cualquier alteración en la integridad física del epitelio subgingival. Aproximadamente el 50% de los casos de endocarditis son causados por *Streptococcus sanguinis*, colonizador primario de la placa dentobacteriana. La superficie de *Streptococcus sanguinis* contiene ácido lipoteicoico (LTA), que al ser reconocido por el receptor transmembranal semejante a Toll 2 (TLR 2) desencadena mecanismos de transducción como la activación de la familia de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y la activación del factor de transcripción nuclear kappa B (NF- κ B), vías de señalización que conducen a la liberación de citocinas proinflamatorias y otros mediadores de la inflamación. Por otra parte, la naringina es un flavonoide presente en frutas cítricas, con propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, anticancerígenas, antibacteriales, así como propiedades antihipertensivas. En el presente trabajo se estudió el efecto del flavonoide naringina sobre la señalización intracelular inducida por LTA en la línea celular de cardiomiocitos de rata neonatal (H9c2). Se realizaron ensayos dosis-respuesta dependiente de naringina mediante Western-blot para caracterizar la activación de las proteínas MAPKs, ensayos de RT-PCR de punto final para analizar la expresión de la interleucina-1 β y un ensayo de inmunocitoquímica para analizar el efecto de naringina en la translocación nuclear de NF- κ B. La fosforilación de proteínas MAPKs (ERK, p38 y JNK) así como la expresión de IL-1 β y la translocación nuclear de NF- κ B, son mediadas por LTA en células H9c2 y éstas se inhiben con el tratamiento del flavonoide naringina de manera dependiente de la dosis. Se demostró que la naringina presenta actividad antiinflamatoria *in vitro*, disminuyendo la activación de dos vías de señalización involucradas en el proceso inflamatorio y eventualmente, puede conducir al desarrollo de una nueva clase de agentes antiinflamatorios de origen natural.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las enfermedades cardiovasculares constituyen la primera causa de mortalidad en México. Dentro de este amplio rubro de enfermedades se encuentra la endocarditis infecciosa (EI) que es un padecimiento altamente relacionado con la enfermedad periodontal. Durante el desarrollo de la EI algunos de los factores que contribuyen a la patofisiología de la misma, como la producción de citocinas pro-inflamatorias, están asociados con la respuesta inmunitaria que se desencadena por parte de las células del hospedero ante el reconocimiento de microorganismos patógenos, particularmente, de estructuras específicas como el LTA de bacterias Gram-positivo.

Con la finalidad de regular el proceso inflamatorio que se desarrolla durante la respuesta inmunitaria, y conseguir una disminución en la presentación de efectos secundarios adjuntos a los fármacos sintéticos, se han buscado alternativas de origen natural como son el empleo de flavonoides, compuestos polifenólicos, producto del metabolismo secundario de plantas, que presentan una amplia variedad de actividades biológicas, incluyendo acciones antiinflamatorias y antioxidantes (1–3).

En este sentido, existen publicaciones sobre el mecanismo de acción del lipopolisacárido (LPS) en la inducción de la respuesta inflamatoria y su regulación por flavonoides (4–7). Sin embargo, hay poca evidencia acerca de la regulación que pueden ejercer los flavonoides en las señales intracelulares inducidas por LTA.

Por lo tanto, el presente trabajo tiene el objetivo de estudiar y caracterizar la regulación del flavonoide naringina en la transducción de señales ante la presencia de LTA en cardiomiocitos de la línea celular H9c2, particularmente en la vía de las MAPKs.

3. ANTECEDENTES

3.1. Periodonto

El término periodonto surge de la palabra griega περί (peri) "alrededor" y ὀδούς (odonto) "diente"(8). El periodonto es la unidad funcional de tejidos de inversión y de soporte del diente, se divide en unidad gingival y unidad periodontal y se compone de los siguientes tejidos:

- 1) Encía
- 2) Cemento
- 3) Ligamento periodontal
- 4) Hueso alveolar

La encía pertenece a la unidad gingival y el hueso alveolar, cemento y ligamento periodontal conforman la unidad periodontal.

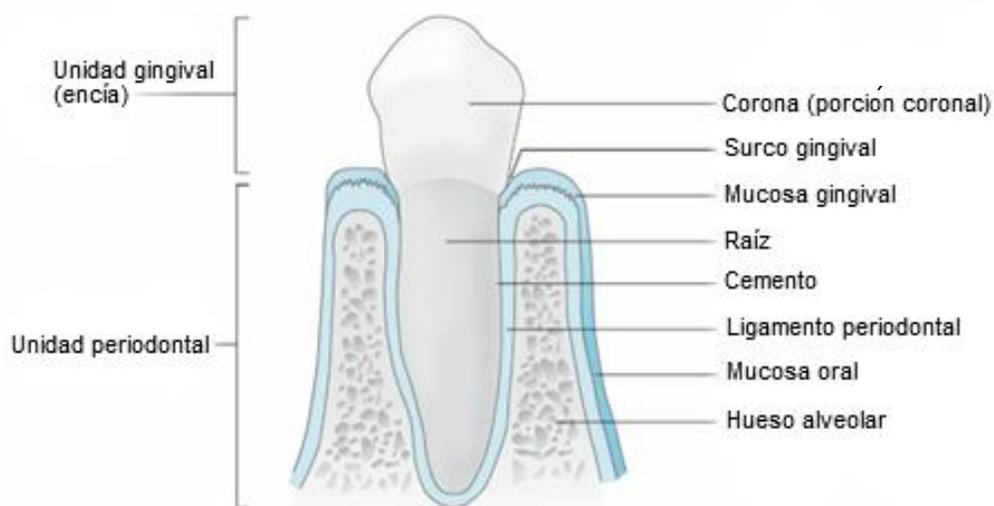


Figura 1. Estructura del diente y periodonto. (Kenneth S, et al., 2007)

3.1.1. Encía

La encía es la parte de la mucosa oral (mucosa masticatoria) que cubre el hueso alveolar de los maxilares y rodea el cuello de los dientes. Su principal función es proteger los tejidos circundantes frente al entorno bucal. Anatómicamente, se divide en encía marginal o libre, encía insertada y encía inderdental.

Histológicamente, la encía se compone de un núcleo central de tejido conectivo cubierta por un epitelio escamoso estratificado. Existen tres tipos de epitelio en la encía: epitelio oral o externo, epitelio sulcular y epitelio de unión, cada uno de los cuales está presente en diferentes áreas de la encía y realiza funciones específicas (9).

- El epitelio oral cubre la cresta, la superficie externa de la encía marginal y la superficie de la encía insertada. Es un epitelio queratinizado, contiene cuatro diferentes capas de células: capa basal, capa espinosa, capa granular y capa de células queratinizadas. Su principal función es proporcionar una barrera mecánica impermeable a fluidos y bacterias.
- El epitelio sulcular cubre el surco gingival. Es un epitelio escamoso estratificado no queratinizado.
- El epitelio de unión, junto con las fibras gingivales, forman la unidad dentogingival que proporciona unión al diente, además de proporcionar una defensa contra microorganismos. Es un epitelio escamoso estratificado no queratinizado.

El epitelio no queratinizado contiene células claras, que incluyen melanocitos, células de Langerhans, células de Merkel y linfocitos.

3.1.2. Cemento

Es un tejido avascular mesenquimal calcificado que forma la cubierta externa de la raíz anatómica (Figura 1). Proporciona unión de las fibras de colágeno del ligamento periodontal a la raíz; funciona como sello de los túbulos dentinarios abiertos previniendo la sensibilidad dental; ayuda en el mantenimiento de los dientes en oclusión funcional, y contribuye al proceso de reparación después de daño a la superficie de la raíz (10).

El cemento está formado por células y por una matriz extracelular calcificada. Las principales células son los cementoblastos y los cementocitos. La matriz extracelular del cemento se compone tanto de materia orgánica como de materia

inorgánica. La matriz orgánica se compone principalmente de colágeno tipo I (90%), colágeno tipo III (5%), proteínas no colágenas (fibronectina, osteopontina, osteocalcina, fosfatasa alcalina y osteonectina), molécula de adhesión (proteína de unión al cemento), factor de crecimiento similar a insulina, glicosaminoglicanos y glicoproteínas (sustancia fundamental). La matriz inorgánica constituye 46% y está compuesto principalmente de fosfato de calcio en forma de cristales de hidroxiapatita (10,11).

Existen dos clases de fibras de colágeno, las fibras de Sharpey's (extrínsecas) producidas por los fibroblastos y las fibras pertenecientes a la matriz del cemento (intrínsecas) producidas por los cementoblastos.

El cemento se clasifica en:

1. De acuerdo a su localización:
 - i. Cemento radicular.
 - ii. Cemento coronal.
2. De acuerdo a las células presentes:
 - i. Cemento acelular (primario). Se integra durante la formación de raíces, cubre aproximadamente la mitad de la raíz, y no contiene cementocitos.
 - ii. Cemento celular (secundario). Se forma después de que el diente ha alcanzado el plano oclusal. Contiene cementocitos en espacios individuales.
3. De acuerdo a las fibras presentes:
 - i. Cemento afibrilar acelular. Se compone únicamente de sustancia mineralizada. No hay fibras de colágeno ni células. Forman el cemento coronal.
 - ii. Cemento fibrilar extrínseco acelular. Consiste únicamente en fibras de Sharpey's.
 - iii. Cemento estratificado mixto celular. Contiene fibras extrínsecas e intrínsecas, así como células.

- iv. Cemento fibrilar intrínseco celular. Contiene fibras secretadas por cementoblastos.
- v. Cemento intermedio. Es una zona mal definida cerca de la unión cemento-dentinal. Ayuda en la unión del cemento a la dentina.

3.1.3. Ligamento periodontal

El ligamento periodontal es un tejido conectivo blando presente entre el cemento y el hueso alveolar (Figura 1). Une al diente con el hueso alveolar y absorbe la carga mecánica que se aplica durante la masticación. Se compone de haces de colágeno, denominadas fibras principales del ligamento periodontal, de componentes celulares y de sustancia fundamental.

Las fibras principales se dividen de la siguiente manera, de acuerdo a su localización y dirección de unión (11,12):

- Grupo transeptal. Son importantes para el mantenimiento de la disposición espacial de los dientes.
- Grupo de cresta alveolar. Resisten las fuerzas extrusivas.
- Grupo horizontal. Resisten las fuerzas masticatorias a las que se somete el diente.
- Grupo oblícuo. Resisten las fuerzas de torsión y evitan movimientos laterotrusivos.
- Grupo apical. Resisten las fuerzas intrusivas.
- Grupo interradicular. Refuerzan el anclaje al hueso.

Los elementos celulares presentes en el ligamento periodontal son los fibroblastos, osteoblastos, cementoblastos (células de síntesis), osteoclastos, cementoclastos (células de resorción), restos epiteliales de Malassez, macrófagos y mastocitos. La sustancia fundamental conforma el constituyente principal del ligamento periodontal. Está compuesto de glicosaminoglicanos y glicoproteínas.

3.1.4. Hueso Alveolar

El hueso alveolar es un tejido conectivo especializado que se caracteriza principalmente por su matriz mineralizada. Es la parte del maxilar y la mandíbula que forma y apoya la cavidad del diente (alveolos dentales) (Figura 1). Junto con el cemento y el ligamento periodontal, el hueso alveolar constituye el aparato de fijación de los dientes. Su principal función es distribuir y reabsorber las fuerzas generadas por la masticación y por otros contactos dentarios (11,13).

Anatómicamente, se divide en:

- Hueso alveolar adecuado. Es una delgada lámina de hueso que rodea la raíz del diente y proporciona unión a las fibras principales del ligamento periodontal.
- Hueso alveolar de soporte. Rodea al hueso alveolar adecuado y da soporte a los alveolos. Se compone de placas corticales y hueso esponjoso.

El hueso alveolar está constituido por componentes celulares y matriz extracelular. Las células presentes en el hueso alveolar son osteoblastos, osteoclastos y osteocitos. La matriz extracelular está compuesta en un 65% por materia inorgánica y 35% por materia orgánica. La parte inorgánica se compone de minerales como calcio, fosfato e hidroxilo, carbonato, citrato y cantidades traza de otros iones, los cuales se encuentran en forma de cristales de hidroxiapatita. La matriz orgánica se compone de 90% de colágeno tipo I con pequeñas cantidades de proteínas no colágenas tales como osteocalcina, osteonectina, osteopontina y sialoproteína ósea.

3.2. Placa dentobacteriana

En 1978 la OMS definió a la placa dentobacteriana como una entidad estructural específica pero muy variable, resultado de la colonización y el crecimiento de microorganismos en las superficies de los dientes, y que consiste en numerosas especies y cepas microbianas embebidas en una matriz extracelular (14).

Estructuralmente, la placa dental se considera como una biopelícula de una comunidad microbiana compleja y dinámica. Contiene zonas de alta y baja biomasa bacteriana entrelazada con canales acuosos, que son el medio de nutrientes para la colonización bacteriana (15).

Con base en su localización, la placa dental se clasifica en supragingival y subgingival. La placa supragingival se encuentra en las superficies dentales, en la encía marginal o por encima de ésta. La placa subgingival se encuentra por completo dentro del surco gingival o de los sacos periodontales.

La placa dental está compuesta por microorganismos y una matriz intercelular. Las bacterias constituyen aproximadamente el 70-80 % del material total. Se estima que 1 mg de placa dental contiene 250 millones de bacterias (15). Además de bacterias, pueden estar presentes hongos, protozoarios y virus.

La formación de la placa dental es el resultado de una serie de procesos complejos que involucran una variedad de bacterias y componentes de la cavidad bucal del hospedero. Estos procesos comprenden en primer lugar la formación de la película adquirida sobre la superficie del diente; seguido de la colonización por microorganismos específicos adheridos sobre la película adquirida; y finalmente la formación de la matriz de la placa (Figura 2).

La primera etapa en la formación de la placa implica la adsorción de proteínas salivales a las superficies del diente para formar la película adquirida. La película está compuesta de una variedad de glicoproteínas salivales (mucinas) que son derivadas de la saliva, fluido crevicular, tejidos celulares del hospedero y de bacterias. La película altera la carga y la energía libre de la superficie del diente, que a su vez incrementa la eficacia en la adhesión bacteriana (14,15).

La colonización comienza con los colonizadores primarios que son microorganismos facultativos Gram-positivo (*Actinomyces viscosus* y *Streptococcus sanguinis*), los cuales se adhieren variablemente a la película recubriendo la superficie del diente y constituyen, principalmente, la placa

supragingival. Conforme la placa dental madura, la colonización secundaria se lleva a cabo. Los colonizadores secundarios son *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* y *Capnocytophaga sp.*, y llevan a cabo el proceso de congregación, que es la capacidad de las bacterias para adherirse a diferentes especies y géneros; estas bacterias constituyen, esencialmente, la placa dental subgingival (Figura 2).

