



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

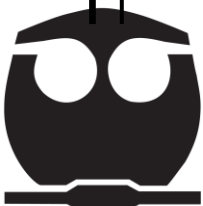
---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“El efecto de la rutina en la regulación  
de la inflamación inducida por PGN en  
H9c2”**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**  
**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**  
**PRESENTA**  
**MARTÍN MIZTLI VÁZQUEZ MORALES**



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.,

2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **JURADO ASIGNADO:**

- PRESIDENTE:**           **Profesor: Gloria Gutiérrez Venegas**
- VOCAL:**               **Profesor: Carmen Adriana Mendoza Rodríguez**
- SECRETARIO:**       **Profesor: José Pedraza Chaverri**
- 1er. SUPLENTE:**      **Profesor: Beatriz Ruíz Villafan**
- 2° SUPLENTE:**       **Profesor: Tzvetanka Dimitrova Dinkova**

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

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

## **ASESOR DEL TEMA:**

**Dra. Gloria Gutiérrez Venegas**

## **SUSTENTANTE:**

**Martín Miztli Vázquez Morales.**

## **AGRADECIMIENTOS**

Este proyecto fue financiado con el apoyo otorgado a la Doctora Gloria Gutiérrez por la dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) a través del programa de investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), proyecto IN201816.

## Índice

1. Resumen _____	1
2. Planteamiento del problema _____	2
3. Introducción _____	3
3.1 Marco histórico _____	3
3.2 Etiología _____	4
3.3 Fisiopatología _____	5
3.4 Infecciones bucales _____	5
3.5 Flora normal _____	5
3.5.1 Flora normal de boca _____	6
3.5.2 Placa dental _____	6
3.5.3 Patogenicidad bacteriana _____	7
3.5.4 Formación de placa dental _____	7
3.6 Inmunología _____	12
3.6.1 Respuesta Innata _____	13
3.6.2 Patrones Moleculares Asociados a Patógenos _____	14
3.6.3 Reconocimiento de los Patrones Moleculares Asociados a Patógenos _____	15
3.6.4 Vía de señalización _____	17
3.6.5 Regulación de la respuesta inflamatoria _____	19
3.7 Diagnóstico de la Endocarditis _____	19
3.7.1 Complicaciones _____	21
3.7.2 Tratamiento médico de la endocarditis _____	21
3.7.3 Tratamiento quirúrgico _____	22
3.7.4 Prevención _____	22
3.8 Flavonoides _____	23
3.8.1 Estructura química _____	24
3.8.2 Rutina _____	26

4. Objetivos _____	28
4.1 Objetivo general _____	28
4.2 Objetivos particulares _____	28
5. Hipótesis _____	29
6. Materiales y métodos _____	30
6.1 Línea celular _____	30
6.2 Cultivo celular _____	30
6.3 Tratamiento celular _____	30
6.4 Inmunoblotting o Western blot _____	31
7. Resultados _____	33
8. Discusión _____	38
9. Conclusiones _____	42
10. Bibliografía _____	43

## Lista de abreviaturas

<b>AP-1</b>	Proteína activadora 1.
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico.
<b>DMEM</b>	Medio Eagle modificado por Dulbecco.
<b>ERK</b>	Cinasa regulada extracelularmente.
<b>EI</b>	Endocarditis infecciosa.
<b>H9c2</b>	Línea celular de cardiomiocitos de ratón H9c2.
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferón gamma.
<b>IL-1</b>	Interleucina 1.
<b>IL-2</b>	Interleucina 2.
<b>IL-8</b>	Interleucina 8.
<b>IL-12</b>	Interleucina 12.
<b>IKK</b>	Cinasa de I $\kappa$ B.
<b>IRAK 1</b>	Cinasa 1 asociada al receptor de IL-1.
<b>IRAK 4</b>	Cinasa 4 asociada al receptor de IL-1.
<b>JNK</b>	Cinasa c-Jun N-terminal.
<b>LDL</b>	Lipoproteínas de baja densidad.
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido.
<b>LRR</b>	Repetición rica en leucina.
<b>MAPK</b>	Proteína cinasa activada por mitógenos.
<b>MyD88</b>	Factor de diferenciación mieloide 88.
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Factor citoplásmico Kappa B.
<b>NOD</b>	Dominio de oligomerización de unión de nucleótidos.
<b>PGN</b>	Peptidoglicano.
<b>PRR</b>	Receptores de reconocimiento a patógenos.
<b>P38</b>	Proteína cinasa p38.
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico.
<b>PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida.
<b>PAMP</b>	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos.
<b>pH</b>	$-\log [H^+]$ .
<b>pKa</b>	$-\log [Ka]$ .
<b>PVDF</b>	Polifluoruro de vinilideno.
<b>TAK 1</b>	Cinasa activada de TGF- $\beta$ .
<b>TAB 1</b>	Proteínas de unión a TAK-1.
<b>TIR</b>	Receptor Toll/ IL-1.
<b>TLR</b>	Receptor tipo Toll.
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa.
<b>TRAF6</b>	Factores asociados al receptor de TNF.
<b><math>\mu</math>m</b>	Micrómetro.
<b>Ubc13E2</b>	Proteína de conjugación de ubiquitina UBC13.
<b>Uev1A</b>	Enzima de conjugación de ubiquitina E2 variante 1A.
<b>NAG</b>	N-acetilglucosamina
<b>NAM</b>	Ácido N-acetilmurámico

## Índice de Figuras

	Página
Figura 1 Tejidos dentarios_____	6
Figura 2 Colonización primaria _____	8
Figura 3 Formación de placa_____	8
Figura 4 Adherencia _____	9
Figura 5 Colonización secundaria _____	9
Figura 6 Formación de una biopelícula _____	10
Figura 7 Esquema del patrón vascular de la pulpa_____	11
Figura 8 Diagrama esquemático de la encía _____	12
Figura 9 Peptidoglicano _____	15
Figura 10 Activación celular mediada por ligandos de TLR (receptores del tipo Toll)_____	16
Figura 11 Casacada de señalización dependiente de los receptores Toll_____	18
Figura 12 Estructura básica del flavonoide_____	24
Figura 13 Características de los principales tipos de Flavonoides _____	25
Figura 14 Rutina _____	26
Figura 15 Curvas de curso Temporal_____	34
Figura 16 Curvas de Dosis-Respuesta_____	35
Figura 17 Curvas de Pre-tratamiento con Rutina_____	37



## Índice de tablas

	Página
Tabla 1 Criterios de Duke para el diagnóstico clínico de endocarditis infecciosa. Criterios mayores _____	20
Tabla 2 Criterios de Duke para el diagnóstico clínico de endocarditis infecciosa. Criterios menores _____	21

## 1. Resumen

Las enfermedades cardiacas presentan un grave problema a nivel mundial. En México es la primera causa de muerte, entre ellas la endocarditis infecciosa (EI) genera una mortalidad de hasta 40% cuando no se recibe tratamiento adecuado. La endocarditis infecciosa es una enfermedad sistémica que se clasifica como crónica o aguda. La causa principal se relaciona con infecciones bucales por la relación entre microorganismos causantes de la enfermedad y microorganismos de flora normal de boca. El sistema inmunológico se encarga de proteger al cuerpo por medio de diferentes mecanismos. La respuesta innata es la primera línea de defensa cuando un tejido sufre una lesión. Las células de la respuesta innata, a través de sus receptores de reconocimiento a patógenos (PRR), reconocen a los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) iniciando la activación de la vía proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) que tiene como resultado la translocación a núcleo del factor citoplásmico Kappa B (NF- $\kappa$ B) y la proteína activadora 1 (AP-1) promoviendo la transcripción y síntesis de citocinas pro-inflamatorias. Se busca caracterizar los efectos de la rutina (flavonoide) en la activación de cinasas involucradas en inducir respuestas inflamatorias en la línea celular de cardiomiocitos de ratón H9c2 (H9c2) inducidas por peptidoglicano (PGN). Para medir la expresión de cinasas por medio de la técnica de Western blot se realizaron ensayos de curso temporal en los que se observó un incremento de la fosforilación con relación al tiempo. Así mismo, se realizaron ensayos dosis-respuesta, en los cuales se observó un incremento de la fosforilación de la cinasa regulada extracelularmente (ERK) y la cinasa c-Jun N-terminal (JNK) a 10  $\mu$ g/mL y para la proteína cinasa p38 (p38) a 5  $\mu$ g/mL. El pre-tratamiento con rutina inhibió la fosforilación de ERK, p38 y JNK fue dosis-dependiente todos tratados con PGN. Con los resultados obtenidos concluimos que el pre-tratamiento con rutina regula procesos inflamatorios estimulados por PGN en cardiomiocitos de ratón.

## 2. Planteamiento del problema

Cifras mundiales nos indican que la frecuencia de un infarto agudo al miocardio es cada cuatro segundos, mientras que para un evento vascular cerebral es cada cinco segundos.<sup>1</sup>

La enfermedad cardíaca se puede presentar en pacientes con patología reumática, cardiopatías congénitas y drogadictos con administración intravenosa. Se produce una vegetación en una válvula cardíaca, prótesis valvular o defecto septal en el momento que se conjugan un factor condicionante (enfermedades periodontales) y un microorganismo.<sup>2</sup>

La gingivitis involucra inflamación causada por placa dento-bacteriana que se presenta al inicio de la enfermedad periodontal; es una infección que llega a dañar múltiples órganos y causar cambios patológicos. La enfermedad gingival es la segunda causa de muerte relacionada a una alteración bucodental perjudicando a tres cuartas partes de la población, iniciando desde la niñez temprana.<sup>3, 4</sup>

La endocarditis infecciosa (EI) genera alta mortalidad, de alrededor de 40%, cuando no se recibe el tratamiento adecuado. La resistencia microbiana es un problema a nivel mundial provocado por el uso irracional de antibióticos. Al no seguir los tratamientos adecuadamente se generan cepas de microorganismos cada vez más resistentes.

El diagnóstico oportuno y el correcto tratamiento de pacientes con ésta enfermedad brindará una mejor calidad de vida. En pacientes con alto riesgo de contraer la enfermedad, la identificación oportuna permitirá utilizar medidas de prevención y así reducir el riesgo de contraer la enfermedad en ese subgrupo de pacientes.<sup>2</sup>

### **3. Introducción**

#### **3.1 Marco histórico**

Durante el siglo XX las ciencias de la salud como Medicina y Odontología buscan las causas de enfermedades sistémicas. Willoughby D. Miller y William Hunter divulgaron que la causa principal de las enfermedades sistémicas son las infecciones bucales. Durante la “era de la infección focal”, Médicos y Odontólogos estarían de acuerdo con la idea que una infección localizada (p. ej. periodontitis) se disemina por torrente sanguíneo y causaría enfermedades sistémicas.

Willoughby D. Miller sustentó en su trabajo “The human mouth as a focus of infection”<sup>5</sup> que la flora bucal causa enfermedades sistémicas mientras que William Hunter en una conferencia de la Universidad de McGill sostuvo que las malas prácticas odontológicas (coronas, puentes y prótesis rodeados de “masa séptica”) son causa de la mayoría de las enfermedades sistémicas. Entonces la periodontitis, caries y mala higiene son antecedentes que indican el inicio de enfermedades sistémicas.

Se conoce bien que las infecciones por flora normal bucal provocan alteraciones sistémicas, para así evitar estas alteraciones la Academia Americana de Periodontología sugiere que “se informe a los pacientes y a los proveedores de atención de la salud que el tratamiento periodontal puede prevenir la aparición o la progresión de enfermedades inducidas por aterosclerosis”.<sup>6</sup>

La causa principal de la EI es el paso de microorganismos desde sus sitios habituales a tejido cardiaco. Cuando algún tejido se ve comprometido por causa de una lesión, por ejemplo procedimientos dentales que produzcan sangrado, infecciones en otras localizaciones o drogadicción intravenosa, es más fácil que bacterias ingresen a torrente sanguíneo causando la bacteriemia. Las lesiones provocadas en válvulas cardiacas, endocardio, miocardio y pericardio se llaman vegetaciones.<sup>2</sup>

La endocarditis producida por infección se clasifica en:

- Crónica, su evolución es por un periodo largo, presenta fiebre, debilidad y soplos cardiacos. Cuando no se recibe el tratamiento adecuado lleva a la muerte del paciente, es causada por *Coxiella burnetti*.
- Subaguda, el padecimiento se desarrolla por más de dos semanas, es principalmente producida por *Streptococcus viridans*, y el padecimiento es silencioso y provoca complicaciones como embolismo o insuficiencia cardiaca.
- Aguda, a falta de tratamiento puede llevar a la muerte en menos de dos semanas de desarrollo por una sepsis, causada por *Staphylococcus aureus*.<sup>2</sup>

### **3.2 Etiología**

La etiología de la EI es debido a:

- Infecciones pre-quirúrgicas y post-quirúrgicas.
- Infecciones bucales o de vías urinarias.
- Cirugías dentales
- Alteraciones cardiacas como cardiopatía congénita o valvular.
- Drogadictos por administración parenteral.
- Infecciones por catéter. <sup>7</sup>

### **3.3 Fisiopatología**

En ocasiones el paciente suele padecer de un defecto septal, tener una válvula cardiaca o prótesis valvular donde es más fácil la colonización del microorganismo patógeno, después de la colonización en estas regiones se inicia la inflamación provocando necrosis del tejido, entonces con el proceso de coagulación en la cual la formación de fibrina y agregación plaquetaria ayudan a la formación del trombo, entre las redes de fibrina es donde los microorganismos patógenos colonizan generando vegetaciones valvulares, endocárdicas o endoteliales. Las vegetaciones formadas en esta zona pueden fragmentarse y diseminarse por vía sanguínea a arterias de la circulación coronaria, cerebral, renal y extremidades, en casos de que afecte un vaso de tamaño pequeño puede provocar infarto en la región, endarteritis séptica, formación de aneurismas y ruptura. Esta colonización estimula al sistema inmunológico para generar una respuesta al daño.<sup>2</sup>

### **3.4 Infecciones bucales**

Las lesiones relacionadas con la endocarditis comúnmente son infecciones bucales porque se ha demostrado que en la mayoría de los casos existe una relación entre los microorganismos causantes de la enfermedad y microorganismos de flora normal de la boca, además de que los síntomas de la enfermedad se presentan después de infecciones bucales o procedimientos quirúrgicos.<sup>2</sup>

### **3.5 Flora normal**

El conjunto de microorganismos que se encuentran de forma natural en distintos sitios del cuerpo (piel, boca, tracto respiratorio, gastrointestinal) en un individuo sano se denomina flora normal.<sup>8</sup> La flora normal se clasifica en dos grupos:

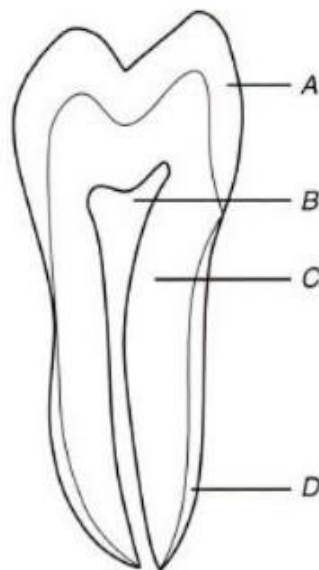
- Simbiontes/mutualistas. Generan alguna beneficio al huésped, p. ej. evitan colonización de patógenos.
- Comensales. No generan beneficio ni perjuicio al huésped.<sup>9</sup>

### 3.5.1 Flora normal de boca

En la flora normal de la boca existe una gran variedad de microorganismos. Después del nacimiento. Los estreptococos viridans colonizan la boca. Con el tiempo colonizan la boca estafilococos, diplococos (*Neisseria*), difteroides y lactobacilos. En la etapa de dentición se agregan espiroquetas, bacteroides, fusobacterias, vibriones y lactobacilos.<sup>8</sup>

### 3.5.2 Placa dental

Cuando no se siguen las recomendaciones de higiene bucal, los microorganismos de la flora bucal se acumulan en piezas dentales formando biofilms. Esto provoca que bacterias se establezcan y produzcan diferentes factores de virulencia que dañan dientes (esmalte, dentina, cemento, pulpa) (Figura 1), así como tejidos del sostén (periodonto). El daño al esmalte (descalcificación) por bacterias que generan acidez inicia el proceso de caries dental. Daños al hueso alveolar producido en la enfermedad periodontal destruyen el hueso alveolar. Pacientes con enfermedad periodontal no siguen las recomendaciones de higiene bucal.<sup>6, 10,11</sup>



**Figura 1. Tejidos dentarios.**

El diente está integrado por tejidos que en conjunto entre si cumplen los objetivos de sus funciones. A. esmalte; B. pulpa; C. dentina; D. cemento.<sup>10</sup>

### **3.5.3 Patogenicidad bacteriana**

La capacidad de un microorganismo de causar una lesión se denomina patogenicidad y la intensidad de la patogenicidad se llama virulencia. Los factores de virulencia son codificados por el genoma del microorganismo y permiten colonizar, invadir y provocar enfermedad en el huésped. Existen tres mecanismos de patogenicidad: adhesividad, invasividad y toxigenicidad.<sup>9</sup>

### **3.5.4 Formación de la placa dental**

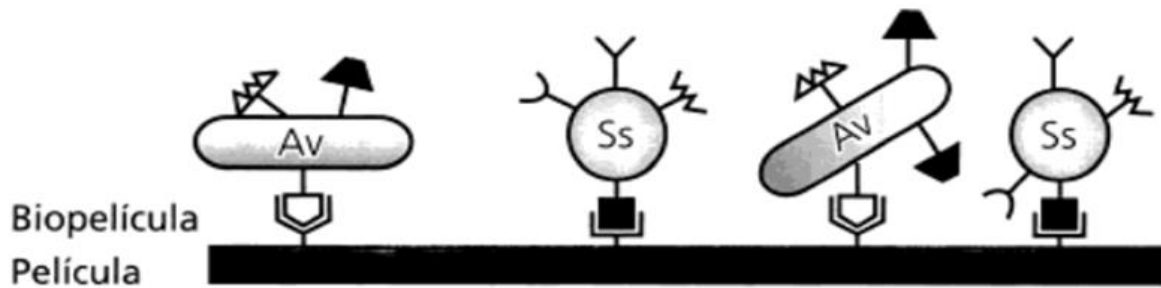
Las adhesinas son las proteínas encargadas de la adherencia bacteriana, la cual es una característica de la mayoría de las bacterias. Es irreversible, es el inicio de la colonización y con relación a las bacterias patógenas permite la liberación de factores de virulencia.<sup>6, 12</sup>

Las principales características que ayudan a la bacteria en la formación de la biopelícula son:

- Cargas y superficies libres de energía.
- Hidrofobicidad de los microorganismos.
- Adhesinas.
- Polisacáridos extracelulares.<sup>12, 13</sup>

El inicio de la formación de la placa dental inicia con macromoléculas hidrófobas que se adsorben en superficies bucales después de comer formando a lo que se denomina película condicionante formada por glucoproteínas salivales (mucinas) incrementando la adherencia bacteriana. Las principales bacterias que se adhieren son cocos gram positivos anaerobios facultativos, principalmente *Streptococcus sanguinis* dando lugar a la colonización primaria (Figura 2).

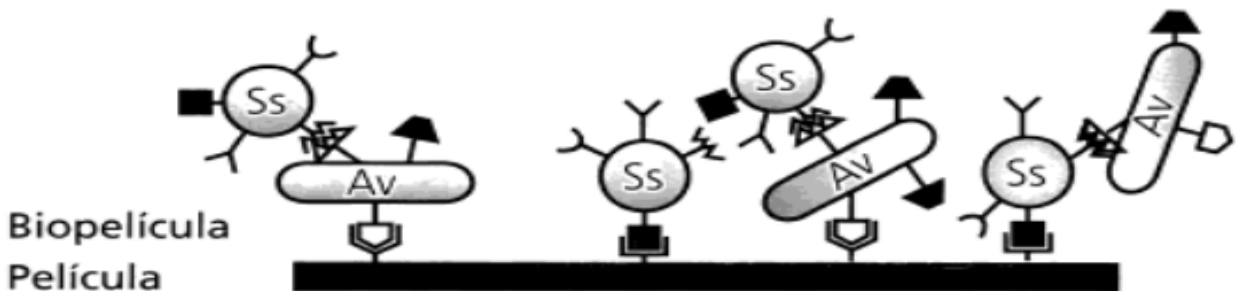




**Figura 2. Colonización primaria.**

Las macromoléculas hidrófobas adsorbidas en las superficies bucales incrementa la adherencia bacteriana, colonización con predominio de bacterias facultativas gram positivas. Ss: *Streptococcus sanguinis* es el microorganismo dominante. Av: las especies de *Actinomyces*.<sup>6</sup>

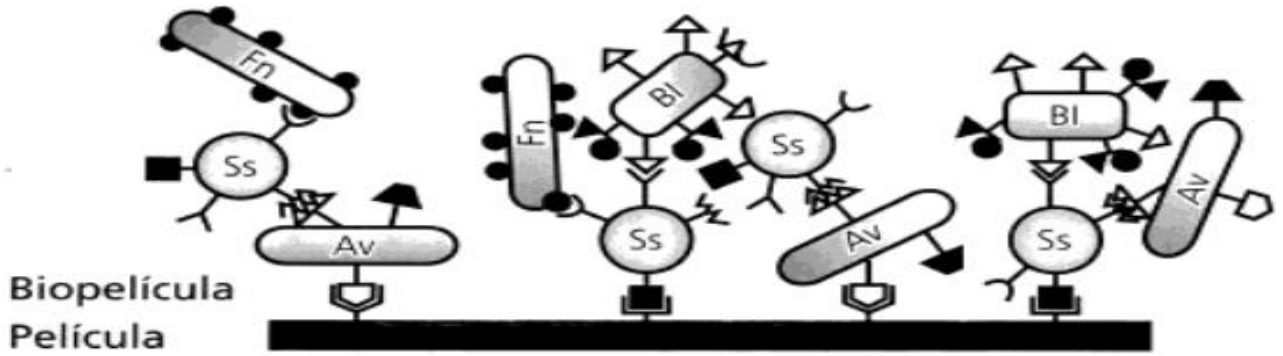
La película condicionante comienza a aumentar en volumen por crecimiento bacteriano y adhesión de otras bacterias, en esta etapa bacilos gram positivos aumentan su población (Figura 3).