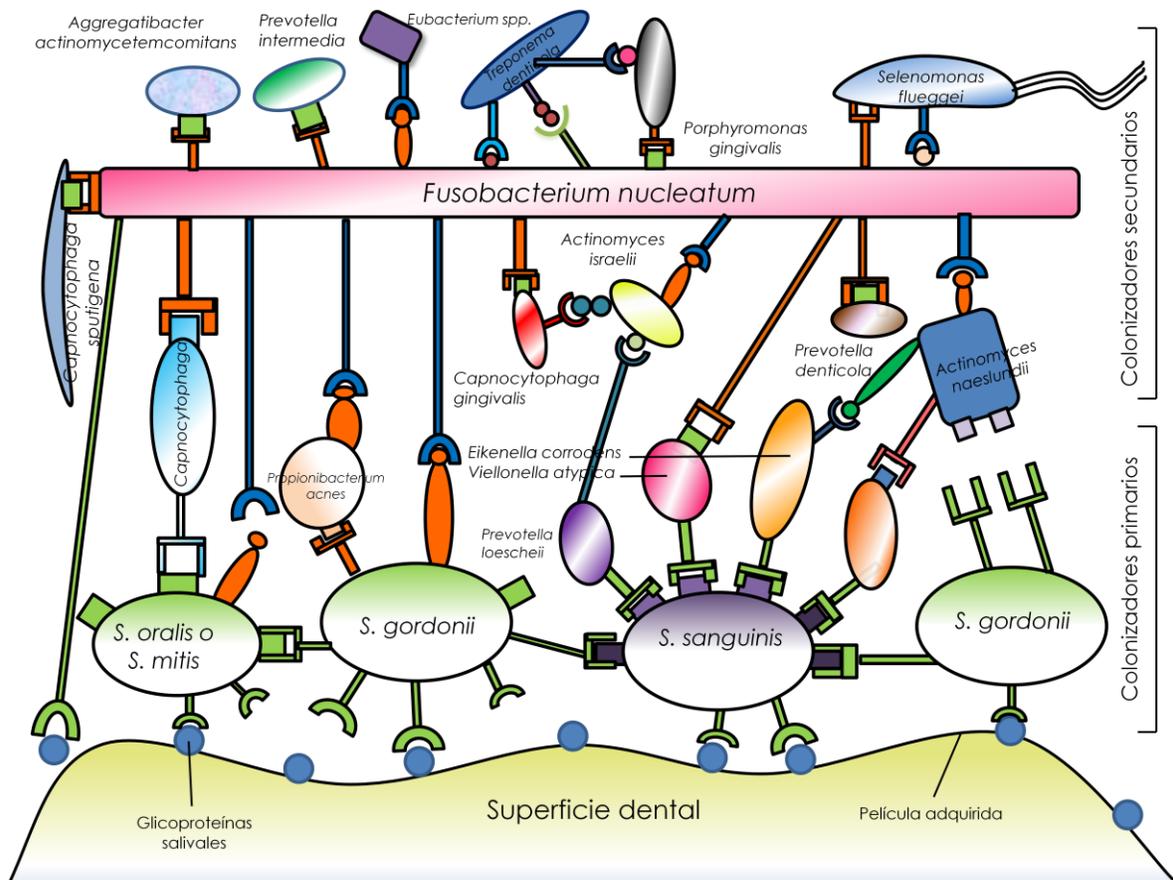


Figura 2. Modelo de formación de la placa dentobacteriana y proceso de congregación. (Bakatetz L, 2004)

Después de la colonización se forma la matriz intercelular, la cual está constituida a su vez por productos bacterianos, células (epiteliales, macrófagos y leucocitos), materiales orgánicos (polisacáridos, proteínas, y glucoproteínas) e inorgánicos (calcio, fósforo, potasio y sodio) derivados de la saliva o del líquido del surco

gingival. Esta matriz forma un gel hidratado donde proliferan las bacterias y se producen las interacciones metabólicas entre las diferentes especies.

Se reconoce a la placa bacteriana como el principal agente etiológico en las enfermedades periodontales. De las 400 diferentes especies que son capaces de colonizar la boca, sólo 9 se consideran como periodontopatógenas; *S. sanguinis* no es una de ellas; sin embargo, al ser el primer colonizador de la placa dentobacteriana favorece el desarrollo de enfermedades periodontales al contribuir como sujeción de otros microorganismos. Los mecanismos patogénicos por los cuales los microorganismos de la placa dental pueden causar enfermedad periodontal incluyen: adhesión y colonización, invasión de los tejidos del hospedero, evasión bacteriana de los mecanismos de defensa del hospedero y/o liberación de sustancias tóxicas e inflamatorias (15,16).

3.3. Enfermedad periodontal

Las enfermedades periodontales son un grupo de enfermedades inflamatorias e infecciosas bacterianas que afectan los tejidos de soporte de los dientes (17,18).

Para el desarrollo de las enfermedades periodontales hay dos aspectos que juegan un papel trascendental, por un lado, los factores predisponentes del hospedero (como la falta de higiene oral, edad, factores sistémicos como el tabaco, diabetes, predisposición genética, alteración de las defensas, etc.) y, por otro lado, los factores que influyen en la periodontopatogenicidad de los microorganismos que constituyen la placa dental.

La mayoría de las enfermedades periodontales son infecciosas y se inician cuando los microorganismos de la placa dental colonizan el surco gingival y, posteriormente, la bolsa periodontal. Dichos microorganismos y sus metabolitos provocan una respuesta inflamatoria, principalmente con fines de defensa, sin embargo, en última instancia, resulta en la destrucción de tejidos periodontales por activación de la síntesis y liberación de citocinas, mediadores proinflamatorios y metaloproteinasas de la matriz (19,20).

3.3.1. Clasificación de enfermedades periodontales(21).

La Academia Americana de Periodoncia (AAP), a finales de 1999 en la ciudad de Oak Brook, Illinois, formó un comité encargado de clasificar las enfermedades periodontales. Fue en el *International Workshop for a Clasification of Periodontal Diseases and Conditions* cuando se aprueba la clasificación propuesta por dicho comité, proporcionando nuevos parámetros para unificar universalmente las diferentes entidades que se presentan en la enfermedad periodontal, quedando clasificadas de la siguiente manera:

- I. Enfermedades gingivales
- II. Periodontitis crónica
- III. Periodontitis agresiva
- IV. Periodontitis como manifestación de enfermedades sistémicas
- V. Enfermedades periodontales necrotizantes
- VI. Abscesos del periodonto
- VII. Periodontitis asociada a lesiones endodónticas
- VIII. Condiciones y deformidades adquiridas o del desarrollo

3.4. Efecto de las enfermedades periodontales sobre la salud sistémica.

A lo largo de la historia el papel de las enfermedades bucales como factor de riesgo de enfermedades sistémicas ha existido. En 1900, William Hunter introdujo el concepto de infección focal, el cual se refería a la presencia de una infección en alguna parte del cuerpo, que podía afectar sitios y órganos distantes por la vía del torrente sanguíneo (22).

La investigación moderna de las infecciones orales como factor de riesgo para la enfermedad sistémica se inició con un estudio realizado en Finlandia por Mattila y colaboradores (23) donde reportaron una asociación entre enfermedades orales, pérdida de dientes y enfermedad del corazón. Esta observación fue seguida por una variedad de estudios de otras asociaciones potenciales, así como la

investigación en plausibilidad biológica de estas entidades, y la investigación de los mecanismos que podrían explicar las relaciones causales potenciales (19).

Las enfermedades periodontales implican un factor de riesgo para varias enfermedades sistémicas, a saber, enfermedades cardiovasculares, diabetes, enfermedades respiratorias y efectos adversos sobre el embarazo.

Básicamente, hay dos posibles mecanismos por los que las enfermedades periodontales pueden inducir una respuesta inflamatoria a distancia:

- Bacteremia.
- Respuesta inmune a los patógenos orales.

La bacteremia de origen bucal se define como la presencia de bacterias provenientes de la cavidad bucal en el torrente sanguíneo. La placa dentobacteriana, particularmente, la placa subgingival, es muy próxima a tejidos vascularizados. Cualquier alteración en la integridad física del epitelio subgingival podría dar lugar a bacteremia, además, es común que en una lesión periodontal, el epitelio del surco sea ulcerado y, con frecuencia, discontinuo, lo que facilita el acceso a la circulación (24).

Además de los procedimientos invasivos tales como la limpieza subgingival, la extracción dental y cirugía periodontal, que son conocidos como procedimientos que producen bacteremia transitoria, actividades diarias como el cepillado de dientes o la masticación pueden conducir a la diseminación de bacterias y productos bacterianos como LPS o LTA en el torrente sanguíneo (19,24). Las frecuencias de bacteremia reportadas para las actividades diarias son: cepillado dental (20% a 68%), masticación (7% a 51%) y uso de palillos interdentarios (20% a 40%) (25).

Las actividades orales diarias pueden provocar bacteremia, posiblemente, debido a que dichas actividades producen pequeños movimientos del diente dentro del alveolo dental causando presiones positivas y negativas intermitentes, lo que

causa que los microorganismos tengan acceso al torrente sanguíneo y de allí puedan diseminarse, e incluso instalarse, a cualquier otro órgano o tejido (24).

Por otra parte, la respuesta inmunológica del hospedero a los patógenos orales también puede explicar la asociación entre la enfermedad periodontal y otras enfermedades sistémicas. La respuesta inflamatoria resultante puede desencadenar la liberación de varias citocinas proinflamatorias y mediadores de destrucción tisular, tales como la proteína C reactiva, factor de necrosis tumoral α (TNF- α), prostaglandinas E2 (PGE2), IL-1 β e IL-6, las cuales pueden reclutar monocitos y linfocitos T a los sitios de lesión o a otros tejidos.

3.4.1. Asociación entre enfermedad periodontal y enfermedad cardiovascular.

Las enfermedades cardiovasculares son un amplio grupo de enfermedades que incluyen insuficiencia cardíaca congestiva, arritmias cardíacas, enfermedad coronaria arterial (como aterosclerosis, angina de pecho, infarto al miocardio), enfermedad cardíaca valvular y enfermedad cerebrovascular, y constituyen la primera causa de mortalidad en México.

Desde la década de los ochenta varios estudios epidemiológicos han indicado que las enfermedades periodontales son un importante factor de riesgo en las enfermedades cardiovasculares (17,18,20,24). En modelos animales, Overholser y colaboradores encontraron que una extracción dental en presencia de enfermedad periodontal promueve bacteremia causante de endocarditis, aunque la enfermedad periodontal, por sí sola, puede ser suficiente. (26).

La endocarditis infecciosa es una enfermedad incluida en el rubro de las patologías cardiovasculares (enfermedad cardíaca valvular) y junto con la aterosclerosis y la apoplejía conforman un grupo de trastornos cardiovasculares con una alta probabilidad de estar relacionados con las enfermedades periodontales.

3.5. Endocarditis Infecciosa

3.5.1. Definición

La endocarditis infecciosa es una infección microbiana de la superficie endotelial del corazón o de las válvulas cardíacas (27). El paso clave en el proceso de la endocarditis infecciosa es la adhesión de las bacterias a las válvulas cardíacas, seguido de la aparición de “*vegetaciones*”, que consisten en una masa de plaquetas, fibrina, pequeñas colonias de microorganismos y escasas células inflamatorias (17,28). La endocarditis puede clasificarse de acuerdo con la evolución temporal de la enfermedad (aguda o subaguda), el sitio de la infección (válvula nativa o válvula protésica), la causa de la infección (nosocomial, adquirida en la comunidad o por administración de drogas por vía intravenosa) o en base al agente causal.

3.5.2. Epidemiología

En países desarrollados la incidencia de endocarditis fluctúa entre 2.6 y 7.0 casos por 100,000 habitantes por año, y se incrementa drásticamente con la edad a 14.5 episodios por 100,000 personas por año, en pacientes entre 70 y 80 años. (28). En todos los estudios epidemiológicos, la proporción varones: mujeres es $\geq 2:1$. Entre el 30 y 35 % de endocarditis de válvulas nativas se encuentra vinculado a la asistencia sanitaria, entre 16 y 30 % de los casos de endocarditis abarca prótesis valvulares, sólo el 8% se asocia con un procedimiento dental o periodontal previo.(20,29,30). A pesar de los avances en el diagnóstico, la terapia antimicrobiana, las técnicas quirúrgicas y el manejo de complicaciones, los pacientes con EI aún presentan altas tasas de morbilidad y mortalidad relacionadas con esta condición. La tasa global de mortalidad se acerca al 40% (27).

3.5.3. Etiología

Del 80 al 90% de los casos de EI son debidos a estreptococos y estafilococos; no obstante, los microorganismos patógenos pueden variar dependiendo del tipo de endocarditis, en función de la forma en que fue adquirida la enfermedad y de las distintas vías de entrada del microorganismo al torrente sanguíneo; la cavidad oral, la piel y el sistema respiratorio alto son las principales vías de entrada (28,31,32).

Los estreptococos del grupo viridans, provenientes de la cavidad bucal, que incluyen a: *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus gallolyticus*, grupo SAG (*S. intermedius*, *S. anginosus* y *S. constellatus*) y especies del género *Abiotrophia* siguen siendo la causa más común de endocarditis de válvula nativa adquirida en la comunidad (28,32). De éstos, el más comúnmente aislado es *S. sanguinis* (33,34).

Streptococcus bovis y enterococos (*Enterococcus faecalis*) son habitantes normales del tracto gastrointestinal y representan del 5 al 18% de los casos de EI. *Streptococcus pneumoniae* ha disminuido en incidencia y representa en la actualidad sólo del 1 al 3% de los casos de EI. Estreptococos del grupo A raramente causan EI (32).

Los estafilococos son la causa de al menos 30-40% de los casos de EI, de los cuales el 80 al 90% se deben a *Staphylococcus aureus*. *S. aureus* causa la mayoría de los casos de EI aguda y es el patógeno más común de la EI asociada con el abuso de drogas por vía intravenosa. *Staphylococcus epidermidis* se asocia principalmente con la endocarditis de válvula protésica (28,32).

Los bacilos Gram-negativo del grupo HACEK (*Haemophilus*, *Aggregatibacter*, *Cardiobacterium*, *Eikenella* y *Kingella*) representan el 3% de los casos de EI (35). *Corinebacterium*, *Listeria monocytogenes*, lactobacilos, *Erysipelothrix rhusiopathiae* y *Bacillus spp* son causa rara de EI (31).

Los hongos, principalmente *Candida spp*, representan menos del 1% de EI. Existen otros agentes infecciosos de EI que no crecen en cultivos de sangre y requieren pruebas serológicas o amplificación de genes para su identificación: *Coxiella burnetii*, *Tropheryma whippelii*, o *Rochalimaea spp*. (31,35).

3.5.4. Patogénesis

El desarrollo de la EI es el resultado de una serie de interacciones complejas de varios factores que implican, el endotelio valvular, mecanismos hemostáticos, características anatómicas cardíacas, las propiedades de la superficie, la producción de enzimas y toxinas de los microorganismos y, la respuesta inmune del hospedero.

3.5.4.1. Endotelio valvular

El endotelio valvular normal es resistente a la colonización e infección por bacterias circulantes. Sin embargo, cualquier alteración mecánica del endotelio resulta en la exposición de las proteínas de la matriz extracelular subyacente, la producción de factor tisular (FT) y la deposición de fibrina y plaquetas en la superficie del endotelio como un proceso de curación normal, originando la formación de un trombo, proceso que recibe el nombre de endocarditis trombótica no bacteriana (ETNB), el cual facilita la adherencia bacteriana y la infección (Figura 3).

El daño endotelial puede ser origen de las lesiones mecánicas causadas por flujo sanguíneo turbulento, tal como el flujo de una cámara de alta presión a una de baja presión o el flujo a gran velocidad que pasa a través de un orificio reducido en su luz, electrodos o catéteres, inflamación, como en la carditis reumática, o cambios degenerativos en ancianos que están asociados a inflamaciones, microúlceras y microtrombos (27,30).

La inflamación endotelial sin lesiones valvulares también puede facilitar la EI. La inflamación local hace que las células endoteliales expresen diversas moléculas, incluyendo integrinas de la familia β_1 (30). Las integrinas son receptores

heterodiméricos fundamentales en la migración celular que controlan las interacciones intercelulares y célula-matriz extracelular. La subfamilia β_1 se encuentra expresada fundamentalmente en los leucocitos, pero tiene una amplia distribución tisular, pudiendo expresarse en plaquetas, células endoteliales, células epiteliales, fibroblastos y linfocitos (36).

Las integrinas de la familia β_1 unen fibronectina circulante a la superficie endotelial, mientras que algunos microorganismos portan proteínas de unión para fibronectina en su superficie. Por lo tanto, cuando las células endoteliales activadas unen la fibronectina, proporcionan una superficie adhesiva para los estafilococos circulantes.

3.5.4.2. Bacteremia transitoria

Como ya se ha mencionado anteriormente, la aparición de la bacteremia transitoria puede deberse tanto a un procedimiento dental como a alguna actividad cotidiana. Tales bacteremias suelen ser de corta duración y de baja calidad (1 a 100 UFC /mL de sangre con duración de 10 minutos, en el caso de la extracción dental); sin embargo, la frecuencia e intensidad se cree que están relacionadas a la naturaleza y la magnitud de la lesión del tejido periodontal, a la densidad de la flora microbiana y al grado de inflamación o infección del endotelio o de las válvulas cardíacas (37,38).

3.5.4.3. Adherencia bacteriana

Los patógenos clásicos de la EI (*S. aureus*, *Streptococcus spp* y *Enterococcus spp.*) comparten la capacidad de adherirse a las válvulas dañadas, provocar actividad procoagulante local, internalizarse y reproducirse dentro de las vegetaciones.