**Figura 3. Formación de placa.**

Por crecimiento bacteriano y adhesión de otras bacterias (cocos y bacilos facultativos gram positivos) aumenta la biopelícula.<sup>6</sup>

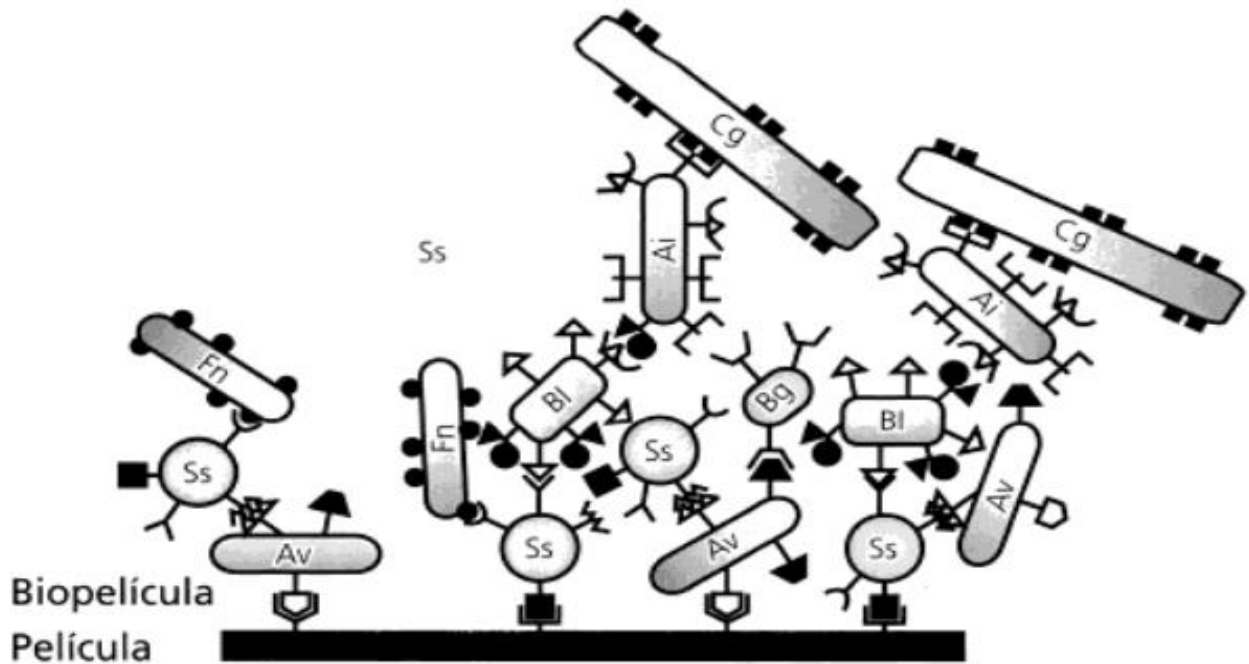
Establecidos estos microorganismos, sus receptores permiten la adherencia de microorganismos gram negativos como p. ej. *Veionella*, fusobacterias y bacterias gram negativas anaerobias (Figura 4).



**Figura 4. Adherencia.**

Las colonizaciones primarias por cocos y bacilos facultativos gram positivas ayudan la adherencia de microorganismos gram negativos. Fn: *Fusobacterium nucleatum*, BI: *Prevotella intermedia*.<sup>6</sup>

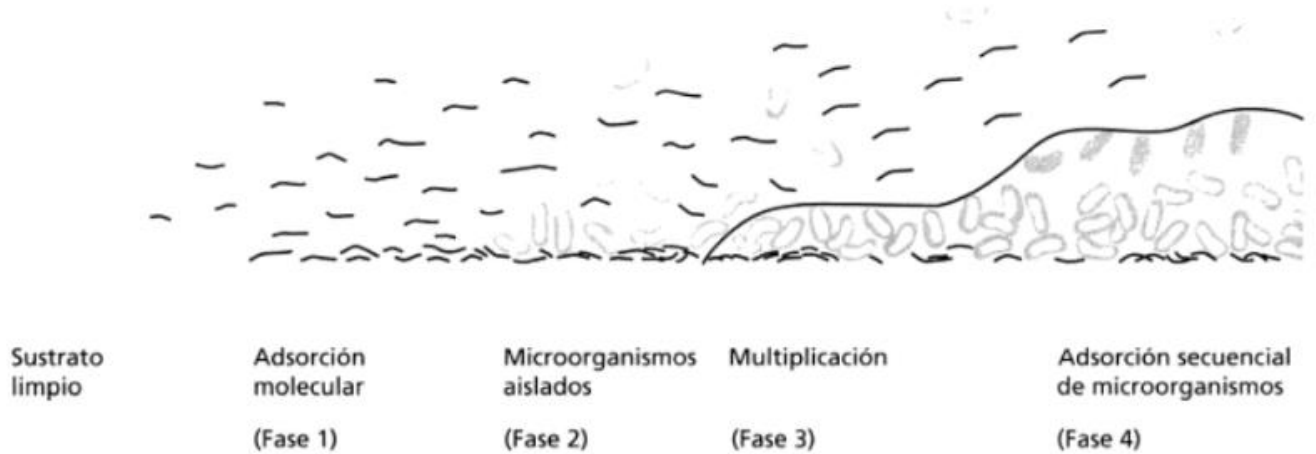
La colonización aumenta con microorganismos gram negativos los cuales aumentan la patogenicidad de la biopelícula, el intercambio de nutrientes y producción de bactericidas (Figura 5).



**Figura 5. Colonización secundaria.**

Con el desarrollo de la biopelícula, la colonización secundaria aumenta la patogenicidad de la biopelícula con microorganismos como *Porphyromonas gingivalis*. Bg: *Porphyromonas gingivalis*; Cg: especie de *Capnocytophaga*.<sup>6</sup>

La biopelícula (Figura 6) provoca que en la matriz el paso del oxígeno y nutrientes se vuelva escaso generando un ambiente anaeróbico y las bacterias presentes inicien procesos de fermentación.<sup>6</sup>



**Figura 6. Formación de biopelícula.**

Proceso por el cual se forma la biopelícula, principalmente son 4 etapas, la fase 1 donde sucede la adsorción molecular y así establecer la base de la colonización, la colonización primaria en la fase 2, el crecimiento de la matriz extracelular y crecimiento bacteriano en la fase 3 y por último la colonización secundaria en la etapa 4.<sup>6</sup>

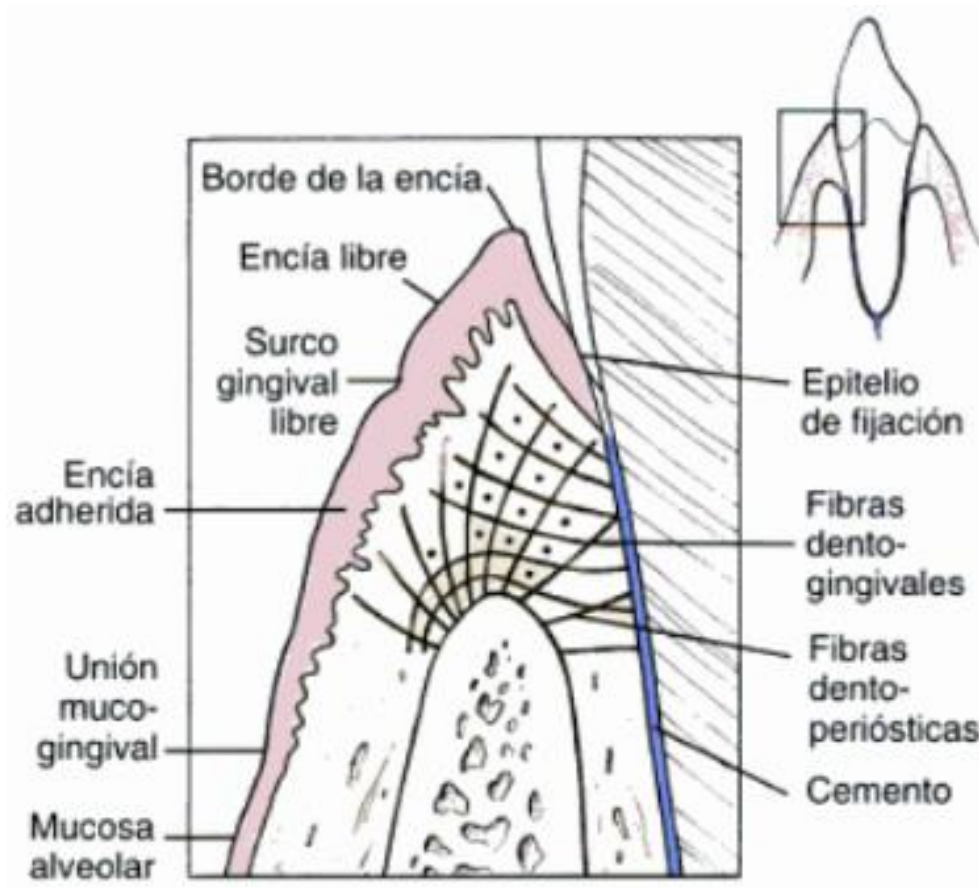
Las bacterias que se encuentran en la matriz de la biopelícula, generan enzimas hidrolíticas que degradan péptidos, dañando el esmalte, accediendo a la pulpa que nutre a los odontoblastos para así obtener su principal fuente nutricional por medio de una microcirculación que dispone nutrientes y desecha productos de su metabolismo (Figura 7).



**Figura 7. Esquema del patrón vascular de la pulpa.**

En la pulpa se produce la microcirculación que tiene por objetivo una microcirculación para contribuir con el aporte de nutrientes y retirar desechos metabólicos.<sup>10</sup>

Las células epiteliales de la encía (Figura 8) por sus funciones de protección, defensa y sostén, ante alguna infección o daño se encargan de sintetizar citoquinas, moléculas de adhesión, factores de crecimiento y enzimas, además de péptidos antimicrobianos. Los residuos de los microorganismos generan inflamación facilitando el acceso a nutrientes y promoviendo el aumento de especies bacterianas gram negativas.<sup>6, 14</sup>



**Figura 8. Diagrama esquemático de la encía.**

El diagrama es una vista del rectángulo señalado del diente. Se observa la unión entre el epitelio gingival y el esmalte del diente. Las líneas negras simbolizan fibras colágenas del cemento del diente y de la cresta del hueso alveolar que se propagan por el epitelio gingival.<sup>11</sup>

### 3.6 Inmunología

El sistema inmunológico tiene como objetivo proteger al organismo por diferentes mecanismos frente a infecciones generadas por diferentes microorganismos.

El sistema inmunológico presenta barreras para evitar colonización e infección de microorganismos, estas barreras son:

- Físicas: piel, mucosas, lágrimas, saliva.
- Químicas:  $-\log [H^+]$  (pH).
- Biológicas: Flora normal.

La piel es la primera barrera física, evita que microorganismos entren al organismo. Las mucosas evitan adherencia a las células epiteliales, los antígenos son atrapados por el moco y eliminados por movimientos ciliares, además de tener una función de lavado contienen enzimas que altera la estructura microbiana.

El pH es diferente en partes del cuerpo como piel, estómago, sudor que impide la supervivencia de microorganismos. La flora normal por antagonismo evita colonización de muchos órganos. Cuando la flora normal se elimina por uso inadecuado de antibióticos la susceptibilidad del huésped de tener alguna infección por microorganismos oportunistas aumenta.<sup>15</sup>

### **3.6.1 Respuesta innata**

La respuesta inmunológica está compuesta de respuesta innata y adaptativa. La respuesta innata es la primera línea de defensa que actúa cuando un tejido sufre una lesión y el microorganismo patógeno logra penetrar. Células como monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos y células dendrítica reconocen el antígeno para fagocitarlo, destruirlo e inducir inflamación, para después activar la respuesta adaptativa que es efectuada por linfocitos T y B.<sup>12,16</sup> Las células de la respuesta innata reconocen antígenos por medio de moléculas específicas, como lo son los receptores llamados receptores de reconocimiento a patógenos (PRR) que pueden ser:

- Los receptores tipo Toll (TLR), reconocen moléculas presentes en microorganismos llamados Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMP) p. ej. lipopolisacarido (LPS), peptidoglicano (PGN), ácido lipoteicoico y ácido desoxirribonucleico (DNA) bacteriano, iniciando la respuesta inflamatoria por medio del factor de transcripción factor citoplásmico Kappa B (NF-κB) para citosinas como factor de necrosis tumoral alfa (TNFα), Interferón gamma (IFN-γ), Interleucina 1 (IL-1), Interleucina 2 (IL-2), Interleucina 8 (IL-8), Interleucina 12 (IL-12) y defensinas.

- Receptores NOD (Dominio de oligomerización de unión de nucleótidos).
- Secretados como el complemento y lectinas, el complemento cumple una función de opsonización, quimiotaxis y activación de leucocitos.
- Expresados por la pared celular para inducir endocitosis p. ej. Receptores de manosa.

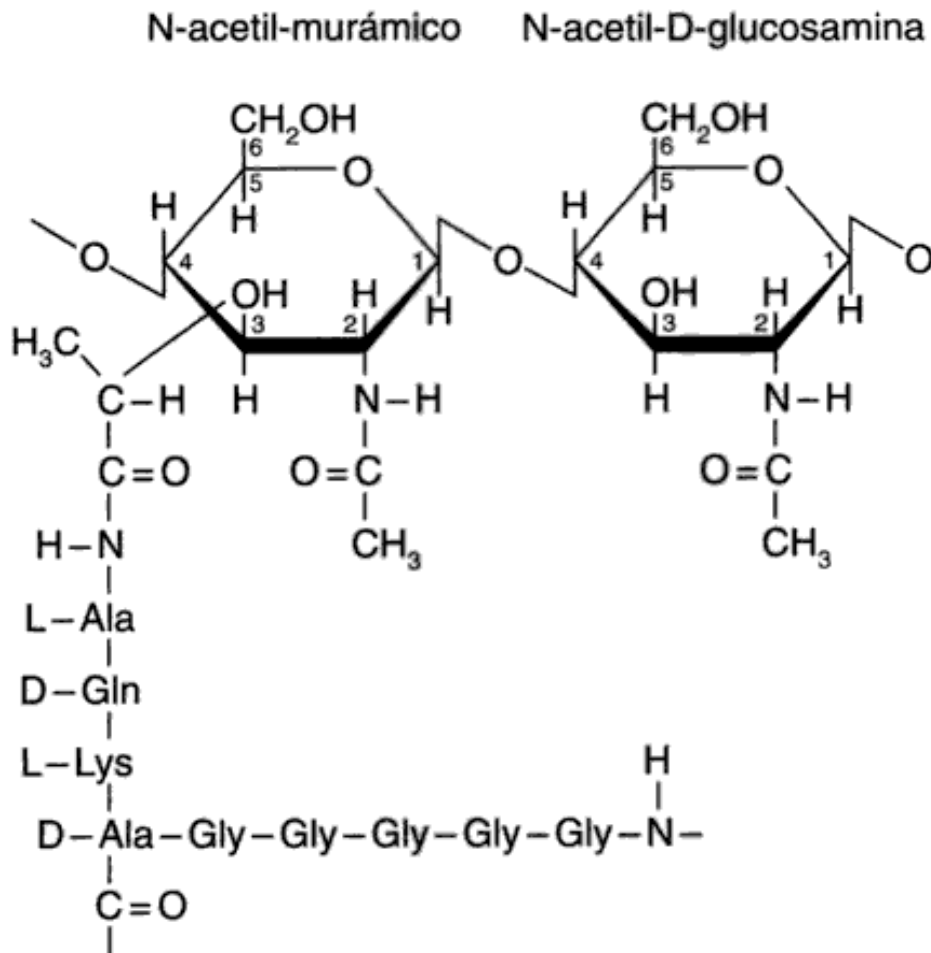
### 3.6.2 PAMP

Las PAMP son moléculas presentes en microorganismos y sus principales características son:

- Expresarse en patógenos procariotas.
- Son moléculas altamente conservadas, lo que significa que tienen una tasa de mutación muy baja y son fundamentales para la patogenicidad de estos microorganismos.
- Microorganismos relacionados pueden expresar PAMP idénticos como el caso de las bacterias gram negativas que expresan LPS.

Las bacterias son patógenas porque tienen la capacidad de generar diferentes factores de virulencia, como síntesis de exotoxinas y liberación de endotoxinas. La síntesis de enzimas p. ej. proteasas y DNAsas, evitan la fagocitosis, variación de fase, la propiedad de generar cápsula, movimiento por flagelo, pilis.<sup>12</sup>

El PGN (Figura 9) es una macromolécula que constituye la estructura de la pared celular de bacterias gram negativas y gram positivas (además de ácidos teicoicos), está integrado por N-acetilglucosamina (NAG) y ácido N-acetilmurámico (NAM) unidos por un enlace glicosídico  $\beta$  (1-4), además de un tetrapéptido L-alanina, D-alanina, ácido D-glutámico o D-glutamina y L-lisina o bien ácido mesodiaminopimérico, L-lisina, L-hidroxilisina u ornitina dependiendo de la especie bacteriana, el aminoácido que se une covalentemente a la bacteria generalmente es la D-alanina. Tiene la función de brindar soporte y rigidez a la bacteria, especificidad antigénica bacteriana y virulencia.<sup>17</sup>



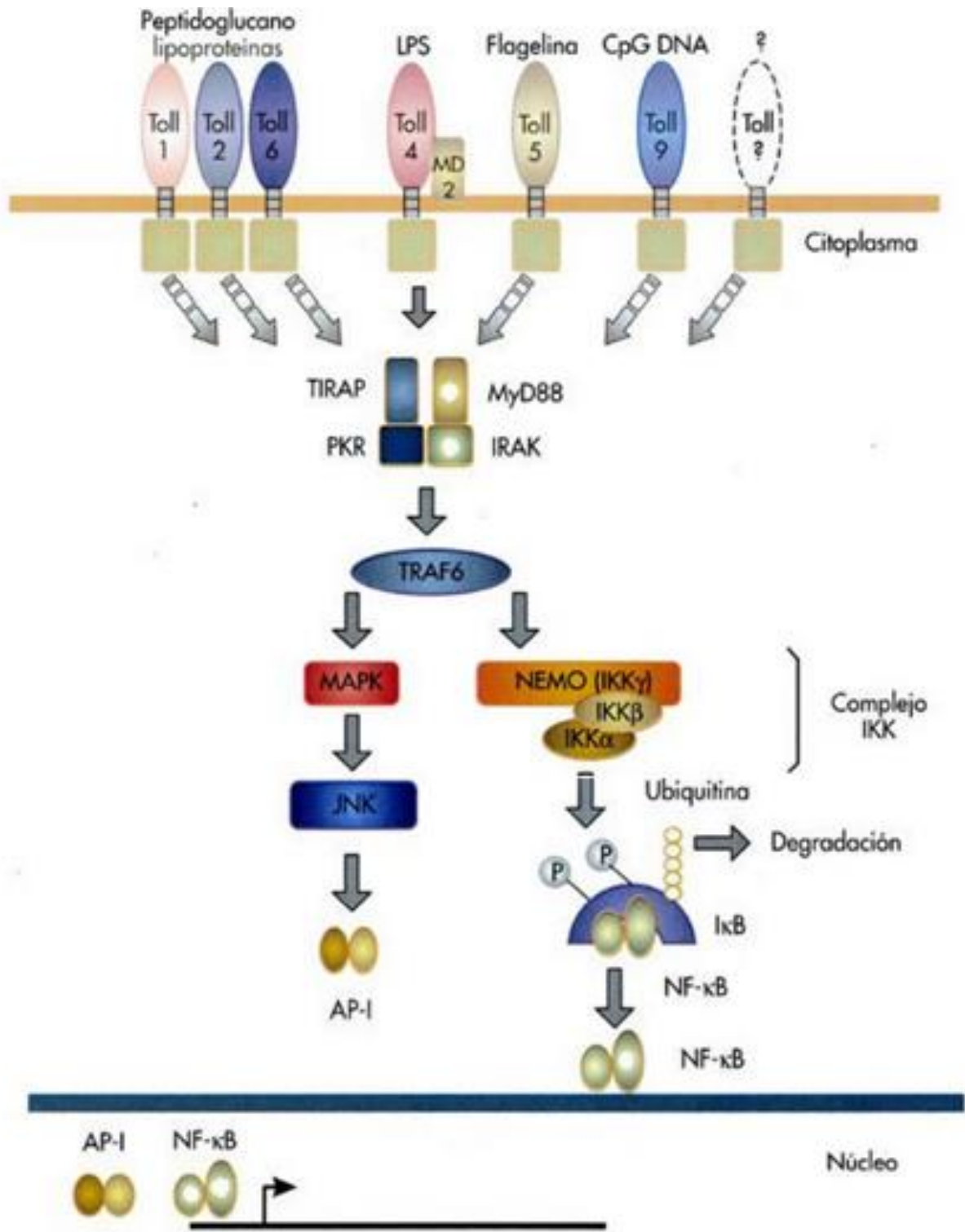
**Figura 9. Peptidoglicano**

Estructura del PGN integrado por N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico unidos por un enlace glicosídico β (1-4) además de un tetrapéptido. <sup>17</sup>

### 3.6.3 Reconocimiento de los PAMPs

Los receptores Toll fueron descubiertos en 1996, este descubrimiento fue hecho en *Drosophilla*. Estos receptores Toll son conservados evolutivamente de moscas hasta humanos, son elementales para la respuesta innata ya que son receptores que reconocen los PAMPs. El número de TLRs que se conocen son 11, son proteínas trans-membranales tipo I con un ectodominio extracelular que tiene dominios repetidos en leucina (LRRs) junto con una o dos regiones con abundante cisteínas y un receptor Toll/IL-1 (TIR). El dominio TIR inicia la cascada de señalización <sup>12</sup> (Figura 10).