La adhesión al ETNB o al endotelio lesionado está mediada por moléculas en la superficie de los microorganismos, que en conjunto se denominan componentes microbianos superficiales reconocedores de moléculas adherentes de la matriz (MSCRAMMS), las cuales interactúan específicamente con componentes de la

matriz extracelular del hospedero, y reconocen fibronectina, fibrinógeno/fibrina, colágeno y polisacáridos relacionados con heparina (39,40).

Como ya se mencionó, las integrinas de la familia β_1 unen fibronectina circulante a la superficie endotelial, facilitando de este modo la adherencia del agente infeccioso a la vegetación. Los MSCRAMMS se han descrito en la superficie de *S. aureus*, estreptococos viridans, *Streptococcus pneumoniae*, el grupo A, C y G de estreptococos y *Candida albicans* (41). Por ejemplo, la proteína F1/Sfbl se encuentra en la superficie de los estreptococos y media la adherencia a las células del hospedero al unir fibronectina, lo que a su vez inicia el proceso de absorción que conlleva a la internalización dentro de las células del endotelio valvular (42).

Después de la colonización de la válvula, los microorganismos que infectan deben sobrevivir y evitar las defensas del hospedero. Un acontecimiento clave en este proceso es la maduración de la vegetación. Tanto estafilococos como estreptococos pueden activar monocitos para desencadenar la producción de factor tisular y citocinas, los cuales, contribuyen al incremento de la vegetación, mediante la activación de la agregación plaquetaria (Figura 3).

Herzberg y Meyer (43) utilizaron un modelo de conejo para demostrar que los estreptococos del grupo viridans, como *Streptococcus sanguinis* pueden inducir la agregación plaquetaria a través de la expresión de una proteína presente en la pared celular de estas cepas, denominada proteína asociada a la agregación plaquetaria (PAAP).

En respuesta a PAAP las plaquetas se activan. Las plaquetas activadas liberan gránulos alfa y gránulos densos que contienen proteínas microbicidas plaquetarias (PMP), fibrinógeno y los factores de coagulación V y VIII. Estos factores pueden producir un efecto procoagulante puesto que se unen a la membrana plasmática de las plaquetas y activan localmente a la trombina, iniciando la polimerización de fibrinógeno a fibrina. Las plaquetas agregadas pueden contribuir potencialmente a las lesiones vegetativas mencionadas y dar lugar, posteriormente, a trombosis coronaria y a infarto al miocardio (17,18).

La función de las PMP es eliminar a los microorganismos alterando su membrana plasmática; sin embargo, las bacterias recuperadas de pacientes con EI son sistemáticamente resistentes a la muerte inducida de las PMP (38).

Por otra parte, adhesinas específicas de las bacterias también parecen estar implicadas en la colonización de las lesiones vegetativas. Estas adhesinas incluyen a FimA de *S. parasanguinis*, a SsaB de *S. sanguinis*, ScaA de *Streptococcus gordonii* y PsaA de *S. pneumoniae* (44).

De igual forma, se ha encontrado que los polisacáridos extracelulares como los glucanos también están implicados en el desarrollo de la endocarditis infecciosa, éstos conforman el esqueleto de la placa dental y se sintetizan por los estreptococos. Se ha encontrado que las especies de estreptococos que producen glucanos se adhieren mejor a los coágulos de plaquetas-fibrina, que las especies no productoras, y los glucanos sintetizados por *S. sanguinis* son más efectivos en la inducción de endocarditis experimental que las especies no isogénicas (17).

Finalmente, el ciclo de adhesión y deposición de fibrina y plaquetas en las vegetaciones se repite una y otra vez, dentro de las cuales los microorganismos adherentes proliferan para formar densidades microbianas de 10^8 a 10^{10} UFC/g de vegetación (37).

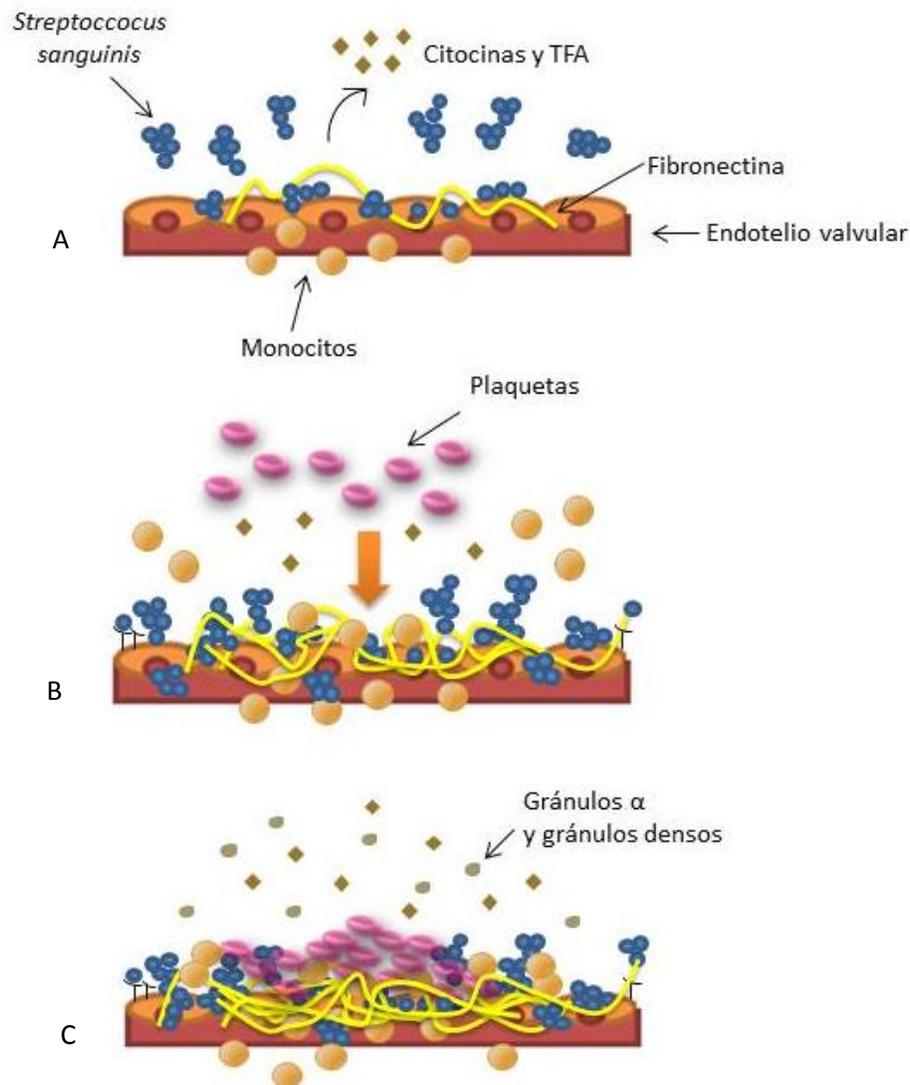


Figura 3. Colonización bacteriana del endotelio valvular. En respuesta al daño valvular las células del estroma y las proteínas de la matriz extracelular activan la deposición de fibrina a la que se adhieren los estroptococos (panel A), lo cual atrae a monocitos e induce la producción de factor tisular (TFA) y citocinas (panel B), estos mediadores activan la cascada de coagulación, se atraen y activan plaquetas y se induce la expresión de citocinas e integrinas, estimulando el crecimiento de la vegetación (Moreillon P, 2004)

3.5.5. Patofisiología

Las vegetaciones sobre la válvula nativa pueden interferir mecánicamente con el movimiento de la válvula y causar regurgitación valvular. El crecimiento de la vegetación a menudo resulta en perforación de la valva y puede causar la ruptura

de cuerdas tendinosas. La infección también puede extenderse fuera de las valvas de la válvula en las estructuras circundantes, como la unión al seno tubular, el anillo, el miocardio, el sistema de conducción, o la fibrosa intravalvar (42).

3.5.6. Manifestaciones clínicas

Las consecuencias fisiopatológicas y las manifestaciones clínicas de la EI se deben a la lesión de las estructuras intracardiacas, la embolización de fragmentos de las vegetaciones, que originan infección o infarto en sitios distantes, la infección hematogena durante la bacteremia y la lesión hística por el depósito de inmunocomplejos circulantes o por respuestas inmunitarias frente a los antígenos bacterianos depositados.

La historia clínica de la EI es sumamente variable según el microorganismo causal, la presencia o ausencia de cardiopatía preexistente y el modo de presentación. Los síntomas clásicos incluyen fiebre y soplo cardiaco. Se presentan fenómenos vasculares e inmunológicos como las hemorragias en astilla, patequias, nódulos de Osler, lesiones de Janeway, las manchas de Roth, y los émbolos al cerebro, al pulmón o al bazo. Dentro de los datos de laboratorio se encuentran niveles elevados de proteína C reactiva (28).

3.5.7. Diagnóstico

El diagnóstico de la EI se realiza con base en los datos clínicos, microbiológicos y ecocardiográficos, con los cuales se ha desarrollado un esquema sensible y específico, denominado *criterios de Duke* (Tabla 1)

Tabla 1. Criterios Duke modificados para el diagnóstico de la EI

Criterios mayores
1. Hemocultivo positivo Microorganismos típicos de EI obtenidos de dos hemocultivos independientes <i>S. viridans</i> , <i>S. bovis</i> , grupo HACEK, <i>S. aureus</i> o Enterococos adquiridos en la comunidad en ausencia de un foco principal o Microorganismos compatibles con la EI con hemocultivos persistentemente positivos:

<p>Al menos dos posibles cultivos positivos de muestras sanguíneas tomadas a intervalos > 12 h o</p> <p>Tres o ≥ 4 hemocultivos diferentes, con por lo menos 1 h entre la extracción del primero y el último.</p> <p>o</p> <p>Hemocultivo positivo único para <i>Coxiella burnetii</i> o un título de anticuerpo IgG de fase I >1:800</p> <p>2. Evidencia de afección cardíaca</p> <p>Ecocardiografía positiva para EI</p> <p>Vegetación, absceso; nueva dehiscencia parcial de válvula protésica</p> <p>Nueva regurgitación valvular</p>
Criterios menores
<ol style="list-style-type: none"> 1. Predisposición: cardiopatía predisponente, consumo de drogas por vía intravenosa, EI previa, válvula protésica. 2. Temperatura corporal: $\geq 38.0^{\circ}\text{C}$ 3. Fenómenos vasculares: embolia arterial grave, infartos pulmonares sépticos, aneurisma micótico, hemorragia intracraneal, hemorragias conjuntivales, lesiones de Janeway. 4. Fenómenos inmunitarios: glomerulonefritis, nódulos de Osler, manchas de Roth, factor reumatoide. 5. Datos microbiológicos: hemocultivo positivo que no cumple los criterios mayores o evidencia serológica de infección activa por un microorganismo compatible con EI.
<p>El diagnóstico de EI es definitivo en presencia de</p> <ul style="list-style-type: none"> • 2 criterios mayores, o • 1 criterio mayor y 3 menores, o • 5 criterios menores.
<p>El diagnóstico de EI es posible en presencia de</p> <ul style="list-style-type: none"> • 1 criterio mayor y 1 menor, o • 3 criterios menores.

3.5.8. Tratamiento

Es difícil erradicar bacterias de la vegetación vascular en la EI, ya que este sitio tiene una respuesta inmunitaria deficiente y dado que los microorganismos que se encuentran en la profundidad de las vegetaciones son metabólicamente inactivos, tienen una menor reactividad a los efectos bactericidas de los antibióticos; por lo tanto el tratamiento debe ser prolongado y bactericida, no bacteriostático. En

general, se administran antibióticos por vía parenteral y deben alcanzar concentraciones séricas elevadas que, a través de la difusión pasiva, lograrán concentraciones eficaces en las profundidades de la vegetación. La selección del tratamiento eficaz requiere conocer la susceptibilidad de los microorganismos patógenos.

3.5.9. Prevención

Antiguamente, la *American Heart Association* con la asociación de otras sociedades médicas internacionales y nacionales, recomendaba la realización de profilaxis ante numerosos procedimientos que inducen bacteremia.

Sin embargo, la falta de consenso generalizado y de evidencia científica referida a los beneficios del tratamiento antibiótico preventivo para la profilaxis de EI asociada a procedimientos dentales y de otros sistemas, condujo a publicar una nueva guía, en la cual no se recomienda la administración de antibióticos previamente a los procedimientos odontológicos, ni de los aparatos gastrointestinal o genitourinario, excepto en aquellos pacientes con mayor riesgo de padecer EI; o cuando, en procedimientos dentales se manipula el tejido gingival o la región periapical de los dientes o para la perforación de la mucosa oral (25,37).

3.6. Sistema inmune.

El sistema inmune es la primera línea de defensa contra infecciones, censa, responde y modula a microorganismos y productos microbianos. El sistema inmunitario consta de 2 líneas de defensa principales, inmunidad innata e inmunidad adaptativa.

El reconocimiento del sistema inmune innato se basa en la detección de motivos conservados de los microorganismos conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Está mediado por barreras epiteliales; células especializadas como fagocitos, macrófagos, células dendríticas y monocitos;

proteínas circulantes (complemento, colectinas, pentraxinas); citocinas, quimiocinas y receptores de reconocimiento de patrones que están codificados en la línea germinal, entre ellos los receptores semejantes a Toll (TLR), tipo NOD (NLR) entre otros.

Los TLR activan a las células inmunes a través de vías de señalización intracelulares después de la interacción con los PAMPs tales como polímeros vinculados a lípidos de la pared celular bacteriana, también llamados macroanfilos, como el LPS de bacterias Gram-negativo, el LTA de bacterias Gram-positivo y lipoglicanos de micobacterias, desencadenando una respuesta inflamatoria. Activan a macrófagos para estimular la síntesis y secreción de importantes citocinas proinflamatorias, incluyendo TNF, IL-1 β e IL-6 que coordinan las respuestas locales y sistémicas. TNF e IL-1 β , a su vez, activan al endotelio local para inducir la vasodilatación y aumentar la permeabilidad de los vasos sanguíneos, lo que permite a las proteínas del suero y a los leucocitos ser reclutados al sitio de la infección. Además, la IL-1 β junto con la IL-6 activan hepatocitos para la producción de proteínas de fase aguda, incluyendo colectinas y pentraxinas. Estas proteínas a su vez, activan al complemento y opsonizan patógenos para la fagocitosis por macrófagos y neutrófilos (45–47).

3.7. Receptores semejantes a Toll

Los receptores semejantes a Toll se denominan así por su similitud con la proteína codificada por el gen Toll, identificada en *Drosophila melanogaster* como un componente esencial del desarrollo embrionario. En 1996 se demostró que la proteína Toll juega un papel fundamental en la respuesta inmune de *Drosophila* al inducir la transcripción de un gen que da lugar a un péptido antifúngico en respuesta a una infección por hongos (48). Posteriormente, se identificaron genes relacionados en plantas, gusanos, aves y mamíferos, lo cual demostró su importancia en la escala evolutiva como parte del sistema inmune innato. Actualmente, se han identificado diez TLRs en seres humanos y sus ligandos específicos (48–50) (Tabla 2).

Tabla 2. Ligandos de los diferentes TLRs

TLR	Ligandos exógenos	Ligandos endógenos
TRL 1	Lipopéptidos tri-acetilados	ND
TLR 2	Lipopéptidos, peptidoglucanos, LTA, porinas, LPS, zymosan	Hsp60; Hsp70; Gp96; HMGB1
TLR 3	dsARN, poly (I:C)	mARN
TLR 4	LPS (lípidio A), proteína F de virus sinsital respiratorio	Hsp60; Hsp70; Gp96; HMGB1; fibrinógeno, proteína surfactante A, fibronectina dominio extra A, heparansulfato, β -defensina 2, ácido hialurónico
TLR 5	Flagelina	ND
TLR 6	Lipopéptidos di.acetilados	ND
TLR 7	ssARN	ssARN
TLR 8	SsARN	ssARN
TLR 9	CpG ADN	ADN
TLR 10	ND	ND
ND= No determinado		

Los TLR son glicoproteínas transmembrana tipo 1 conformados por un dominio extracelular N-terminal con repeticiones ricas en leucina (LRR), seguido de un dominio transmembrana rico en cisteína, y un dominio intracelular C-terminal con una región conservada denominada dominio de homología del receptor Toll/Interlucina-1 (TIR). El dominio LRR media la unión con el ligando, mientras que el dominio TIR se requiere para la interacción y el reclutamiento de varias moléculas adaptadoras, que activan la vía de señalización corriente abajo (Figura 4).