**Figura 10. Activación celular mediada por ligandos de TLR.**

Antígenos conservados presentes en diferentes patógenos que emplean TLR como transductores de señales los cuales involucran moléculas MyD88, IRAK y TRAF6. <sup>18</sup>

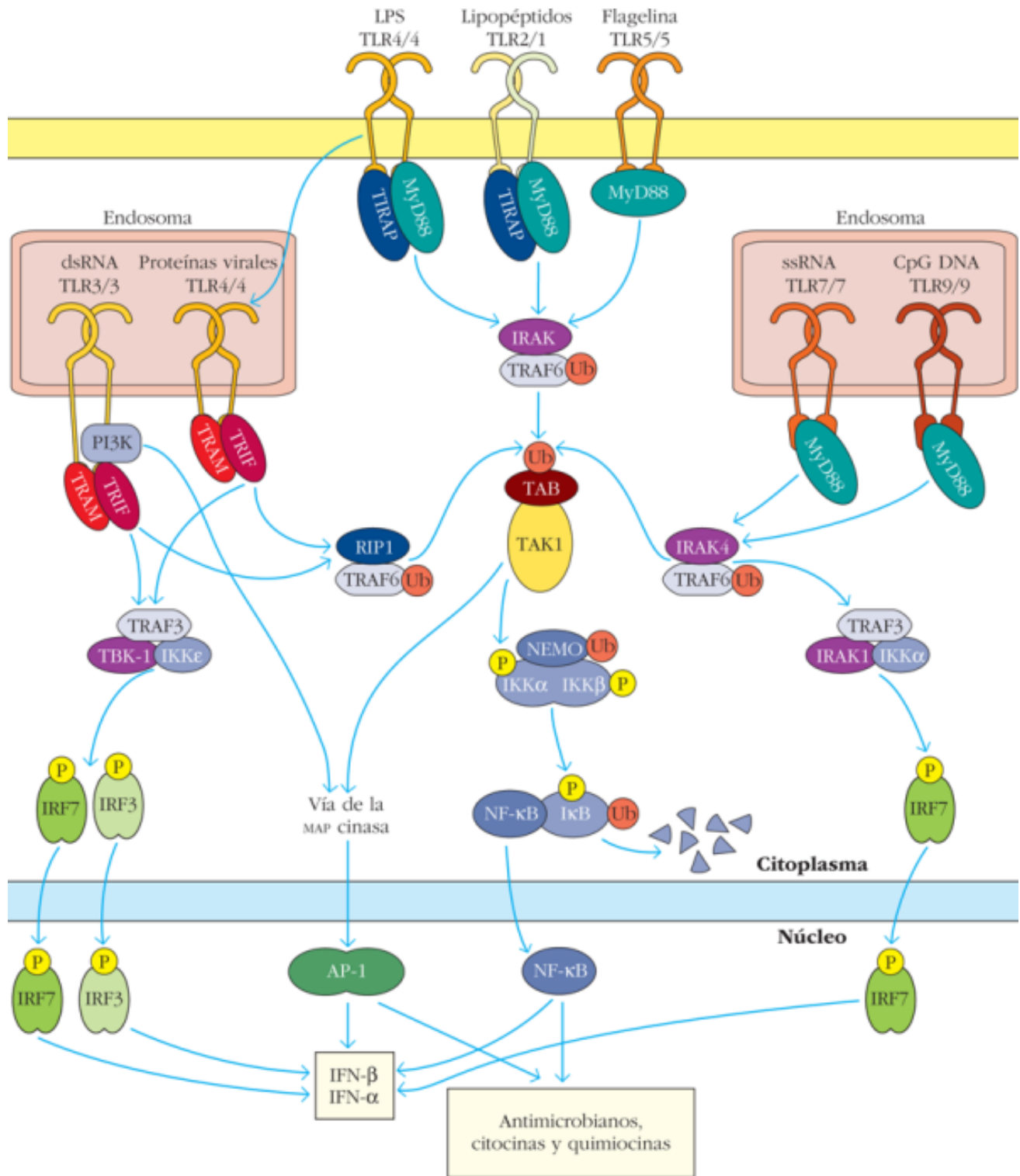
### 3.6.4 Vía de señalización

Cuando el PAMP se une a su receptor, en este caso un TLR se inicia la activación de la señalización a través del factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88) (Figura 11) el cual se une al dominio TIR del TLR para reclutar a la cinasa 1 asociada al receptor de IL-1 (IRAK 1), la cinasa 4 asociada al receptor de IL-1 (IRAK 4) fosforila a IRAK 1 activándolo, después IRAK 1 se une al factor asociado al receptor de TNF (TRAF6).

TRAF 6 se separa de IRAK para unirse a la cinasa activada de TGF- $\beta$  (TAK 1) y a la proteína de unión a TAK-1 (TAB 1). Las proteínas semejantes a ligasas proteína de conjugación de ubiquitina UBC13 (Ubc13E2) y enzima de conjugación de ubiquitina E2 variante 1A (Uev1A) activan a TAK 1 que fosforila al complejo de cinasa de I $\kappa$ B (IKK) o a MAPK semejantes a la cinasa c-Jun N- terminal (JNK) que da como resultado con la translocación de NF- $\kappa$ B y a la proteína activadora 1 (AP-1), promoviendo la transcripción y síntesis de mediadores químicos (citocinas pro-inflamatorias) indispensables en la respuesta inmunológica innata y adquirida.<sup>12</sup>

En respuesta a un estímulo y a la unión de un ligando con su receptor se inicia la cascada de señalización que tiene el objetivo de regular la expresión génica y actividad metabólica.

La vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) tiene como objetivo regular la supervivencia y proliferación celular, la generación de citosinas y la producción de metaloproteasas. Incluyen citosinas como JNK, la cinasa regulada extracelularmente (ERK) y la proteína cinasa p38 (p38) las cuales fosforilan residuos de serina, treonina o tirosina.<sup>19</sup>



**Figura 11. Cascada de señalización de los receptores Toll.**  
 Transducción de señales torrente abajo para TLR2/1, TLR4 y TLR5.<sup>20</sup>

MKK3 y MKK6 regulan la función de p38 el cual es importante en la producción de citosinas. La isoforma  $\alpha$  de p38 se considera la más activa en la regulación de citosinas en macrófagos. Si se usan inhibidores de p38 en modelos animales de artritis, disminuye TNF $\alpha$  e IL-1.

Las cinasas MKK4 y MKK7 se encargan de regular la fosforilación de JNK, permiten la transducción de señales al formar un complejo. Junto con MTKK2 se puede aumentar la señalización de citocinas por medio de JNK. Cuando se bloquea esta vía en modelos animales la expresión de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, COX-2 y la de las metaloproteasas disminuye.

ERK puede estar implicada en procesos inflamatorios. Cuando se inhibe ERK se bloquea la activación y proliferación de células T, así como de efecto antiinflamatorio en modelos experimentales. NF-kB como factor de transcripción está involucrado en procesos inflamatorios. En la vía clásica se conocen dos proteínas p50 y p65 que se dimerizan para formar un complejo NF-kB funcional. Estas proteínas contienen homología con la cual permite la unión al DNA, así como la interacción con I $\kappa$ B que se unen a dímeros de NF-kB en citoplasma hasta que por diferentes estímulos como infecciones bacterianas, víricas y por citosinas proinflamatorias causan la fosforilación de NF-kB y este ingresa al núcleo donde regula la transcripción de citosinas.<sup>19</sup>

### **3.6.5 Regulación de la respuesta inflamatoria**

La respuesta por parte del hospedero hacia una infección es variada, va desde la eliminación de la infección acompañada de la reparación de tejido, eliminación de la infección con daño en el tejido (cicatrización) y disminución de la infección por medio de la inflamación (inflamación crónica).<sup>1</sup>

### **3.7 Diagnóstico de la endocarditis**

El diagnóstico de endocarditis se puede obtener mediante una biopsia obtenida de las vegetaciones del tejido cardiaco. Los criterios de Duke son una serie de estudios de laboratorio que apoyan el diagnóstico (Tabla 1) (Tabla 2).<sup>21</sup>

Tabla 1. Criterios de Duke para el diagnóstico clínico de endocarditis infecciosa. Criterios mayores

### Criterios Mayores

#### 1. Hemocultivo positivo

**Microorganismo típico de la endocarditis infecciosa obtenido de dos hemocultivos diferentes**

**Estreptococo viridans, *Streptococcus gallolyticus*, microorganismos del grupo HACEK,**

***Staphylococcus aureus* o**

**Enterococos adquiridos en la comunidad en ausencia de un foco primario o Hemocultivo positivo persistente, definido como la recuperación de un microorganismo compatible con una endocarditis infecciosa a partir de**

**Hemocultivo extraídos con una separación >12 horas; o tres o  $\geq 4$  hemocultivos diferentes, con una separación de por lo menos 1 h entre la extracción del primero y el último.**

**Un solo resultado positivo de cultivo de *Coxiella burnetti* o un título de anticuerpo IgG de fase I >1:800**

#### 2. Signos de afección endocárdica

**Ecocardiograma positivo<sup>b</sup>**

**Tumoración intracardiaca oscilante en una válvula, en las estructuras de apoyo o en la vía de**

**chorros de insuficiencia o en material implantado, en ausencia de una explicación anatómica**

**alternativa o**

**Absceso o**

**Nueva dehiscencia parcial de una prótesis valvular o**

**Nueva insuficiencia valvular (el aumento o el cambio de un soplo pre-existente no es suficiente).**

<sup>b</sup>Se recomienda la ecocardiografía transesofágica para evaluar posible endocarditis de válvula protésica o endocarditis complicada. HACEK: especies de *Haemophilus*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens*, especies de *Kingella*.<sup>21</sup>

Tabla 2. *Criterios de Duke para el diagnóstico clínico de endocarditis infecciosa. Criterios menores*

### **Criterios menores**

- 1. Predisposición: cardiopatía predisponente o consumo de drogas por vía intravenosa.**
- 2. Fiebre  $\geq 38.0^{\circ}\text{C}$ .**
- 3. Fenómenos vasculares: embolia arterial relevante, 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 pero que no cumple los criterios mayores previamente indicados o signos serológicos de infección activa por un microorganismo compatible con una endocarditis infecciosa.**

<sup>c</sup> Exclusión de los hemocultivos positivos aislados para estafilococos coagulasa positivos y difteroides, que son contaminantes habituales de los cultivos, y microorganismos que no causan con frecuencia endocarditis, como los bacilos gramnegativos.<sup>21</sup>

#### **3.7.1 Complicaciones**

Las complicaciones que se presentan en la endocarditis son:

- Infarto miocárdico, cerebral, mesentérico.
- Insuficiencia vascular de extremidades.
- Aneurismas micóticos.
- Valvulopatía cardíaca y abscesos.

#### **3.7.2 Tratamiento médico de la endocarditis**

El tratamiento médico de la endocarditis incluye:

- Antibióticos.
- Anticoagulantes.
- Analgésicos y antipiréticos.

### **3.7.3 Tratamiento quirúrgico**

La terapia con antibióticos ayuda a eliminar a los microorganismos causantes de la infección, sin embargo como efecto residual de la enfermedad si se presentan las siguientes patologías es necesaria la cirugía:

- Insuficiencia cardíaca persistente.
- Fiebre de más de una semana con tratamiento.
- Embolias recidivantes.
- Abscesos miocárdicos.
- Arritmias.
- Defectos de la conducción miocárdica.
- Vegetaciones.<sup>7</sup>

### **3.7.4 Prevención**

Cuando un microorganismo desarrolla resistencia hacia antibióticos a los cuales inicialmente era susceptible se denomina resistencia microbiana. Las causas más comunes son automedicación e interrupción temprana del tratamiento, lo que provoca que las infecciones persistan y en el próximo tratamiento sea ineficaz el antibiótico. En la endocarditis sucede algo muy parecido. El tratamiento se reguló por parte de la American Heart Association y así controlar el uso de antibióticos. Para prevenir la endocarditis no solamente se tiene que regular el uso de antibióticos, los pacientes deben cuidar su higiene bucal mediante el lavado de dientes. En el caso de los Odontólogos la administración de antibióticos durante procedimientos quirúrgicos es indispensable para así evitar que flora normal de boca logre penetrar las barreras y llegar a circulación sistémica causando infecciones.<sup>21</sup>

### 3.8 Flavonoides

Son pigmentos que se encuentran en vegetales (plantas, frutas y verduras). Su función es evitar el daño por agentes oxidantes (rayos ultravioleta, sustancias químicas y contaminación ambiental) y microorganismos, además de formar parte del segmento no energético de la dieta diaria.

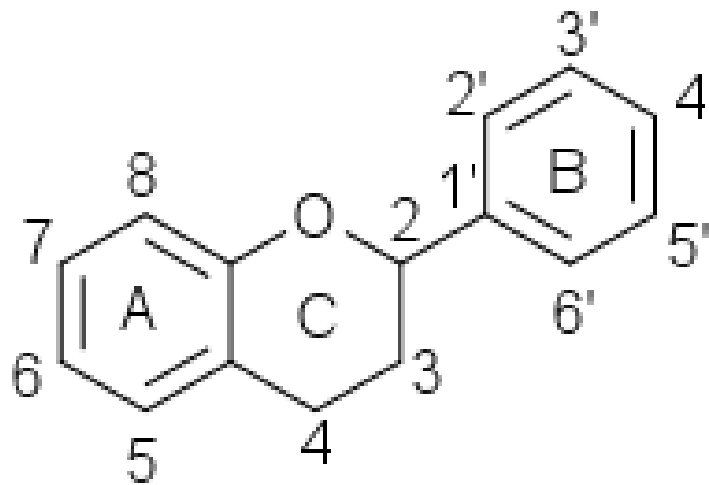
Recientemente ha surgido un gran interés en utilizar flavonoides por sus propiedades farmacológicas para diferentes patologías, cardiopatías y aterosclerosis, que son las más comunes. Se ha descrito su efecto farmacológico en diferentes enfermedades como por ejemplo la cardiopatía isquémica, la arterosclerosis y cáncer. Tienen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antitrombóticas, antimicrobianas, antialérgicas, antitumorales, antiasmáticas e inhibidoras de enzimas como la transcriptasa reversa, proteína quinasa C, tirosina quinasa C, calmodulina, ornitindecarboxilasa, hexoquinasa, aldosa reductasa, fosfolipasa C y topoisomerasa II. Estos efectos farmacológicos son relacionados a su estructura que contiene grupos hidroxilo fenólicos los cuales pueden reaccionar como agentes quelantes con hierro y otros metales de transición, anti-radicales libres que al reaccionar con radicales hidroxilo y superóxido evitan daños fisiológicos y así sus previenen su toxicidad. Estudios publicados informan que por ingesta nutricional personas con bajo consumo de flavonoides presentaron incidencia en enfermedades cardiacas, mientras que el consumo en una concentración adecuada reduce el riesgo de presentar alguna enfermedad relacionada y por lo tanto disminución de la morbilidad y mortalidad por cardiopatías. Los mecanismos de acción con los que los flavonoides presentan sus propiedades no se encuentran totalmente precisos, se supone que reduce la liberación de radicales libres por parte de macrófagos, regenerando el alfa-tocoferol activo en la cadena de la reacción de la peroxidación lipídica o quelando iones metálicos reduciendo la cantidad de radicales libres.<sup>22, 23, 24</sup>



### 3.8.1 Estructura química

La estructura principal de cualquier flavonoide (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) se encuentra compuesto por dos anillos fenilos unidos por un pirano, derivado del ácido siquímico y de 3 restos de acetato (Figura 12).

Como se mencionó antes, los flavonoides presentan diferentes sustituciones de grupos hidroxilo en su estructura la cual confiere sus propiedades como agente quelante y anti-oxidante.



*Figura 12. Estructura básica del flavonoide.*<sup>25</sup>

Se pueden clasificar por propiedades estructurales:

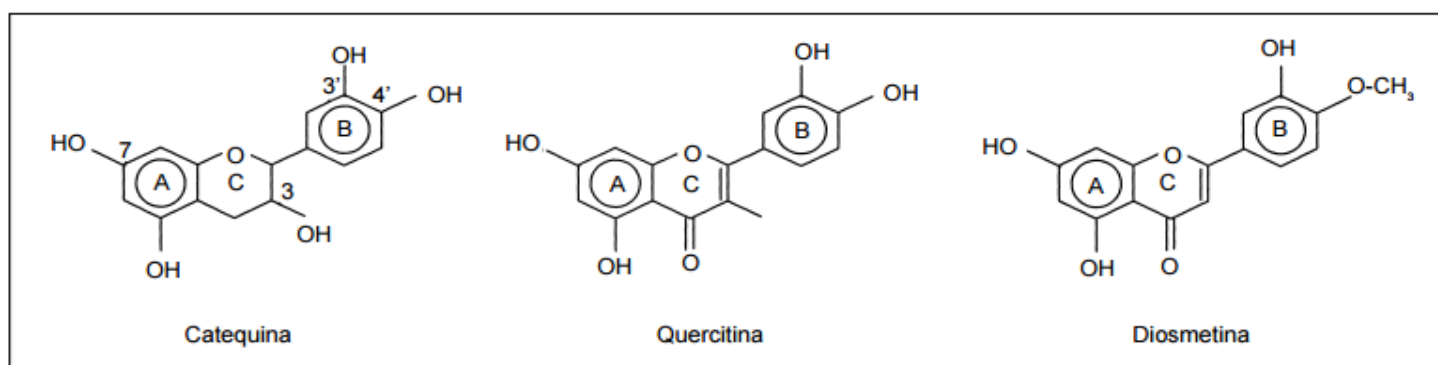
- Flavanos, p. ej. catequina, con un grupo –OH en posición 3 del anillo C.
- Flavonoles, p. ej. quercitina, tiene un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo –OH en posición 3 del anillo C.
- Flavonas, p. ej. diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C.
- Antocianidinas, tienen un grupo –OH en posición 3 y poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.<sup>22</sup>

Existen 13 subclases de flavonoides con aproximadamente 5000 compuestos.<sup>23</sup>

Se ha observado que las propiedades estructurales que deben de tener los flavonoides para tener efecto farmacológico son:

- A) Una estructura catecol u O-dihidroxi en el anillo B.
- b) Doble enlace en posición 2,3.
- c) Grupos hidroxilo en posición 3 y 5.

El flavonoide que tiene estas tres propiedades es la quercitina (Figura 13).



**Figura 13. Estructura química de los principales tipos de flavonoides.** <sup>25</sup>

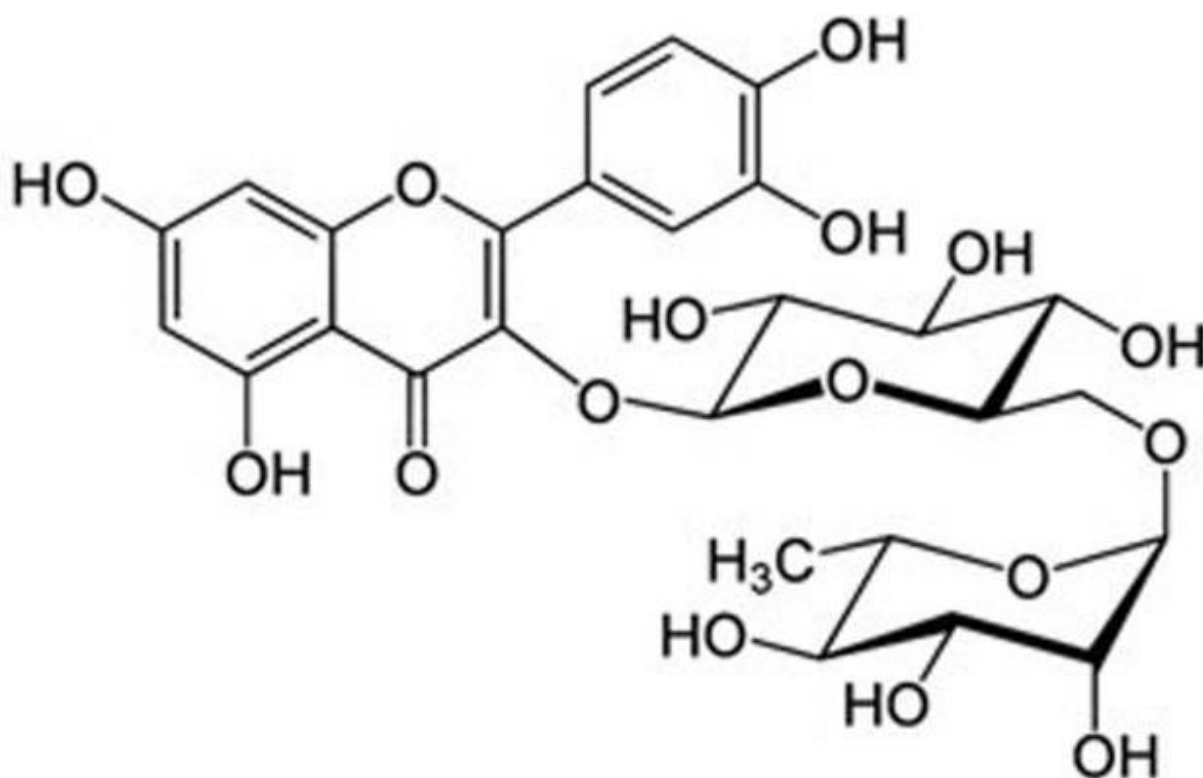
Los flavonoles se encuentran en la naturaleza como O-glicósidos, se unen principalmente en C3 del anillo C. El azúcar que se une con más frecuencia es la D-glucosa y otros con menos frecuencia como D-galactosa, la L-ramnosa, la L-arabinosa, la D-xilosa, así como el ácido D-glucurónico, sin embargo este azúcar reduce su acción contra radicales libres. Cuando el flavonoide se hidroliza y pierde el azúcar se denomina aglicona.