Los TLR se expresan tanto en células inmunes como en células no inmunes. Aunque las células dendríticas, neutrófilos y macrófagos expresan un panel casi completo de los diferentes TLR, existen células no inmunes que también expresan TLRs funcionalmente activos, como células epiteliales, queratinocitos, células del

SNC, fibroblastos y cardiomiocitos, entre otros, en respuesta a una alteración de la homeostasis.

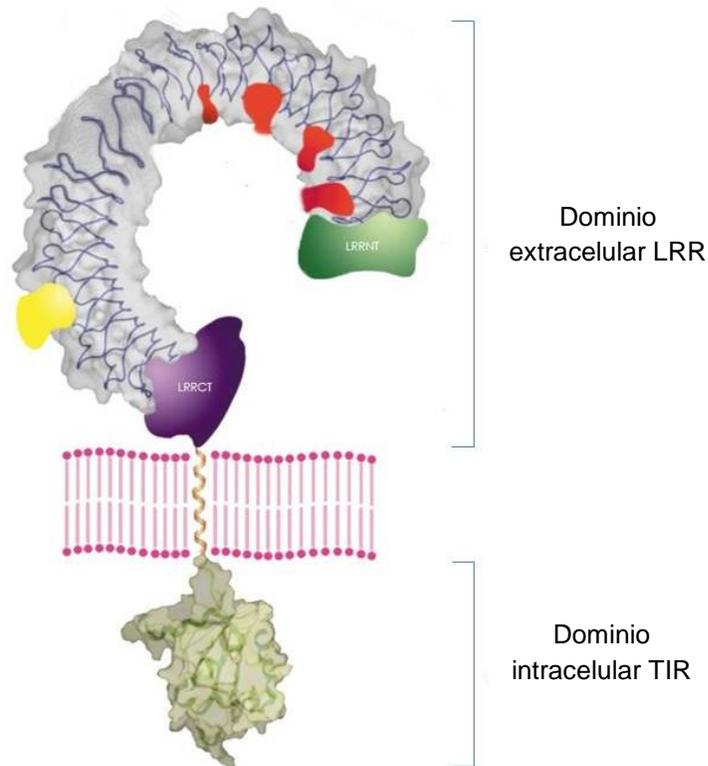


Figura 4. Estructura del TLR. Se conforma por un dominio extracelular con repeticiones ricas en leucina N-terminal (LRR-NT) y C-terminal (LRR-CT), seguido de un dominio transmembrana y un dominio intracelular con una región conservada denominada dominio de homología del receptor Toll/Interlucina-1 (TIR) (Bell JK, et.al., 2003).

3.7.1. TLR 2

El TLR 2 se localiza en la membrana celular. Forma heterodímeros con TLR 1, TLR 6 o TLR 10; el TLR 1/TLR 2 reconoce lipopéptidos triacilados, mientras que TLR 2/TLR 6 reconoce lipopéptidos diacilados. Actualmente, se desconoce el ligando para TLR 2/TLR 10. Además, el TLR2 reconoce otros ligandos como los componentes de la pared celular bacteriana, tales como LTA o peptidoglucano, componentes de la pared celular micobacteriana como lipomannas y, zimozan, componente de la pared celular de levaduras. La versatilidad de la unión de diversos ligandos con el TLR 2 ha sido explicada por su capacidad para formar

heterodímeros con otros TLRs y por el uso de coreceptores para el reconocimiento de PAMPs. Respecto a esto, se ha encontrado que CD14 y CD36 mejoran la respuesta de los ligandos del TLR 2 (50,51).

3.8. Ácido lipoteicoico

El LTA es un macroanfilo encontrado en la pared celular de las bacterias Gram-positivo. Su estructura consiste en unidades repetidas de poliglicerolfosfato (PGP) unidas a la membrana citoplasmática por un glicolípido que generalmente, consiste en gentiobiosil diacilglicerol. La posición C-2 de los residuos de glicerol del PGP está sustituida por azúcares, tales como galactosa, diglucosa o residuos de N-acetilglucosamina, o por D-alanina, mediante enlaces glicosídicos o enlaces éster, respectivamente. La cadena de PGP se une covalentemente a la parte lipídica de la molécula en la posición C-6 de la glucosa del gentiobiosil (45,51–54) (Figura 5).

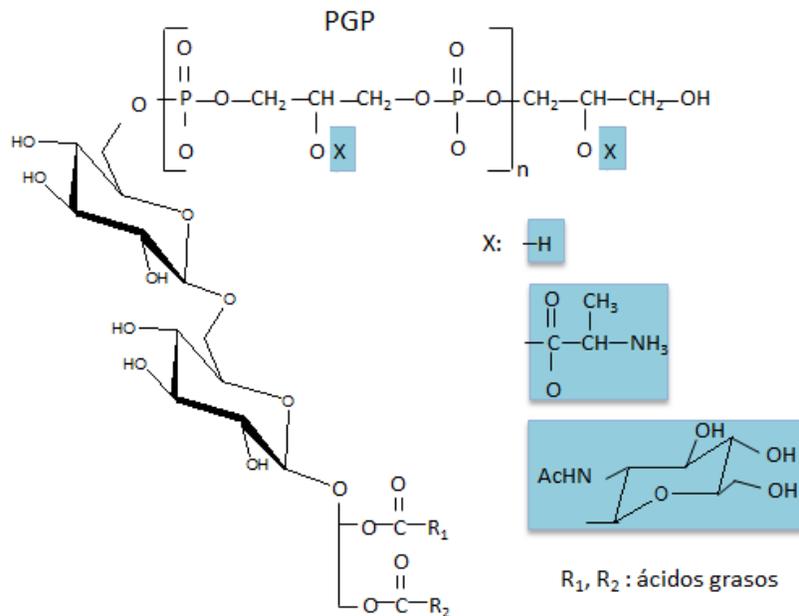


Figura 5. Estructura del LTA. Consiste en unidades repetidas de poliglicerolfosfato (PGP) unidas a una molécula de gentiobiosil diacilglicerol. La posición C-2 de los residuos de glicerol del PGP está sustituida por residuos de N-acetilglucosamina, o por D-alanina (Reichmann NT, et. al., 2011).

El LTA es un factor de virulencia potencial y participa en la fisiopatología de múltiples enfermedades, causadas por estreptococos del grupo A y B, entre las que se encuentran la inflamación gingival y la endocarditis infecciosa causada por estreptococos orales.

En estos padecimientos, probablemente el LTA actúa como una molécula de adhesión facilitando la colonización y la invasión de bacterias en los tejidos profundos, estimulando el estallido respiratorio, la exocitosis de enzimas lisosomales, y actuando, además, como un inductor de una gran variedad de mediadores proinflamatorios que incluyen al TNF- α , la IL-1 β , la IL-6 y la IL-8 (52). Además, como resultado de la interacción del LTA con una amplia variedad de tipos celulares, se induce, también, la producción de la proteína ciclooxigenasa 2 (COX-2) y la secreción de proteína inflamatoria de macrófagos 1 (MIP-1) (54).

La heterodimerización del TLR 2/TLR 6 parece ser importante para el reconocimiento del LTA debido a su región diacilada, tal como se describe para otros lípidos diacilados como los lipopéptidos (51). Sin embargo, Kang y colaboradores (55) reportaron que en la estructura cristalina del TLR 2 en unión con el LTA, las dos cadenas del acilo de las unidades de diacilglicerol se insertan en la hendidura hidrofóbica del TLR 2 con gran afinidad, pero sin inducir la heterodimerización con el TLR6. La controversia sobre el reconocimiento del LTA puede atribuirse a que la estructura glicolípida (región inmunológicamente activa) diverge entre las bacterias Gram-positivo de una manera específica del género (56).

3.9. Vía de señalización.

El reconocimiento de ligandos por los TLRs estimula el reclutamiento de varias proteínas adaptadoras intracelulares que contienen el dominio TIR como la proteína de diferenciación mieloide (MyD88). El TLR 2 al reconocer al LTA da lugar al reclutamiento de MyD88 con ayuda de Mal (adaptador similar a Myd88), también denominada proteína adaptadora con dominio TIR (TIRAP), que actúa como enlace entre el TLR 2 y MyD88. El reclutamiento de adaptadores

desencadena la vía de señalización, en este caso, la vía de señalización dependiente de MyD88.

La asociación TLR/MyD88 estimula el reclutamiento de la cinasa asociada al receptor de IL-1 (IRAK)-4, que activa a otros miembros de la familia IRAK (IRAK-1 e IRAK-2). A continuación, las cinasas IRAK se disocian de MyD88 e interactúan con el factor asociado al receptor de TNF-6 (TRAF-6), que actúa como una ligasa de ubiquitina (E3). Junto con el complejo de enzimas conjugadoras de ubiquitina (E2) conformadas por Ubc13 y Uev1A, TRAF-6 cataliza la formación de una cadena de poliubiquitina vinculada a una lisina 63 (K63), que a su vez activa a la cinasa 1 del factor de crecimiento transformante- β (TAK1), una MAPKKK. TAK1 en combinación con TAB1, TAB2 y TAB3 (proteínas de unión a TAK) activan dos vías corriente abajo; por una parte, fosforilan a la cinasa de I κ B (IKK), lo que activa a NF-KB y, por otra, activa a la familia MAPK (57,58) (Figura 6).

El complejo IKK, compuesto de las subunidades catalíticas IKK α e IKK β y la subunidad regulatoria IKK γ /NEMO, cataliza la fosforilación de I κ B. Esta fosforilación conlleva a la ubiquitinación y degradación de I κ B, por lo que NF-KB (subunidades p50/p65) queda libre para translocarse al núcleo, donde controla la expresión de genes de citocinas inflamatorias. Por otra parte, miembros de la familia MAPK fosforilan y activan al factor de transcripción AP-1. (57–59).

3.9.1. Proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPKs)

Las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK) son un grupo de proteínas serina/treonina cinasas, altamente conservadas en especies eucariotas. La familia MAPK tiene un papel importante en los procesos celulares, tales como la proliferación celular, respuestas al estrés, apoptosis y la respuesta inmune (60). Hay tres clases principales de cinasas MAP en seres humanos: cinasa regulada por señales intracelulares (ERK1 y ERK2), cinasa Jun N-terminal (JNK) y cinasa MAP p38 (p38).

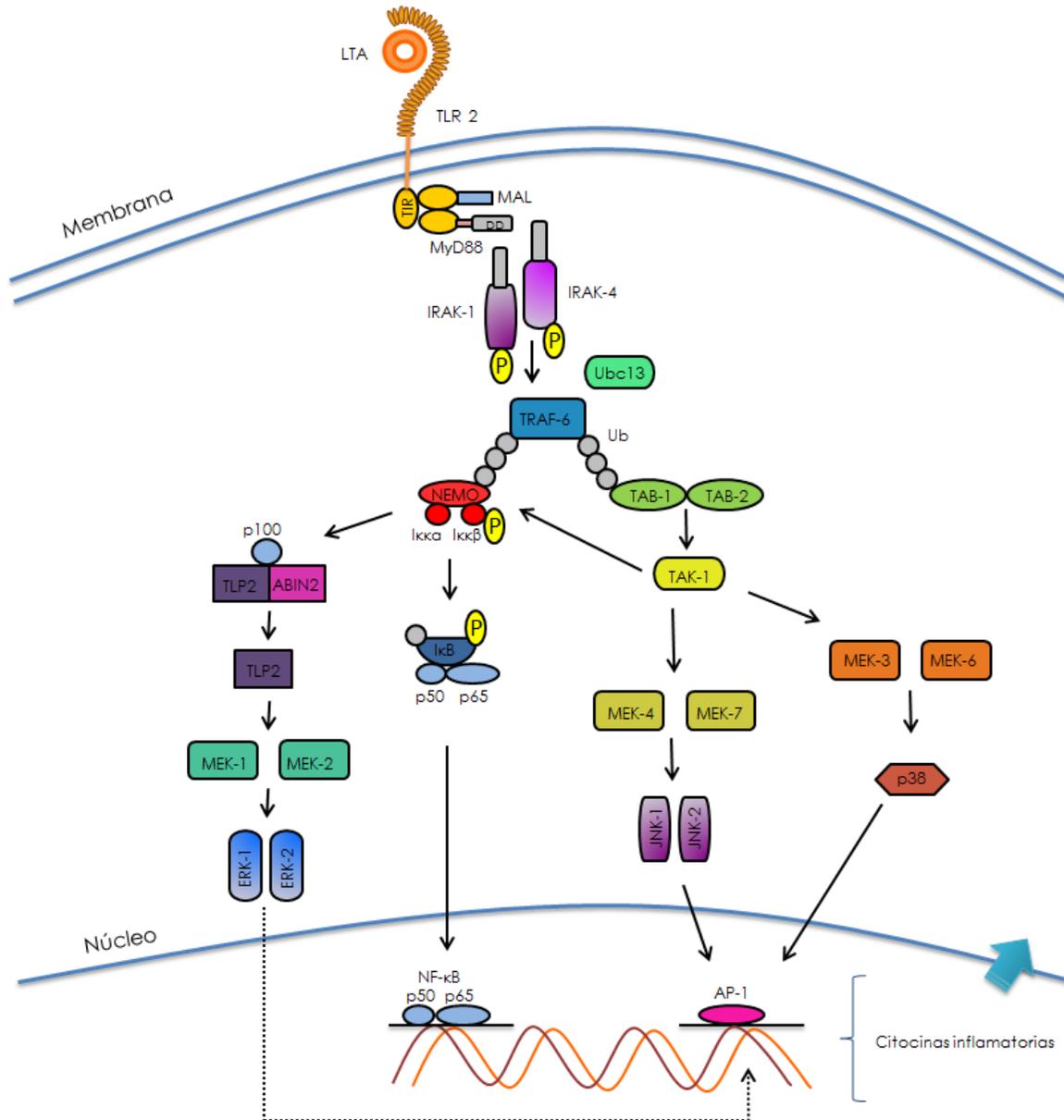


Figura 6. Vía de señalización dependiente de Myd88. La asociación del TLR 2 con LTA estimula el reclutamiento de miembros de la familia IRAK al dominio de muerte (DD) de MyD88, donde son fosforilados; una vez activos reclutan a TRAF6, quien a través de la síntesis de cadenas de poliubiquitina, activa a TAK1. TAK1 en combinación con TAB1 y TAB2 activan dos vías corriente abajo: la translocación de NF-κB al núcleo y la activación de la familia MAPK (Arthur JSC, et. al., 2013).

Las señales que conducen a la activación de MAPK por lo general se inician en la superficie celular, principalmente por diversos receptores unidos a la membrana. Las vías de MAPK son activadas a través de cascadas secuenciales de

fosforilación, comenzando con la fosforilación de las cinasas MAPK (MAPKKs) en residuos de serina y/o treonina por cinasas cinasa MAPK (MAPKKKs), como TAK1 y el *tumor progression locus 2* (TPL2) (61). Las MAPKKs activadas fosforilan a las MAPKs en los residuos adyacentes treonina y tirosina en el motivo conservado Thr-X-Tyr (donde X denota al ácido glutámico en ERK, prolina en JNK y glicina en p38), que se encuentra en el asa reguladora entre los subdominios VII y VIII de su estructura primaria (60,61). Una vez activas las MAPKs fosforilan sustratos diana en residuos serina o treonina seguido por una prolina.

En la vía de señalización dependiente de MyD88, cuando TAB1 y TAB2 reclutan a TAK1 a la cadena K63 poliubiquitinada de TRAF6, TAK1 activa la vía de p38, mediante la fosforilación de MEK3 y MEK6 y la vía de JNK, mediante la fosforilación de MEK4 y MEK7. Por otra parte, NEMO también se une a la poliubiquitina K-63, lo que recluta a IKK α e IKK β . Esto facilita la fosforilación de IKK β por TAK1. IKK β induce la proteólisis de la subunidad precursora p105 de NF- κ B, que media TPL2, el cual tras su liberación puede activar la vía de ERK a través de la fosforilación de MEK1 y MEK2 (61) (Figura 6).

La fosforilación de los residuos de treonina y tirosina en MAPKs resulta en un cambio conformacional de la proteína que aumenta la accesibilidad del sustrato y mejora la catálisis (60). Las proteínas MAPK activadas pueden fosforilar una amplia gama de blancos corriente abajo, incluyendo proteínas cinasas y factores de transcripción, lo que conduce a la expresión de genes que resultan en una respuesta biológica.