Aproximadamente el  $-\log [K_a]$  (pKa) de la mayoría de los flavonoides es ácido. Entonces los radicales son neutros por debajo de pH 3 y con carga negativa a pH 7, además de que el radical flavonoide puede reaccionar con la vitamina E formando un anión dificultando su transporte a través de la membrana celular cargada negativamente por fosfolípidos disminuyendo su acción farmacológica.<sup>22</sup>

### 3.8.2 Rutina

La rutina (Figura 14) es extraída de plantas de la especie *Dimorphandra Gardneriana* y *Dimorphandra mollis* así como de botones florales de *Sophora japónica* y hojas de *Eucaliptus macrorrhyncha*. Se han descrito como acciones farmacéuticas de esta molécula la normalización de la permeabilidad y resistencia de los capilares.<sup>26</sup>

Se encuentra en plantas como la pasiflora, alimentos como el trigo de sarraceno, té y manzana.



**Figura 14. Rutina**

La rutina está conformada por el disacárido rutinosa (ramnosa y glucosa) y el flavonol quercetina.<sup>27</sup>

La rutina tiene actividades farmacológicas como antioxidante donde podría influir en la atenuación de la peroxidación de los lípidos en tejidos del miocardio. En la bradicardia se administra isoproterenol el cual resulta tóxico con la administración frecuente lo que provoca una reducción de la actividad de enzimas como lactato deshidrogenasa, aspartato aminotransferasa y alanina aminotransferasa en corazón. La administración de rutina restaura la actividad de estas enzimas y de esta forma podría tener un efecto cardio-protector.

Además tiene otras actividades farmacológicas, entre las que se encuentran: prevención de la neuroinflamación, promotor en la supervivencia de células de la cresta neural, actividad anti-Alzheimer, disminuye la hipertensión, coagulación sanguínea, anticancerígeno, actividad antibacterial, fungicida, antiretroviral, antiviral, antimicótica.

Estudios en hámsters con dietas del 10% de rutina con respecto a su dieta total fue administrado por 735 días, demostraron que no existe riesgo potencial carcinogénico.<sup>28</sup>

## **4. Objetivos**

### **4.1 Objetivo general**

- Caracterizar la vía MAPK en cardiomiocitos H9c2 tratados con PGN obtenido de *Streptococcus sanguinis*, dentro de un modelo de endocarditis infecciosa, así como evaluar el efecto del flavonoide rutina en la regulación de la vía mencionada.

### **4.2 Objetivos particulares**

- Caracterizar la activación de las MAPK (ERK, JNK y p38) en cardiomiocitos tratados con PGN.
- Caracterizar los efectos de rutina en la activación de cinasas involucradas en inducir respuestas inflamatorias en la línea celular H9c2 (cardiomiocitos derivadas de ratón) inducidas por PGN.

## **5. Hipótesis**

Al tratar la línea celular de cardiomiocitos H9c2 de ratón con PGN se llevará a cabo la activación de las MAPKs y se presentará una mayor respuesta de fosforilación. Si se realiza un pretratamiento con rutina, por sus propiedades antiinflamatorias, entonces se regulará la vía con una disminución en la fosforilación de las MAPKs.

## **6. Materiales y Métodos**

### **6.1 Línea celular**

Las células utilizadas para el estudio provienen de la línea celular H9c2 obtenida de cardiomiocitos de ratón de ATCC (CRL-1446).

### **6.2 Cultivo celular**

La línea celular H9c2 se creció en medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) con rojo de fenol, suplementado con 2 mM de L-glutamina, penicilina (100 µg/ml)/estreptomicina (100 µg/ml)/ fungizona (1 mg/ml) y 10% de suero bovino fetal. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>. Los cultivos se mantuvieron hasta la confluencia en 1000 µl de DMEM al 2% en cajas de 6 pozos.

### **6.3 Tratamiento celular**

Para detectar la expresión de cinasas se realizaron pre-incubaciones de 12 horas con DMEM al 2%, para los ensayos de curso temporal de la fosforilación de ERK, JNK y p38. Al término fueron tratados con PGN [15 µg/mL] los cuales fueron estimulados a tiempos de 15, 30, 60, 90 y 120 minutos. En el ensayo dosis-respuesta fueron tratados con dosis de PGN 0.1, 1, 5, 10 y 15 µg/mL los cuales fueron estimulados por 60 minutos y finalmente en el ensayo dosis-respuesta con pre-tratamiento con rutina se agregó rutina por 30 minutos, transcurrido ese tiempo se adicionó a cinco pozos exceptuando el control PGN [15 µg/mL] durante 60 minutos.

#### 6.4 Immunoblotting o Western Blot

Se realizó el tratamiento celular indicado en caja de 6 pozos. El aislamiento de proteínas se llevó a cabo terminado el tratamiento en cada caja de 6 pozos. El procedimiento se realizó a 4°C, el DMEM en cada pozo se retiró con vacío, se agregó amortiguador de fosfatos salinos y 1 mL de ortovanadato de sodio 1mM para después desprender las células con ayuda de una espátula de plástico para transferir todo el medio a un eppendorf. Se centrifugó 5 minutos a 10 000 g a 4°C. Al final, a la pastilla formada se le agregó 30 µL de amortiguador de lisis (0.05 M Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 M de NaCl, 1% de Nonidet P-40, 1 mM de PMSF, 50 µg/mL de Aprotinina, 10 µg/mL de Leupeptina, 4 mM de ortovanadato de sodio, 1 M de fluoruro de sodio y 250 mM de pirofosfato de sodio). Cada tubo eppendorf se sonicaron (35 watts por 30 segundos) a 4°C. La cuantificación de proteínas se realizó por el método de Bradford y se realizaron los cálculos para tomar 30 µg de muestra en un volumen final de 30 µL. Realizada la mezcla 1:1 con amortiguador de muestra (15% glicerol, 10% SDS, 1% 2-mercaptoetanol, 0.1% azul de bromofenol y 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8) se desnaturalizaron las muestras en un baño seco a 65°C por 5 minutos. Las proteínas de interés, con base en su peso molecular, se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) al 10% con dodecilsulfato de sodio (SDS) a 96 V por 1 hora. La transferencia de proteínas, desde el gel de poliacrilamida a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF), se realizó en una cámara de transferencia semi-seca a 10 V por 45 minutos. Para el bloqueo de la membrana se utilizó leche semi-descremada al 5% por 1 hora. Se hicieron tres lavados por 15 minutos con solución salina Tris, Tween pH 7.8 (NaCl 20 mM, Trisma 137 Mm). Posteriormente se realizó la incubación a 4°C con anticuerpo primario toda la noche en dilución 1:1000 (anti ratón monoclonal fosfo-ERK, anti ratón monoclonal fosfo-p38 y anti ratón monoclonal fosfo-JNK). Terminado se lavó con amortiguador de solución salina Tris-Tween por 4 veces de 10 minutos cada una y se incubó con anticuerpo secundario anti ratón IgG conjugados con peroxidasa en dilución (1:10000) por 1 hora. Terminado el tiempo de incubación se le dio tres lavados de 5 minutos. La detección por quimioluminiscencia (Luminol) se realizó por 20 minutos, se



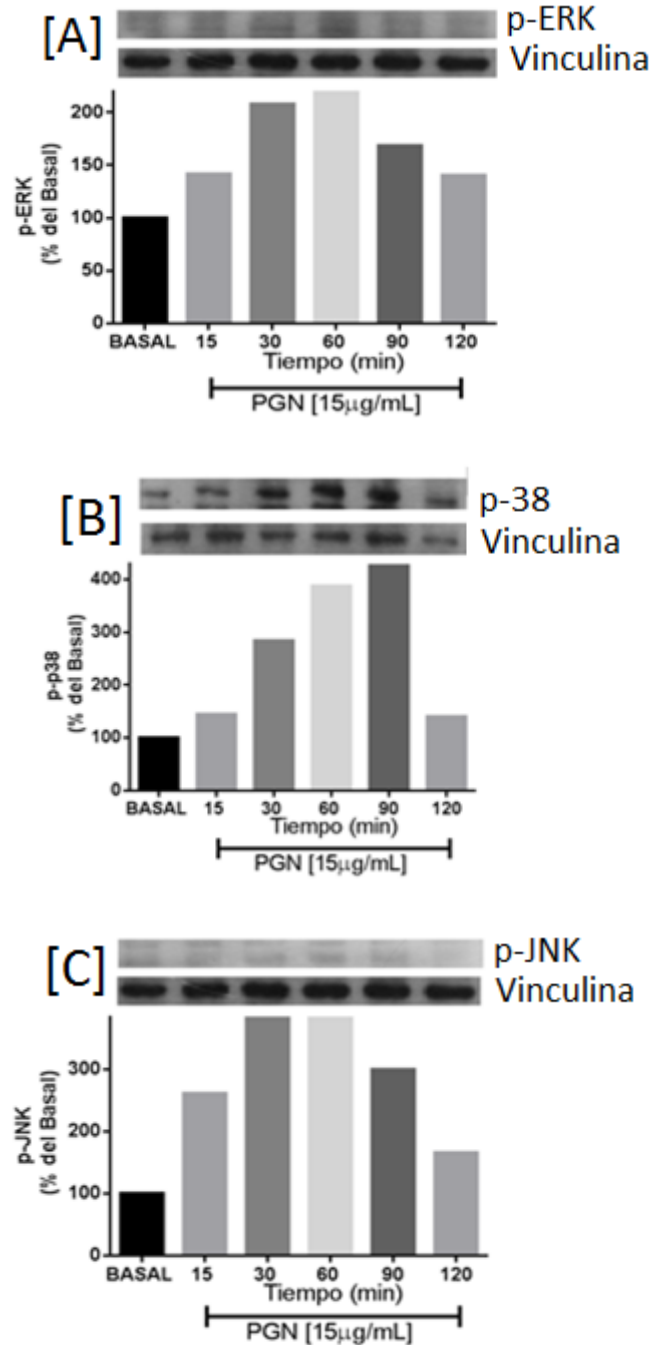
digitalizó la película por medio del programa Digi Doc-it (versión 1.1.27, UVP, Inc.) y su posterior análisis por Densitometría (Labs Work versión 4.0.0.8; Ultraviolet Products Inc., CA, USA).