3.10. Flavonoides

Los flavonoides son un grupo de compuestos polifenólicos, producto del metabolismo secundario de plantas superiores, presentes desde la raíz hasta los frutos. Químicamente son compuestos del tipo C₆-C₃-C₆. Después de un reacomodo molecular quedan constituidos por un benzopirano (anillos A y C) y un benceno (anillo B), por lo que se denominan 2-fenilbenzopiranos (Figura 7).

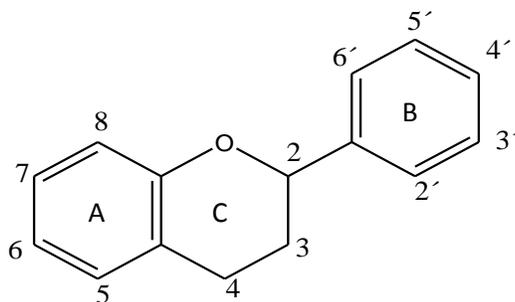
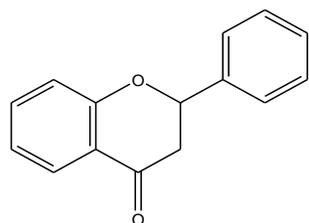


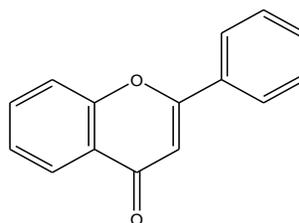
Figura 7. Estructura química de los flavonoides.

3.10.1. Clasificación

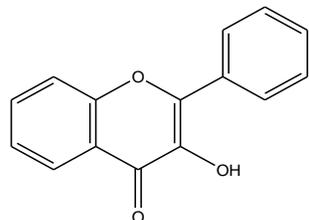
Los flavonoides se clasifican con base en el grado de oxidación y saturación presentes en el anillo heterocíclico C, y se pueden dividir en los siguientes grupos (62):



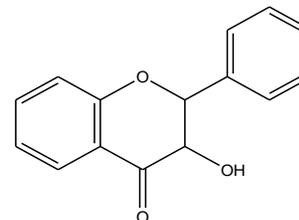
Flavanona



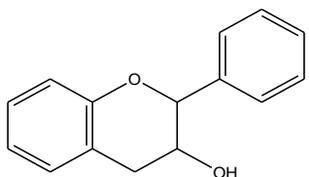
Flavona



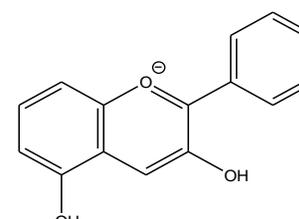
Flavonol



Flavanonol



Flavanol



Antocianidinas

Figura 8. Clasificación de los flavonoides

3.10.2. Biosíntesis

Los flavonoides son metabolitos secundarios vegetales de origen biosintético mixto: el anillo A (C_6) proviene de la ruta acetato-malonato y, el anillo B (C_6) y la cadena C_3 provienen de la ruta del ácido siquímico. A partir de la ruta del ácido siquímico se forma el aminoácido fenilalanina, el cual sufre desaminación por la enzima L-fenilalanina amonio liasa (PAL), dando lugar al ácido cinámico. Éste se conjuga con la coenzima A y forma el cinamoilCoA. Por otra parte, a partir de la ruta acetato-malonato se forman 3 unidades de malonilCoA, las cuales se condensan con el cinamoilCoA por acción de la chalcona sintetasa (CHS) (63). Después de una reacción de tautomerización se forma una chalcona, precursora de las demás clases de flavonoides. Finalmente, ocurre una reacción de ciclación que cataliza la enzima chalcona isomerasa (CHI), originando la estructura de los flavonoides con dos anillos aromáticos unidos por un heterociclo (Figura 9).

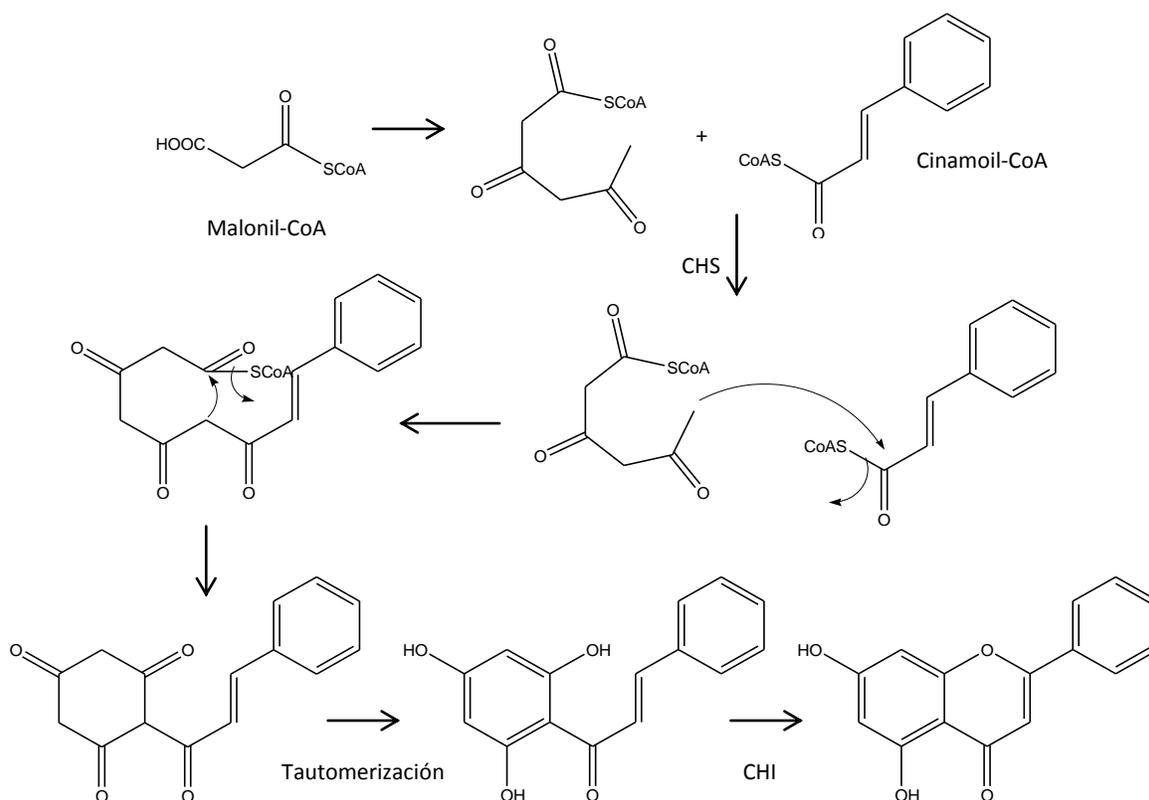


Figura 9. Biosíntesis de los flavonoides.

El patrón de oxigenación de los anillos aromáticos de los flavonoides puede tomarse como un indicio del origen del polifenol, pues aquellos derivados del acetato-malonato conservan el patrón *meta*, mientras que los derivados del ácido siquímico, guardan relación *orto*.

3.10.3. Propiedades biológicas.

En los últimos años, diversos estudios han descrito que los flavonoides presentan una amplia gama de propiedades biológicas, como son: propiedades anti-inflamatorias, antioxidantes, antineoplásicas, quimioprotectoras, antiplaquetarias, cardioprotectoras, hepatoprotectoras y antivirales (1–3), poniendo de manifiesto sus efectos benéficos.

3.10.3.1. Propiedades antiinflamatorias.

Actualmente, existe una gran variedad de medicamentos en el mercado para tratar la inflamación; sin embargo, van acompañados de efectos secundarios como úlceras gástricas. Por lo tanto, la búsqueda de nuevos compuestos sigue siendo un tema de interés, con el objetivo de encontrar principios activos que tengan la misma eficacia que los ya conocidos, pero con menos reacciones adversas, abriendo la posibilidad a compuestos de origen natural, como los flavonoides.

Diversas investigaciones han demostrado, tanto en modelos *in vitro* como en modelos *in vivo*, que los flavonoides ejercen su actividad antiinflamatoria debido a su interacción con un amplio espectro de blancos moleculares centrales en la señalización celular. Los mecanismos moleculares incluyen a) depuración de radicales libres, b) regulación de la actividad celular de células inflamatorias, c) modulación de la actividad enzimática del metabolismo del ácido araquidónico y de la óxido nítrico sintasa, d) modulación en la producción de moléculas proinflamatorias y e) modulación de la expresión de genes proinflamatorios (64).

Dentro del metabolismo del ácido araquidónico, hay dos enzimas principales que juegan un papel importante en la respuesta inflamatoria: la ciclooxigenasa 2 (COX-2) y la lipooxigenasa (LOX), las cuales catalizan la formación del ácido

araquidónico a prostaglandinas y a leucotrienos, respectivamente, Se ha encontrado que los flavonoides pueden modular el metabolismo del ácido araquidónico en diferentes etapas: mediante la inhibición de la fosforilación de la fosfolipasa A, la inhibición de la actividad enzimática de COX-2 y LOX y la inhibición en la expresión de COX-2, disminuyendo, de esta manera, la formación de mediadores de la inflamación (64,65).

Por otra parte, se ha observado que varios flavonoides son capaces de disminuir la expresión de diferentes citocinas proinflamatorias y quimiocinas como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, MCP-1, en diferentes tipos celulares (66). Además de las citocinas, se ha encontrado que los flavonoides pueden regular la producción de moléculas proinflamatorias a través de la inhibición en la fosforilación de cinasas como la proteína cinasa C (PKC) y las MAPKs, lo que conlleva a una disminución en la respuesta inflamatoria (64,66).

Así mismo, investigaciones recientes sugieren que los flavonoides actúan como moduladores de la expresión génica proinflamatoria (64). Los mecanismos por los que los flavonoides bloquean la expresión de genes aún se desconocen, pero algunos estudios sugieren que se debe a una supresión en la actividad transcripcional debido a su capacidad de interactuar con factores de transcripción, como NF- κ B o AP-1 (64,66,67).

Muchos de los genes que están implicados en la iniciación de la respuesta inflamatoria están regulados a nivel transcripcional por NF- κ B, como TNF- α , IL-6, IL-8, y otras quimiocinas; MHC de clase II; ICAM-1; iNOS, y COX-2. Se ha demostrado que varios flavonoides pueden regular la producción de mediadores de la inflamación a través del bloqueo de la ruta de NF- κ B en diferentes niveles, que incluyen, la prevención de la translocación nuclear de las subunidades p50/p65 de NF- κ B, por la inhibición de la fosforilación y subsecuente degradación de la proteína I κ B α , por reducción en la actividad de IKK, o por el bloqueo en la unión ADN/NF-KB (66).

3.11. Naringina

La naringina es un flavonoide que se encuentra en el pericarpio de la cáscara de la toronja y otras frutas cítricas relacionadas y es el responsable del sabor amargo. Su estructura química consiste en un glucósido flavónico; la aglicona del glucósido corresponde a una flavanona, y el glúcido corresponde a un disacárido conformado por una glucosa y una ramnosa, el cual se encuentra unido al carbono 7 de la flavona.

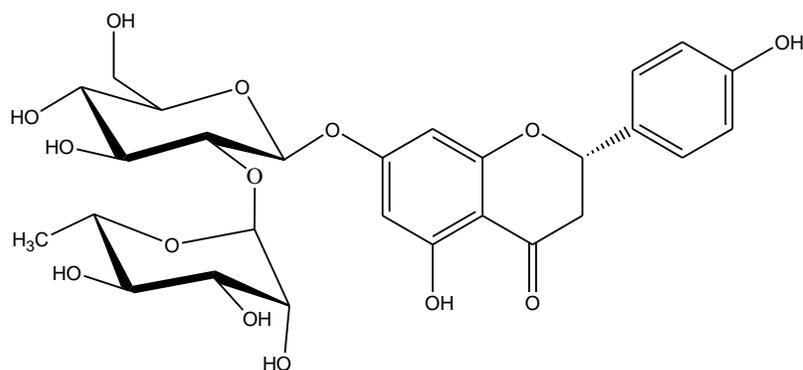


Figura 10. Estructura de la naringina (4', 5, 7-trihidroxi flavanona-7-ramnoglucósido).

3.11.1. Propiedades biológicas.

La naringina presenta un amplio espectro de propiedades farmacológicas y terapéuticas. Se le han atribuido propiedades antioxidantes (68,69), antiaterogénicas (70), antitusivas (71) antiinflamatorias (72–78), anticarcinogénicas (70,79), gastroprotectoras (80), así como propiedades antihipertensivas (81). También es capaz de reducir los niveles de colesterol en sangre, previniendo trombosis, de inhibir la peroxidación de lípidos en membranas biológicas (70), de proteger el daño cromosómico inducido por radiación en células de médula ósea de ratón (82) y de inhibir la formación de osteoclastos y la resorción ósea (83). Así mismo, hay estudios que demuestran que la naringina disminuye la apoptosis en varios tipos celulares ante diversos estímulos citotóxicos (68,84,85). Recientemente, se ha demostrado que la naringina exhibe efectos neuroprotectores (85–87), desempeña papeles benéficos en la diabetes (88), en el síndrome metabólico y en el deterioro de la memoria.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

- Determinar el efecto del flavonoide naringina sobre la señalización intracelular inducida por LTA en cardiomiocitos de rata neonatal H9c2.

4.2. Objetivos específicos

- Determinar el efecto de la naringina sobre la fosforilación de las proteínas MAPK's (ERK, p-38 y JNK) inducida por LTA en cardiomiocitos de rata neonatal (H9c2).
- Determinar el efecto de naringina sobre la expresión de IL-1 β inducida por LTA en cardiomiocitos de rata neonatal (H9c2).
- Determinar el efecto de naringina sobre la translocación nuclear de NF- κ B inducida por LTA en cardiomiocitos de rata neonatal (H9c2).

5. HIPÓTESIS

El flavonoide naringina posee actividad antiinflamatoria, entonces regulará la fosforilación de las proteínas MAPK's, así como la translocación nuclear de NF- κ B, disminuyendo la secreción de IL-1 β , en cardiomiocitos de rata neonatal H9c2 estimulados con LTA.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Población de estudio

Línea celular derivada de cardiomiocitos de rata neonatal *Rattus norvegicus* H9c2 (ATCC CRL-1446).

6.2. Tamaño de la muestra

1, 000, 000 de células (1×10^6 células).

6.3. Metodología

6.3.1. Cultivo celular

La línea celular derivada de cardiomiocitos de rata neonatal H9c2 se cultivó en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con rojo de fenol (GIFCO BRL) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) (GIFCO BRL), 2mM L-glutamina (Invitrogen), penicilina / estreptomycin / fungizona (Invitrogen) 100 µg/ml, 100 µg/ml y 1 mg/ml respectivamente. Las células se incubaron a 37 °C y 5% CO₂. El medio se cambió hasta que las células alcanzaron una confluencia del 70-80%

6.3.2. Tratamiento celular

Las células H9c2 se sembraron en cajas de 6 pozos y se incubaron en medio DMEM al 2% SBF con el flavonoide naringina (Sigma) a concentraciones de 2, 5, 10 y 15 µM por 30 min. Posteriormente, se adicionó LTA de *S. sanguinis* (Sigma) a una concentración de 15 µg/mL por 15 min.

6.3.3. Viabilidad celular

Las células H9c2 se sembraron en caja de 96 pozos. Se realizó el tratamiento con naringina (2, 5, 10 y 15 µM) y naringina con LTA (15 µg/mL) por 6 h. Se adicionó una solución de MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio) (0.5 mg/ml) a cada pozo y se incubó a 2 h a 37°C y 5% CO₂. Posteriormente, el

sobrenadante se retiró y la formación de formazan se solubilizó con dimetilsulfóxido (DMSO) y se midió a 540 nm con un lector de placas.

6.3.4. Western-blot

Después del tratamiento, se adicionó solución amortiguadora de fosfatos salino pH 7.2 (PBS) (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM) + 1 mM Na₃VO₄, las células se recuperaron por raspado y el homogenizado se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min a 4°C. Las células se lisaron con solución de lisis (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 10 µg/mL leupeptina, 50 µg/mL aprotinina, 0.4 mM Na₃VO₄, 10 mM NaF y 10 mM Na₄P₂O₇) sobre hielo y se sonicaron a 15 hertz por 30 segundos. La proteína total se cuantificó con el reactivo de Bradford (Bio-Rad) a 280 nm. Las muestras de proteína (50 µg) se mezclaron 1:1 con solución de muestra SDS-PAGE (0.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 25% glicerol, 1% azul de bromofenol, 4% β-mercaptoetanol), se calentaron en baño seco a 70°C durante 5 min y se separaron por electroforesis en geles de poli(acrilamida) al 10% (Mini-PROTEAN). Se transfirió a una membrana de polivinilidina difluorada (PVDF) (Amersham GE) en una cámara semi-húmeda (15 V por 1 h). Posteriormente, las membranas se bloquearon en una solución 5% de leche libre de grasa durante 1 h a temperatura ambiente y se lavaron 3 veces con solución salina Tris (TBS)-Tween pH 7.8 (NaCl 20mM, Trisma 137 mM). Las membranas fueron incubadas, por separado, durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos: p-ERK 1/2, ERK 1/2, p-p38, p38, p-JNK y JNK (Santa Cruz Biotechnology) en diluciones 3:10000. Se lavaron 3 veces con TBS-Tween y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h con anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology) en dilución 3:10000. Para la detección de bandas se utilizó un equipo de quimioluminiscencia (Santa Cruz Biotechnology) y placas autoradiográficas (Amersham GE).

6.3.5. Extracción de ARN total.

El ARN se aisló de las células H9c2 previamente tratadas con el flavonoide y el estímulo con LTA durante 4 h. Después de este tiempo se extrajo el medio de la caja de 6 pozos, se adicionaron 500 µL de Trizol (Invitrogen) a cada pozo en un baño de hielo durante 5 min, el Trizol se transfirió a tubos Eppendorf y se adicionaron 250 µL de cloroformo en una dilución 1:49, se incubaron 5 minutos y se centrifugaron a 12,000 xg por 15 min a 4°C. De las fases obtenidas se extrajo la fase acuosa y se colocó en tubos Eppendorf nuevos. Posteriormente, se precipitó el ARN adicionando 250 µL de isopropanol. Las muestras se centrifugaron a 12,000 xg por 15 min a 4°C, se decantó el sobrenadante y se dejaron secar. Finalmente, el ARN se resuspendió en 20 µL de agua dietil pirocarbonada (DEPC). La cantidad de ARN extraído se determinó espectrofotométricamente a 260 nm.

6.3.6. Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa punto final (RT-PCR).

El ARN total (1 µg) se transcribió en forma inversa (RT) usando el reactivo One Step RT-PCR (Invitrogen). La reacción de la polimerasa en cadena (PCR) se realizó utilizando los siguientes oligonucleótidos: IL-1 β , sentido: 5'-CAACGGTTCCTTCTCCTATCTC-3', antisentido: 3'-TTGCTTAGTAAATGCTCGCTTC-5'; GAPDH, sentido: 5'-CAACGGTTCCTTCTCCTATCTC-3', antisentido: 3'-TTGCTTAGTAAATGCTCGCTTC-5'. Los oligonucleótidos se diseñaron a partir de secuencias publicadas en Gen Bank para cada gen; las secuencias de los primers se obtuvieron en Primer-Blast, se seleccionaron las más convenientes de acuerdo al tamaño del producto y se mandaron sintetizar. 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. La reacción PCR se efectuó por 35 ciclos. Los productos de la amplificación se analizaron por electroforesis en una cámara horizontal (Horizon) en geles 2% de agarosa teñidos con bromuro de etidio. El gel se observó en un transiluminador de rayos UV.

6.3.7. Inmunocitoquímica.

Las células se sembraron sobre cubreobjetos colocados en los pozos de la caja de cultivo. Posterior al tratamiento, las células H9c2 se fijaron por 30 min con 3% de paraformaldehído. A continuación, se permeabilizaron durante 5 min con Tritón 0.1% y se lavaron 3 veces con PBS. Se bloquearon con una solución 5% de leche libre de grasa en PBS durante 1 h a 37°C y se incubaron con el anticuerpo p65/NF-κB (1:250) e IκB (1:250) durante 1 h a 37 °C. Después de 3 lavados, las células se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con FIT-C (495nm /519nm) y rodamina (540nm /570nm) durante 1 h a 37°C. Las muestras se montaron en portaobjetos con 1μL de DAPI (461 nm) para la tinción de los núcleos celulares y se observaron en un microscopio confocal OLYMPUS fv1000 a un objetivo de 60x para los tres fluorocromos. La imágenes se analizaron en el programa fv1000.

6.3.8. Análisis estadístico.

Las bandas obtenidas de los ensayos de Western-blot y RT-PCR fueron sometidas a un análisis densitométrico mediante el uso del Software DigiltDoc. Se realizó un análisis estadístico a través de la prueba t-Student con el programa GraphPad Prism 4. Se utilizó un intervalo de confianza del 95% por lo que se consideraron como estadísticamente significativos aquellos datos que tuvieron un valor de $p < 0.05$. Los datos se expresaron como la media \pm D.E.

7. RESULTADOS.

7.1. Efecto de la naringina sobre la viabilidad celular en células H9c2.

Para determinar que las concentraciones de naringina a emplear no fueran tóxicas para las células, se analizó el efecto de la naringina en la viabilidad de las células H9c2, mediante un ensayo MTT. Los resultados muestran que a concentraciones de 2-15 μM por 24 h, la naringina no tiene efectos citotóxicos en la proliferación celular (Figura 11).

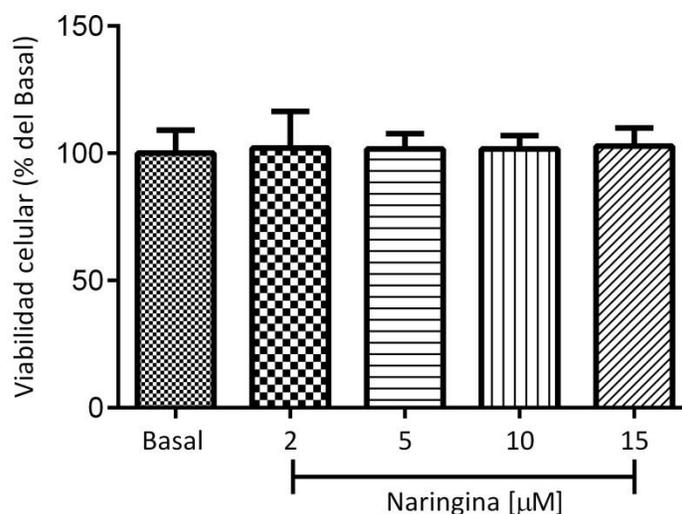


Figura 11. Efecto de la naringina sobre la viabilidad celular de células H9c2. Se sembraron células H9c2 en caja de 96 pozos por 24 h. Posteriormente, las células se trataron con naringina a diferentes concentraciones (2, 5, 10 y 15 μM) por 24 h. La viabilidad celular se determinó con un ensayo MTT. Los datos se presentan como la media \pm D.E. (n=6) de dos experimentos independientes.

7.2. Efecto de la naringina en la vía de señalización de las MAPK activadas por el estímulo de LTA en células H9c2.

Una de las vías de señalización implicadas en procesos inflamatorios es la vía de las MAPKs, la cual puede ser activada cascada abajo después del reconocimiento del LTA por el TLR 2. Por ello, con el propósito de evaluar el efecto de la naringina en la activación de la vía de las MAPKs por LTA, se realizaron ensayos de Western-blot. Los resultados muestran que la inducción con LTA induce significativamente la fosforilación de ERK 1/2 (Figura 12), p38 (Figura 13) y JNK

(Figura 14), la cual a su vez disminuye con el tratamiento de naringina de manera dependiente de la dosis. Se puede notar que la naringina tiene un mayor efecto sobre la cinasa p38 y JNK, pues a la concentración de 15 μM disminuye por completo la fosforilación y, por ende, la activación de ambas cinasas.

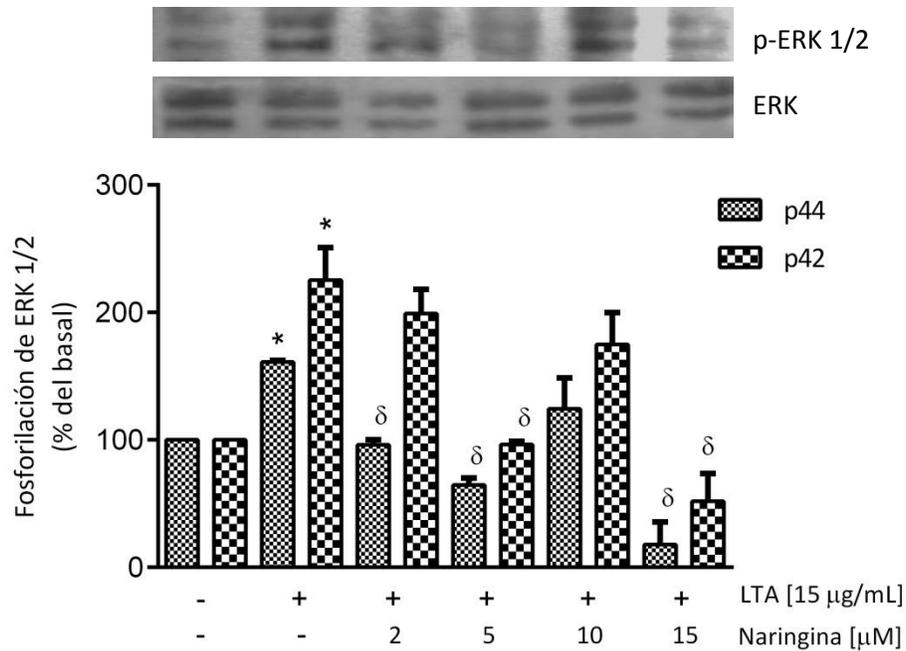


Figura 12. Efecto de la naringina sobre la fosforilación de ERK inducida por LTA. Las células H9c2 fueron pretratadas con naringina (2, 5, 10 y 15 μM) por 30 min, después se adicionó LTA (15 $\mu\text{g/mL}$) por 15 min. Posterior a la incubación p-ERK 1/2 y ERK 1/2 fueron analizados por Western-blot. Los datos se presentan como la media \pm D.E. (n=3). *, $p < 0.05$ comparada respecto al control; δ , $p < 0.05$ comparada respecto al tratamiento con LTA.

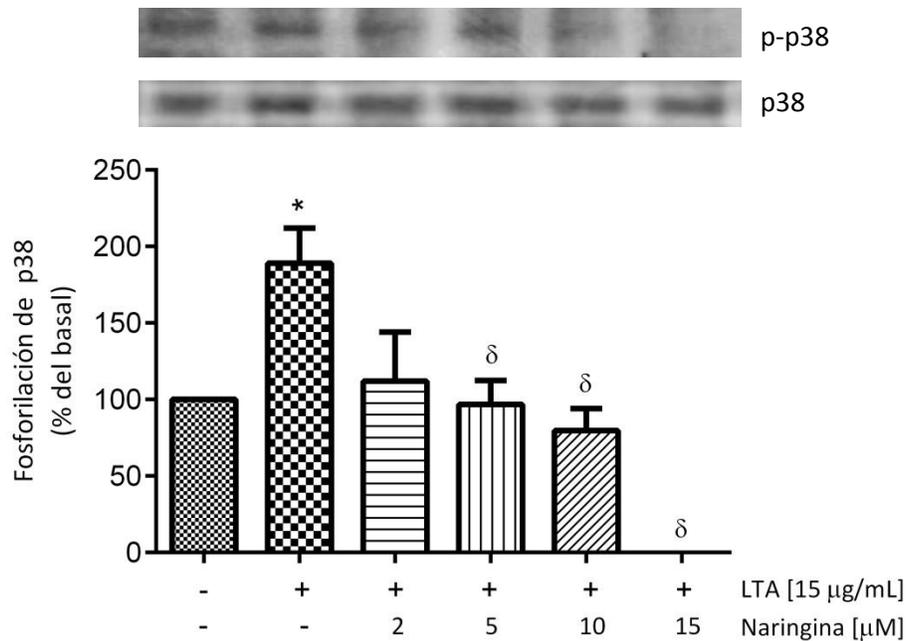


Figura 13. Efecto de la naringina sobre la fosforilación de p38 inducida por LTA. Las células H9c2 fueron pretratadas con naringina (2, 5, 10 y 15 µM) por 30 min, después se adicionó LTA (15 µg/mL) por 15 min. Posterior a la incubación p-p38 y p38 fueron analizados por Western-blot. Los datos se presentan como la media ± D.E. (n=3). *, p<0.05 comparada respecto al control; δ, p<0.05 comparada respecto al tratamiento con LTA.

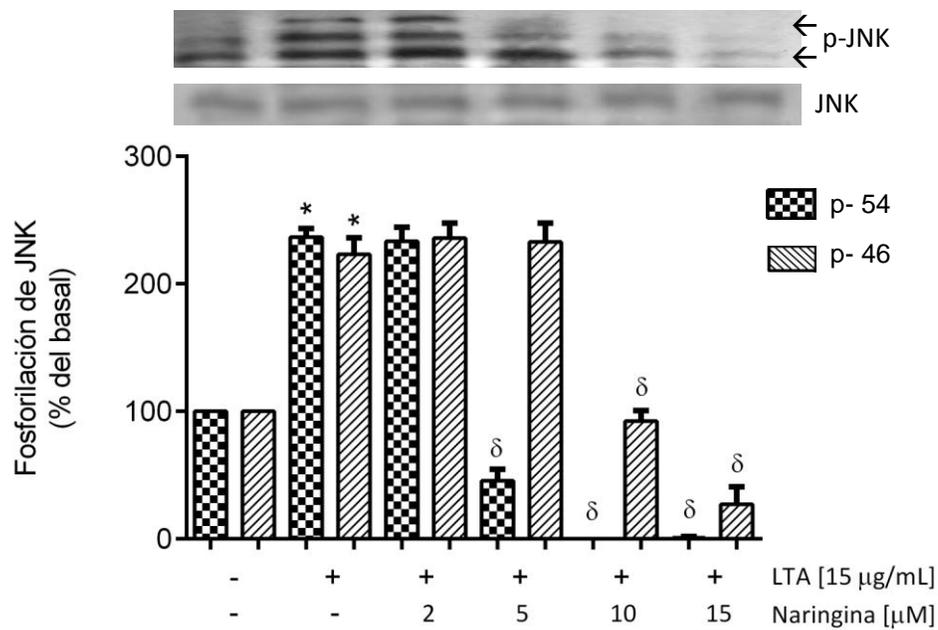


Figura 14. Efecto de la naringina sobre la fosforilación de JNK inducida por LTA. Las células H9c2 fueron pretratadas con naringina (2, 5, 10 y 15 μ M) por 30 min, después se adicionó LTA (15 μ g/mL) por 15 min. Posterior a la incubación p-JNK y JNK fueron analizados por Western-blot. Los datos se presentan como la media \pm D.E. (n=2). *, p<0.05 comparada respecto al control; δ , p<0.05 comparada respecto al tratamiento con LTA.

7.3. Efecto de la naringina sobre la translocación nuclear de NF- κ B.

Después del reconocimiento del LTA por receptores como el TLR 2 se activan mecanismos de transducción, como la vía de las MAPKs analizado previamente, que convergen en la activación de factores de transcripción como NF- κ B. Para determinar el efecto de la naringina sobre la translocación nuclear del factor de transcripción NF- κ B, y por consiguiente su activación, se realizó un ensayo de inmunocitoquímica. Los resultados muestran que el LTA activa la translocación de NF- κ B al núcleo al favorecer la degradación de I κ B, y que la naringina es capaz de regular dicha activación al disminuir la degradación de I κ B, y por ende, la translocación al núcleo y posterior activación de NF- κ B (Figura 15).

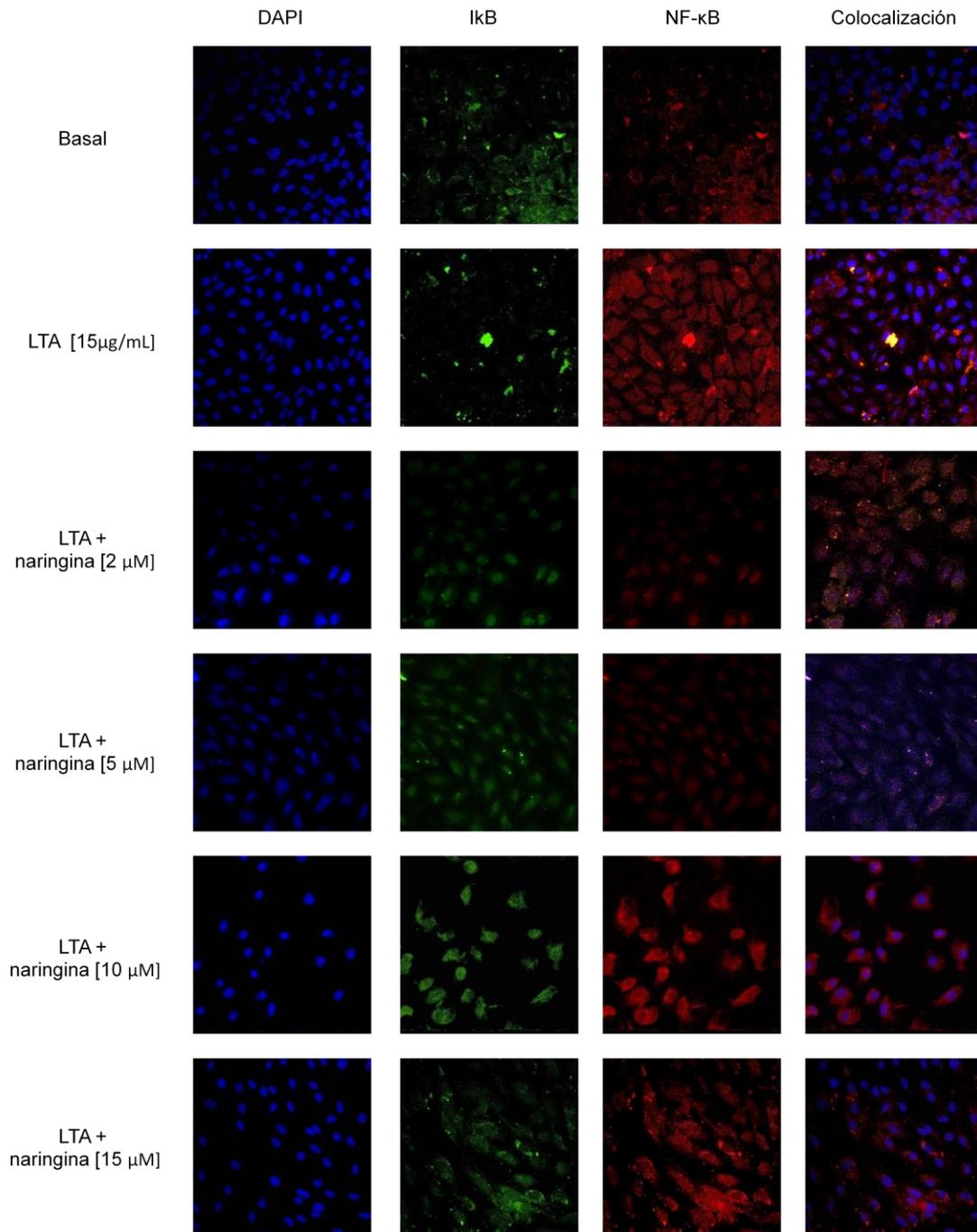


Figura 15. Efecto de la naringina sobre la translocación nuclear de NF-κB inducida por LTA. Se muestran imágenes de inmunofluorescencia obtenidas mediante microscopía confocal. En la primera columna observamos a los núcleos teñidos con el fluorocromo DAPI; en la segunda columna observamos la localización de IκB conjugado al fluorocromo FIT-C; la tercera columna corresponde a la localización de NF-κB acoplado al fluorocromo rodamina; en la última columna se muestra la colocalización.

7.4. Efecto de la naringina sobre la expresión de IL-1 β .

NF- κ B y AP-1 son dos factores de transcripción reguladores de la expresión génica de moléculas proinflamatorias como IL-1 β , activados, por ejemplo, ante el reconocimiento del LTA por su receptor. IL-1 β desencadena una respuesta sistémica ante la invasión por patógenos al inducir la transcripción de otros mediadores inflamatorios como IL-8 y TNF- α . Por lo anterior, se decidió evaluar el efecto de la naringina en la expresión de IL-1 β mediante un ensayo de RT-PCR. Los resultados muestran que el LTA desencadena la expresión de esta citocina proinflamatoria y que la naringina exhibe un efecto antiinflamatorio al disminuir la expresión de IL-1 β (Figura 16).

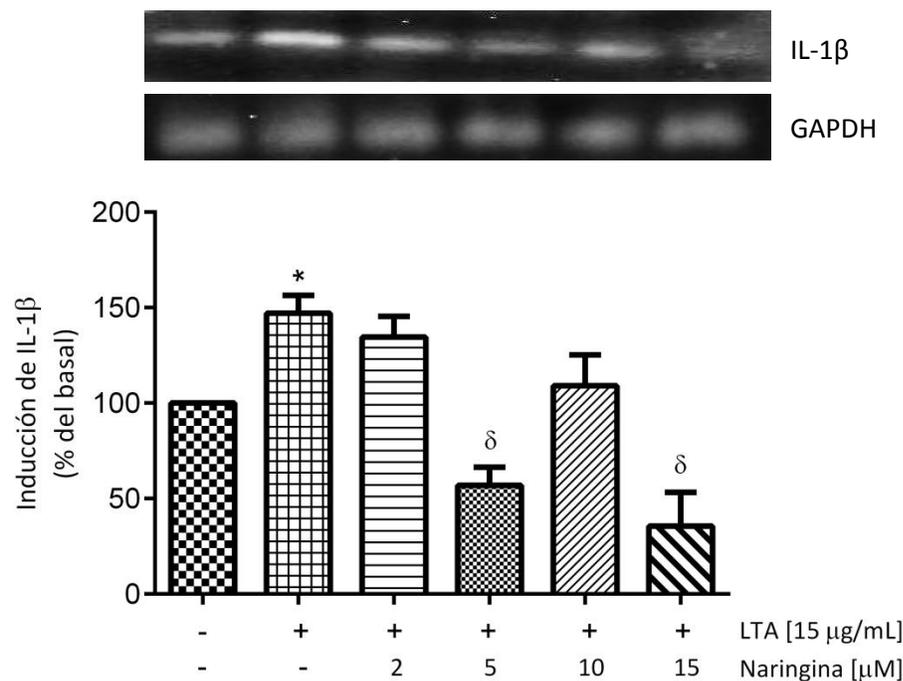


Figura 16. Efecto de la naringina sobre la expresión de IL-1 β inducida por LTA. Las células H9c2 fueron pretratadas con naringina (2, 5, 10 y 15 μ M) por 30 min, después se adicionó LTA (15 μ g/mL) por 4 hs. Posterior a la incubación se extrajo ARN y se realizó un ensayo de RT-PCR. Los niveles relativos de mRNA fueron cuantificados por densitometría y normalizados con mRNA del control GAPDH. Los datos se presentan como la media \pm D.E. (n=3). *, p<0.05 comparada respecto al control; δ , p<0.05 comparada respecto al tratamiento con LTA.

8. DISCUSIÓN

Entre los principales microorganismos que se asocian con la EI, se encuentra *S. sanguinis*, colonizador primario de la placa dentobacteriana. *S. sanguinis* contiene LTA, componente de la pared celular, que puede actuar como un importante PAMP, capaz de estimular la respuesta inmune del hospedero. Se ha demostrado que el LTA al ser reconocido por el receptor TLR 2 promueve la activación de mecanismos de transducción como la vía de MAPKs y la activación de factores de transcripción incluyendo NF- κ B y AP-1(89–92), lo que conduce a la expresión de citocinas proinflamatorias y otros mediadores de la inflamación. Por otra parte, existen estudios que apoyan sustancialmente la idea de que los flavonoides poseen una actividad antiinflamatoria potencial y tienen la capacidad de modular la respuesta inmune (65) La naringina es uno de ellos, presente en el pericarpio de la toronja, a quien se le han atribuido un gran número de propiedades farmacológicas, incluyendo propiedades antiinflamatorias.

La presente investigación se abocó a investigar el efecto de la naringina sobre algunos sistemas de transducción de señales involucrados en la inflamación. Primeramente, hallamos que la naringina, a las concentraciones empleadas, no presentó ningún efecto citotóxico durante un ciclo celular, lo que sugiere que la activación de las vías de señalización intracelulares fue debida al estímulo con LTA y no a la naringina *per se*.

Demostramos que el LTA de *S. sanguinis* induce la activación de ERK 1/2, p38, JNK y del factor de transcripción NF- κ B, lo que promueve la expresión de IL-1 β en células H9c2. La activación de ERK 1/2, p38 y NF- κ B por LTA ha sido descrita previamente en macrófagos (93) y células de músculo liso traqueal (91).

El aumento de la actividad de las MAPKs y de NF- κ B, y su participación en la regulación de mediadores de la inflamación, los hacen objetivos potenciales para la terapéutica antiinflamatoria. En este estudio demostramos que la naringina es capaz de modular dichas vías de transducción activadas por LTA, inhibiendo la fosforilación de las MAPKs y la translocación de NF- κ B al núcleo, de manera

dependiente de la dosis. Otros estudios han demostrado que la naringina es capaz de atenuar la secreción de MUC5AC inducida por EGF en células A549, al inhibir la fosforilación de ERK 1/2, p38, JNK, NF- κ B y AP-1 (94). Así mismo, otros investigadores encontraron que en células H9c2 la naringina inhibió la fosforilación de p38 (88) y en células SH-SY5Y inhibió la fosforilación de p38 y JNK (84).

A nivel molecular, la vía de las MAPKs puede ser modulada por varios mecanismos en casi todos los pasos de la vía, que incluye la desensibilización del receptor y la desactivación de los mediadores de la vía. Sin embargo, al ser activadas por fosforilación, la desfosforilación, mediada por fosfatasas, es uno de los modos más eficientes de desactivación. Es probable que la naringina esté favoreciendo la desfosforilación de las cinasas activando a las fosfatasas, tales como MKP3 o bien, esté inhibiendo la fosforilación de las cinasas por unión competitiva al sitio de fijación de ATP, lo cual ya ha sido descrito como un medio de los flavonoides para inhibir la actividad de cinasas (95). Es importante notar que los flavonoides tienen una estrecha homología estructural con inhibidores específicos de la señalización de ERK y de PI3K, como son PD98059 y LY294002, respectivamente. Se ha demostrado que PD98059 *in vivo* actúa como un inhibidor altamente selectivo no competitivo de MEK 1, y LY294002 actúa como un inhibidor competitivo del sitio de ATP de PI3K. Esto plantea la posibilidad de que los flavonoides puedan actuar sobre estas vías de una manera similar.

Por otra parte, encontramos que la disminución en la fosforilación de las MAPKs fue dependiente de la concentración de naringina. Resultados similares demuestran que la quercetina es capaz de inhibir la liberación de IL-6 mediante la reducción en la fosforilación de p38 y PKC- θ de una manera dependiente de la dosis en mastocitos leucémicos humanos y en mastocitos humanos derivados de la sangre de cordón umbilical estimulados con IL-1 (96).

En células no estimuladas, NF- κ B unido a I κ B α se encuentra secuestrado en el citoplasma. La exposición de las células a diversos estímulos, tales como citocinas proinflamatorias, estrés oxidativo o endotoxinas bacterianas resultan en la

activación de NF- κ B a través de la fosforilación y degradación de I κ B α . NF- κ B activo es translocado al núcleo donde se une al elemento potenciador cis- κ B y activa la expresión de mediadores proinflamatorios. En este estudio, mediante un ensayo de inmunocitoquímica se determinó que el LTA induce la activación de NF- κ B favoreciendo la degradación de I κ B α y que la naringina es capaz de revertir este hecho. Diversos estudios han demostrado que la naringina suprime la activación de NF- κ B (72), principalmente, por inhibición de la fosforilación de I κ B α (73), evitando de esta forma la degradación de I κ B α , lo cual es consistente con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

La IL-1 β es un importante mediador de la respuesta inflamatoria. Está involucrado en una variedad de actividades celulares y su expresión génica es regulada por NF- κ B. Los resultados de esta investigación muestran que el LTA induce la expresión de esta citocina y que su expresión se disminuye por el tratamiento con naringina, lo cual puede ser consecuencia de la inhibición de la translocación de NF- κ B al núcleo por el tratamiento con naringina. Se ha demostrado que varios flavonoides pueden regular la producción de mediadores de la inflamación a través del bloqueo de la ruta de NF- κ B en diferentes niveles, que incluyen, la prevención de la translocación nuclear de las subunidades p50/p65 de NF- κ B, por la inhibición de la fosforilación y subsecuente degradación de la proteína I κ B α , por reducción en la actividad de IKK, o por el bloqueo en la unión ADN/ NF- κ B (66).

9. CONCLUSIÓN

En la presente investigación se determinó, en un modelo *in vitro*, que el flavonoide naringina es capaz de regular la vía de las proteínas MAPK al inhibir de manera dependiente de la dosis su fosforilación, activada por el reconocimiento celular del LTA de *S. sanguinis*. Así mismo, se determinó que la naringina puede regular la translocación de NF- κ B al núcleo y, como consecuencia disminuir la expresión de IL-1 β . Lo anterior proporciona una nueva visión de la actividad antiinflamatoria de los flavonoides, y eventualmente, puede conducir al desarrollo de una nueva clase de agentes antiinflamatorios de origen natural para el tratamiento de enfermedades como la EI.

10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hsiao Y-C, Kuo W-H, Chen P-N, Chang H-R, Lin T-H, Yang W-E, et al. Flavanone and 2'-OH flavanone inhibit metastasis of lung cancer cells via down-regulation of proteinases activities and MAPK pathway. *Chem Biol Interact.* 2007;167(3):193–206.
2. Jiang C-S, Liang L, Guo Y. Natural products possessing protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibitory activity found in the last decades. *Acta Pharmacol Sin.* 2012 ;33(10):1217–45.
3. Hendrich AB. Flavonoid-membrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds. *Acta Pharmacol Sin.* 2006;27(1):27–40.
4. Park CM, Song Y-S. Luteolin and luteolin-7-O-glucoside inhibit lipopolysaccharide-induced inflammatory responses through modulation of NF- κ B/AP-1/PI3K-Akt signaling cascades in RAW 264.7 cells. *Nutr Res Pract.* 2013;7(6):423–9.
5. Gutiérrez-Venegas G, Maldonado-Frías S, Ontiveros-Granados A, Kawasaki-Cárdenas P. Role of p38 in nitric oxide synthase and cyclooxygenase expression, and nitric oxide and PGE2 synthesis in human gingival fibroblasts stimulated with lipopolysaccharides. *Life Sci.* 2005;77(1):60–73.
6. Gutiérrez-Venegas G, Jiménez-Estrada M, Maldonado S. The effect of flavonoids on transduction mechanisms in lipopolysaccharide-treated human gingival fibroblasts. *Int Immunopharmacol.* 2007;7(9):1199–210.
7. Hong G-E, Kim J-A, Nagappan A, Yumnam S, Lee H-J, Kim E-H, et al. Flavonoids Identified from Korean *Scutellaria baicalensis* Georgi Inhibit Inflammatory Signaling by Suppressing Activation of NF- κ B and MAPK in RAW 264.7 Cells. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013:912031.
8. Reddy S. Anatomy and development of the structures of periodontium. Reddy S. *Essentials of Clinical Periodontology and Periodontics.* India: Jaypee Brothers Medical Publishers;2011. p. 3-7.
9. Arun K.V. Cells of the Periodontium. Arun K.V. *Molecular Biology of Periodontium.* India: Jaypee Brothers Medical Publishers;2010. p. 1–34.
10. Bathla S. Cement. Bathla S. *Periodontics Revisited.* India: Jaypee Brothers Medical Publishers;2011. p. 23–6.
11. Reddy S. Biology of Periodontal Tissues. Reddy S. *Essentials of Clinical Periodontology and Periodontics.* India: Jaypee Brothers Medical Publishers;2011. p. 8–27.
12. Bathla S. Periodontal Ligament. Bathla S. *Periodontics Revisited.* India: Jaypee Brothers Medical Publishers;2011. p. 16–22.
13. Bathla S. Alveolar Bone. Bathla S. *Periodontics Revisited.* India: Jaypee Brothers Medical Publishers;2011. p. 27–33.

14. Bathla S. Dental Plaque. Bathla S. Periodontics Revisited. India: Jaypee Brothers Medical Publishers;2011. p. 65–71.
15. Reddy S. Periodontal microbiology (Dental plaque). Reddy S. Essentials of Clinical Periodontology and Periodontics. India: Jaypee Brothers Medical Publishers;2011. p. 57–69.
16. Bathla S. Pathogenesis of Periodontal Diseases and Host Response. Bathla S. Periodontics Revisited. India: Jaypee Brothers Medical Publishers;2011. p. 89–95.
17. Meyer DH, Fives-taylor PM. Oral pathogens: from dental plaque to cardiac disease. *Curr Opin Microbiol.* 1998;1:88–95.
18. Kuo L-C, Polson AM, Kang T. Associations between periodontal diseases and systemic diseases: a review of the inter-relationships and interactions with diabetes, respiratory diseases, cardiovascular diseases and osteoporosis. *Public health.* 2008;122(4):417–33.
19. Oppermann RV, Weidlich P, Musskopf ML. Periodontal disease and systemic complications. *Braz Oral Res.* 2012;26 Supl 1:39–47.
20. Albandar JM. Epidemiology and risk factors of periodontal diseases. *Dent Clin N Am.* 2005;49(3):517–32.
21. Reddy S. Classification Systems of Periodontal Diseases. Reddy S. Essentials of Clinical Periodontology and Periodontics. India: Jaypee Brothers Medical Publishers;2011. p. 35–41.
22. Lindhe J, Lang NP, Karring T. Periodontología Clínica e Implantología odontológica. 5a ed. España: Editorial Médica Panamericana;2009.
23. Mattila KJ, Nieminen MS, Valtonen V V, Rasi VP, Kesäniemi Y a, Syrjälä SL, et al. Association between dental health and acute myocardial infarction. *BMJ.* 1989;298(6676):779–81.
24. Tomás I, Diz P, Tobías A, Scully C, Donos N. Periodontal health status and bacteraemia from daily oral activities: systematic review/meta-analysis. *J Clin Periodontol.* 2012;39(3):213–28.
25. Nicolosi LN. Endocarditis Infecciosa. Nuevas recomendaciones para su prevención . Guía de la American Heart Association 2007. Revista de la Facultad de Odontología (UBA). 2007;22:9–14.
26. Overholser CD, Moreillon P, Glauser MP. Experimental endocarditis following dental extractions in rats with periodontitis. *J Oral Maxillofac Surg.* 1988;46(10):857–61.
27. Infective Endocarditis Prophylaxis. p. 18–33.
28. Karchmer AW. Endocarditis Infecciosa. Longo DL, Kasper DL, Jameson JL, Fauci AS, Hauser SL, Loscalzo J, *editors.* Harrison Principios de Medicina Interna. España: Mc Graw Hill Interamericana; 2012. p. *

29. Gómez JF, Hattori Hara E. El dentista mexicano y la recomendación de la Asociación Americana del Corazón para la prevención de la endocarditis bacteriana. *ADM*. 2003;60(2):59–63.
30. Guía de Práctica Clínica Diagnóstico y Tratamiento de la Endocarditis Infecciosa. 2010.
31. Tornos P, Gonzalez-Alujas T, Thuny F, Habib G. Infective endocarditis: the European viewpoint. *Curr Probl Cardiol*. 2011;36(5):175–222.
32. Ameriso S, Barisani JL, Cianciulli T, Del Pont M. Diagnóstico y Evaluación de la Endocarditis. *Rev Argent Cardiol*. 2002;70:8–19.
33. Knox K, Hunter N. The role of oral bacteria in the pathogenesis of infective endocarditis. *Aust Dent J*. 1991;36(4):286–92.
34. Herzberg MC. Platelet-Streptococcal Interactions in Endocarditis. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1996;7(3):222–36.
35. Pérez JH, Catellanos L. Experiencia obtenida a lo largo de 16 años en el Hospital Juárez de México acerca de la endocarditis infecciosa. *Rev Hosp Jua Mex*. 2009;76(1):10–22.
36. Barreiro O, Sánchez F. Bases moleculares de las interacciones leucocito-endotelio durante la respuesta inflamatoria. *Rev Esp Cardiol*. 2009;62(5):1035–8.
37. Wilson W, Taubert KA, Gewitz M, Lockhart PB, Rowley AH, Burns JC, et al. Prevención de endocarditis infecciosa. Guías de la American Heart Association. *ADM*. 2007;64(4):131–57.
38. Habib G, Hoen B, Tornos P, Thuny F, Prendergast B, Vilacosta I, et al. Guía de práctica clínica para prevención, diagnóstico y tratamiento de la endocarditis infecciosa (nueva versión 2009). *Rev Esp Cardiol*. 2009;62(12):1465.e1–1465.e54.
39. Moreillon P, Que Y. Infective endocarditis. *Lancet*. 2004;363:139–49.
40. Patti JM, Allen BL, J MM, Hook M. MSCRAMM-Mediated Adherence of Microorganisms to Host Tissues. *Annu Rev Microbiol*. 1994;48:585–617.
41. Noh CI. Infective Endocarditis in Congenital Heart Disease Patients : It ' s Time to Pay More Attention ! *Korean Circ J*. 2006;36:252–4.
42. Bashore TM, Cabell C, Fowler V. Update on infective endocarditis. *Curr Probl Cardiol*. 2006;31(4):274–352.
43. Meyer MW, Gong K, Herzberg MC, Gong KE. Streptococcus sanguis -Induced Platelet Clotting in Rabbits and Hemodynamic and Cardiopulmonary Consequences. *Infection and Immunity*. 1998;66(12):5906–14.
44. Burnette-curley D, Wells V, Viscount H, Munro CL, Fenno JC, Macrina FL. FimA , a Major Virulence Factor Associated with Streptococcus parasanguis Endocarditis. *Infect Immun*. 1995;63(12):4669–74.

45. Reichmann NT, Gründling A. Location, synthesis and function of glycolipids and polyglycerolphosphate lipoteichoic acid in Gram-positive bacteria of the phylum Firmicutes. *FEMS Microbiol Lett.* 2011;319(2):97–105.
46. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature.* 2007;449:819–26.
47. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 2006;124(4):783–801.
48. Schnare M, Barton GM, Holt a C, Takeda K, Akira S, Medzhitov R. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 2001;2(10):947–50.
49. Keogh B, Parker AE. Toll-like receptors as targets for immune disorders. *Trends Pharmacol Sci.* 2011;32(7):435–42.
50. Ospelt C, Gay S. TLRs and chronic inflammation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42(4):495–505.
51. Ray A, Cot M, Puzo G, Gilleron M, Nigou J. Bacterial cell wall macroamphiphiles: pathogen-/microbe-associated molecular patterns detected by mammalian innate immune system. *Biochimie.* 2013;95(1):33–42.
52. Ginsburg I. Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation. *Lancet Infect Dis.* 2002;2:9–12.
53. Zähringer U, Lindner B, Inamura S, Heine H, Alexander C. TLR2 - promiscuous or specific? A critical re-evaluation of a receptor expressing apparent broad specificity. *Immunobiology.* 2008;213(3-4):205–24.
54. Neuhaus FC, Baddiley J. A Continuum of Anionic Charge: Structures and Functions of d-Alanyl-Teichoic Acids in Gram-Positive Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003;67(4).
55. Kang JY, Nan X, Jin MS, Youn S-J, Ryu YH, Mah S, et al. Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 heterodimer. *Immunity.* 2009;31(6):873–84.
56. Nau R. Minimizing the release of proinflammatory and toxic bacterial products within the host: A promising approach to improve outcome in life-threatening infections. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2005;44:1–16.
57. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell.* 2010;140(6):805–20.
58. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Semin Immunol.* 2007;19(1):24–32.
59. Zhong B, Tien P, Shu H-B. Innate immune responses: crosstalk of signaling and regulation of gene transcription. *Virology.* 2006;352(1):14–21.
60. Liu Y, Shepherd EG, Nelin LD. MAPK phosphatases--regulating the immune response. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(3):202–12.

61. Arthur JSC, Ley SC. Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(9):679–92.
62. Marais JPJ, Deavours B, Dixon RA, Ferreira D. The stereochemistry of flavonoids. Erich Grotewold, *editor*. *The Science of Flavonoids*. USA: Springer;2006. p 1–46.
63. Marcano D, Hasegawa M. *Fitoquímica orgánica*. 2ª ed. Venezuela: Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico;2002.
64. García-Lafuente A, Guillamón E, Villares A, Rostagno M a, Martínez JA. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflamm Res.* 2009;58(9):537–52.
65. Comalada M, Xaus J, Gálvez J. Flavonoids and Immunomodulation. Watson RR, Preedy VR, *editors*. *Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases*. USA: Academic Press;2013. p. 555-79.
66. Santangelo C, Vari R, Scazzocchio B, Di Benedetto R, Filesi C, Masella R. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Ann Ist Super Sanita.* 2007;43(4):394–405.
67. Jr WAV, Vicentini FTMC, Baracat MM. Flavonoids as Anti-Inflammatory and Analgesic Drugs : Mechanisms of Action and Perspectives in the Development of Pharmaceutical Forms. Rahman A, *editor*. *Studies in Natural Products Chemistry*. USA: Elsevier B.V;2012. p. 297–330.
68. Kanno S, Shouji A, Hirata R, Asou K, Ishikawa M. Effects of naringin on cytosine arabinoside (Ara-C)-induced cytotoxicity and apoptosis in PP38 cells. *Life Sci.* 2004;75:353–65.
69. Gopinath K, Sudhandiran G. Naringin modulates oxidative stress and inflammation in 3-nitropropionic acid-induced neurodegeneration through the activation of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 signalling pathway. *Neuroscience.* 2012;227:134–43.
70. Kim S-H, Zo J-H, Kim M-A, Hwang K-K, Chae I-H, Kim H-S, et al. Naringin suppresses the mitogenic effect of lysophosphatidylcholine on vascular smooth muscle cells. *Nutr Res.* 2003;23(12):1671–83.
71. Luo Y, Li P, Zhang C. Effects of four antitussives on airway neurogenic inflammation in a guinea pig model of chronic cough induced by cigarette smoke exposure. *Inflamm. Res.* 2013;62:1053–61.
72. Kanno S-I, Shouji A, Tomizawa A, Hiura T, Osanai Y, Ujibe M, et al. Inhibitory effect of naringin on lipopolysaccharide (LPS)-induced endotoxin shock in mice and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. *Life Sci.* 2006;78(7):673-81.
73. Liu Y, Wu H, Nie Y-C, Chen J-L, Su W-W, Li P-B. Naringin attenuates acute lung injury in LPS-treated mice by inhibiting NF-κB pathway. *Int immunopharmacol.* 2011;11(10):1606–12.

74. Kawaguchi K, Maruyama H, Hasunuma R, Kumazawa Y. Suppression of inflammatory responses after onset of collagen-induced arthritis in mice by oral administration of the Citrus flavanone naringin. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2011;33(4):723–9.
75. Ribeiro IA., Rocha J, Sepodes B, Mota-Filipe H, Ribeiro MH. Effect of naringin enzymatic hydrolysis towards naringenin on the anti-inflammatory activity of both compounds. *J Mol Cata B Enzyma*. 2008;52-53:13–8.
76. Prota L, Santoro A, Bifulco M, Aquino RP, Mencherini T, Russo P. Leucine enhances aerosol performance of naringin dry powder and its activity on cystic fibrosis airway epithelial cells. *Int J Pharm*. 2011;412(1-2):8–19.
77. Ribeiro M, Barateiro A, Vila-Real H, Fernandes A. Anti-inflammatory effect of naringin and naringenin on TNF- α secretion in cultured cortical astrocytes after stimulation with LPS. *New Biotechnol*. 2009;25:S10–S11.
78. Amaro MI, Rocha J, Vila-Real H, Eduardo-Figueira M, Mota-Filipe H. Anti-inflammatory activity of naringin and the biosynthesized naringenin by naringinase immobilized in microstructured material in a model of DSS-induced colitis in mice. *Food Res Int*. 2009;42:1010–7.
79. Thangavel P, Vaiyapuri M. Antiproliferative and apoptotic effects of naringin on diethylnitrosamine induced hepatocellular carcinoma in rats. *Biomedicine & Aging Pathology*. 2013;3(2):59-64.
80. MJ M, E M, Pérez-Guerrero C. Antiulcer effect of naringin on gastric lesions induced by ethanol in rats. *Pharmacol*. 1994;49:144–50.
81. Ikemura M, Sasaki Y, Giddings J, Yamamoto J. Preventive effects of hesperidin, glucosyl hesperidin and naringin on hypertension and cerebral thrombosis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Phytotherapy Research*. 2012;26(9):1272–7.
82. Jagetia GC, Reddy TK. The grapefruit flavanone naringin protects against the radiation-induced genomic instability in the mice bone marrow: a micronucleus study. *Mutat res*. 2002;519:37–48.
83. Ang ESM, Yang X, Chen H, Liu Q, Zheng MH, Xu J. Naringin abrogates osteoclastogenesis and bone resorption via the inhibition of RANKL-induced NF- κ B and ERK activation. *FEBS letters*. 2011;585(17):2755–62.
84. Kim H, Song JY, Park HJ, Park H, Yun DH, Chung J. Naringin Protects against Rotenone-induced Apoptosis in Human SH-SY5Y Cells. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2009;13:281–5.
85. Gopinath K, Prakash D, Sudhandiran G. Neuroprotective effect of naringin, a dietary flavonoid against 3-Nitropropionic acid-induced neuronal apoptosis. *Neurochem Int*. 2011;59(7):1066–73.
86. Kandhare AD, Raygude KS, Ghosh P. Neuroprotective effect of naringin by modulation of endogenous biomarkers in streptozotocin induced painful diabetic neuropathy. *Fitoterapia*. 2012;83(4):650–9.

87. Gaur V, Aggarwai A, Kumar A. Protective effect of naringin against ischemic reperfusion cerebral injury: Possible neurobehavioral, biochemical and cellular alterations in rats. *Eur J Pharmacol.* 2009;616(1-3):147–54.
88. Huang H, Wu K, You Q, Huang R, Li S. Naringin inhibits high glucose-induced cardiomyocyte apoptosis by attenuating mitochondrial dysfunction and modulating the activation of the p38 signaling pathway. *Int J Mol Med.* 2013;32(2):396–402.
89. Cot M, Ray A, Gilleron M, Vercellone A, Larrouy-Maumus G, Armau E, et al. Lipoteichoic acid in *Streptomyces hygroscopicus*: structural model and immunomodulatory activities. *PLoS One.* 2011;6(10):e26316.
90. Lin C-H, Kuan I-H, Wang C-H, Lee H-M, Lee W-S, Sheu J-R, et al. Lipoteichoic acid-induced cyclooxygenase-2 expression requires activations of p44/42 and p38 mitogen-activated protein kinase signal pathways. *Eur J Pharmacol.* 2002 Aug 16;450(1):1–9.
91. Lee C-W, Chien C-S, Yang C-M. Lipoteichoic acid-stimulated p42/p44 MAPK activation via Toll-like receptor 2 in tracheal smooth muscle cells. *Am J Physiol. Lung Cell Mol Physiol.* 2004;286(5):L921–30.
92. Kao S-J, Lei H-C, Kuo C-T, Chang M-S, Chen B-C, Chang Y-C, et al. Lipoteichoic acid induces nuclear factor-kappaB activation and nitric oxide synthase expression via phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, and p38 MAPK in RAW 264.7 macrophages. *Immunol.* 2005;115(3):366–74.
93. Chiu W-T, Lin Y-L, Chou C-W, Chen R-M. Propofol inhibits lipoteichoic acid-induced iNOS gene expression in macrophages possibly through downregulation of toll-like receptor 2-mediated activation of Raf-MEK1/2-ERK1/2-IKK-NFkappaB. *Chem Biol Interact.* 2009;181(3):430–9.
94. Nie Y, Wu H, Li P, Xie L, Luo Y, Shen J, et al. Naringin attenuates EGF-induced MUC5AC secretion in A549 cells by suppressing the cooperative activities of MAPKs-AP-1 and IKKs-IkB-NF-κB signaling pathways. *Eur J Pharmacol.* 2012;690(1-3):207–13.
95. Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev.* 2000;52(4):673–751.
96. Kandere-Grzybowska K, Kempuraj D, Cao J, Cetrulo CL, Theoharides TC. Regulation of IL-1-induced selective IL-6 release from human mast cells and inhibition by quercetin. *Br J Pharmacol.* 2006;148(2):208–15.