## 7. Resultados

La vía de las MAPK inicia la transducción de señales después de la administración de PGN. Se observó una mayor fosforilación de las cinasas ERK, p38 y JNK, a dosis mayores de PGN la fosforilación y a dosis constantes de PGN a mayor tiempo de exposición la fosforilación fue más que en el basal. La vía de las MAPK es importante ya que el resultado final de la fosforilación de cinasas involucradas es la transcripción de genes relacionados con la inflamación. La estimulación con PGN aumenta la fosforilación de las MAPK, sin embargo esta fosforilación disminuyó con la administración de dosis crecientes del flavonoide rutina.

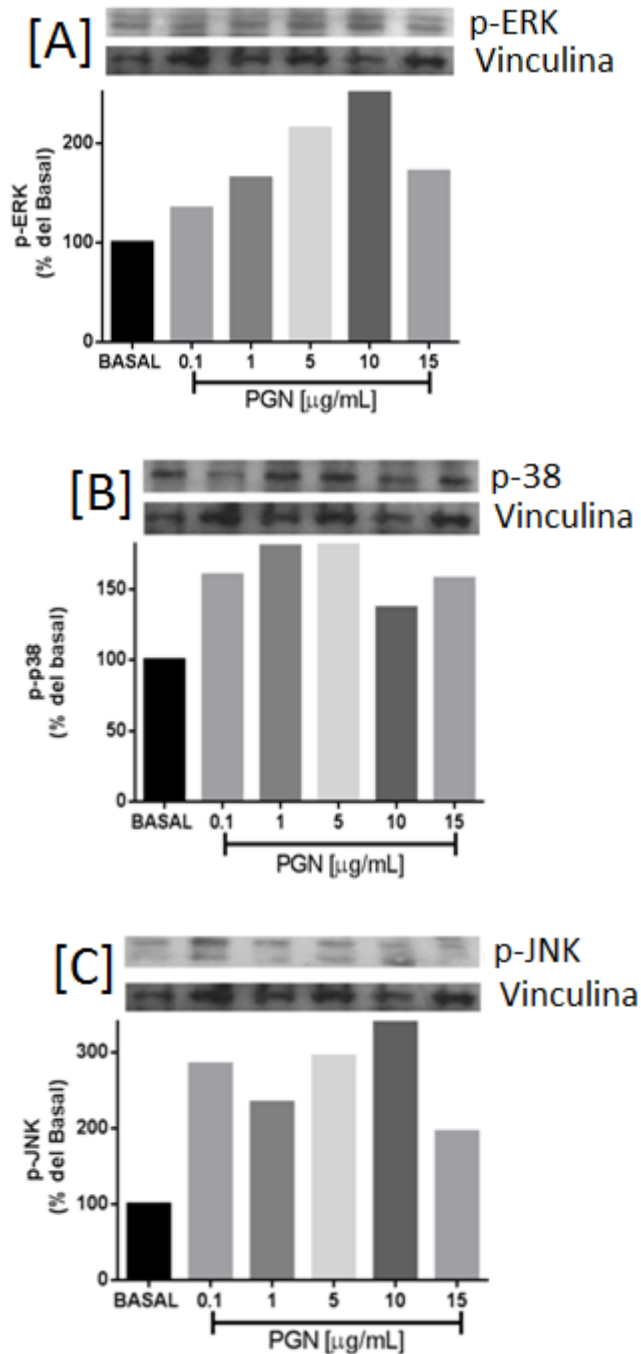
Las células fueron incubadas con PGN a una dosis de 15  $\mu\text{g/mL}$  realizando la estimulación a tiempos de 15, 30, 60, 90 y 120 minutos para inducir la fosforilación de las MAPK (Figura 15); La fosforilación de las cinasas ERK y JNK aumentaron de manera dosis-dependiente teniendo un máximo a 60 minutos, mientras que el mayor efecto para p38 fue a 90 minutos.

Después se realizaron curvas de dosis-respuesta para observar la dosis efectiva de PGN. En la Figura 16 se observa el máximo incremento de la fosforilación de ERK y JNK a una dosis de 10  $\mu\text{g/mL}$  mientras que p38 alcanza su máximo a 5  $\mu\text{g/mL}$ .



**Figura 15. Curvas de curso temporal**

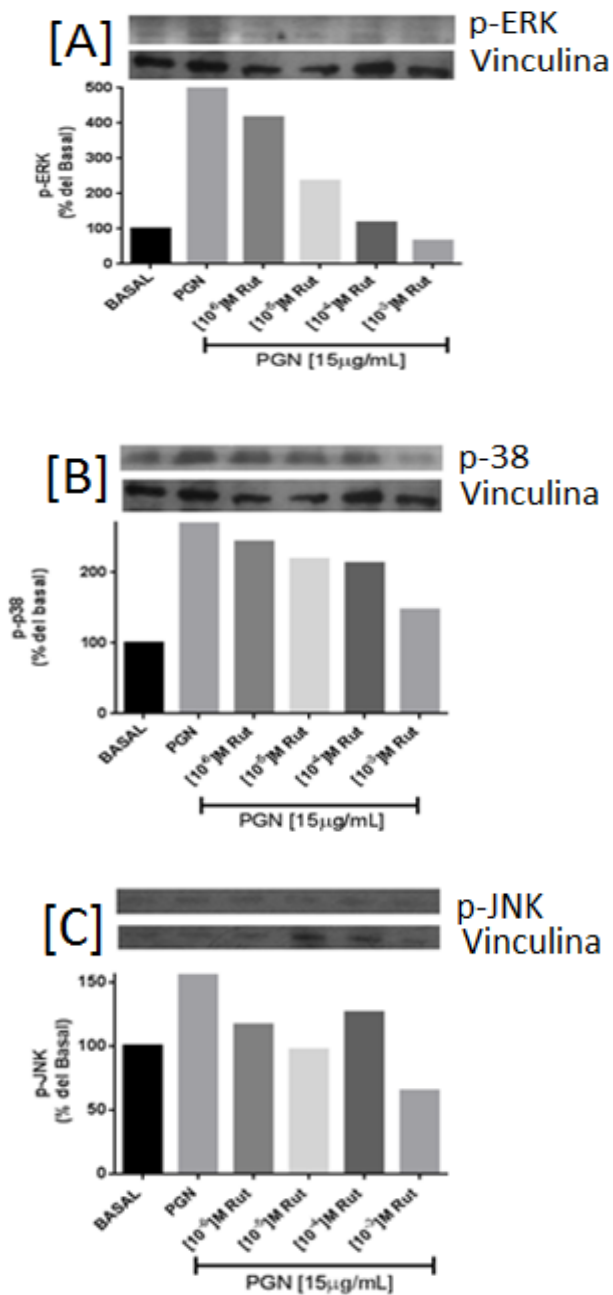
Curso temporal y detección de la fosforilación de [A] ERK, [B] p38 y [C] JNK inducida por PGN en el cultivo celular H9c2 en cajas de 6 pozos. Se realizaron pre-incubaciones de 12 horas con DMEM al 2%, al término fueron estimulados con PGN [15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] por diferentes tiempos. Los extractos totales fueron analizados por medio de la técnica de Western blot. La intensidad de la banda fue cuantificada por densitometría.



**Figura 16. Curvas de Dosis-Respuesta**

Detección de la fosforilación de [A] ERK, [B] p38 y [C] JNK inducida por PGN en células H9c2 en cajas de 6 pozos. Se realizaron pre-incubaciones de 12 horas con DMEM al 2%. Al término fueron tratados con PGN 0.1, 1, 5, 10, 15  $\mu\text{g/mL}$  los cuales fueron estimulados por 60 minutos y transcurrido el tiempo se extrajeron las proteínas y se analizaron por medio de la técnica de Western blot. La intensidad de la banda fue cuantificada por densitometría.

Para observar el efecto de los flavonoides en el cultivo celular con PGN en la Figura 17 se puede observar la inhibición de la fosforilación de ERK, p38 y JNK dosis-dependiente por la estimulación de PGN con un pre-tratamiento de 30 minutos con rutina a [ $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ] M. En las cinasas ERK y JNK la inhibición de la fosforilación es más notable con respecto al basal fue a una dosis de  $10^{-3}$  M de rutina mientras que para la cinasap38 la respuesta no alcanza una inhibición menor al basal.



**Figura 17. Curvas de pre-tratamiento con rutina**

Detección de la fosforilación de [A] ERK, [B] p38 y [C] JNK inducida por PGN con un pre-tratamiento utilizando el flavonoide rutina. Se realizó el experimento en cajas de seis pozos con células H9c2. Se realizaron pre-incubaciones de 12 horas con DMEM al 2%. Después se pre-trataron con rutina por 30 minutos. Transcurrido el tiempo, se adiciono a cinco pozos exceptuando el control PGN [15 $\mu$ g/mL] durante 60 minutos; después se analizaron los extractos proteicos totales por Western blot. La intensidad de la banda fue cuantificada por densitometría.

## 8. Discusión

En México la principal causa de muerte es provocada por enfermedades cardiovasculares. Si la EI no se trata correctamente a tiempo es muy probable la muerte del individuo con esta cardiopatía.<sup>2</sup>

La EI inicia su proceso patológico con una infección, esta enfermedad puede tener origen quirúrgico (dental o cardiaco), alteraciones cardiacas, drogadicción e infecciones bucales. Las infecciones bucales causadas por falta de limpieza dental (técnica de cepillado y uso de hilo dental) inducen la formación de la biopelícula, donde bacterias patógenas que causan caries proliferan y culminan con daño a estructuras dentales. Así mismo, las infecciones bucales se pueden desarrollar por un procedimiento incorrecto en cirugías dentales (extracción de dientes y cirugía periodontal) y así permitir el ingreso de microorganismos a sistema circulatorio.<sup>6</sup>

Estas bacterias que forman parte de la flora normal, al presentarse la formación de la biopelícula generan un desequilibrio, se vuelven patógenas y causan daño al huésped con una liberación de factores de virulencia. *S. sanguinis* es uno de los principales microorganismos de la flora normal de boca. *S. sanguinis* es un antagonista de *S. mutans*, causante de caries. Mientras que *S. sanguinis* se encuentra en zonas libres de caries, *S. mutans* coloniza zonas con lesiones dentales.<sup>29</sup>

Hablando de los tipos de endocarditis se pueden encontrar diferentes microorganismos causantes de esta enfermedad. En el caso de la endocarditis aguda, el microorganismo causante es *Staphylococcus aureus* y en menor frecuencia bacilos gram negativos. En el caso de la endocarditis subaguda es causada por *Streptococcus viridans* (50%), *Streptococcus bovis* (25%), *Enterococcus faecalis* (10%) y *Staphylococcus epidermidis* (2-5%). La endocarditis crónica es provocada por *Coxiella burnetti*.<sup>2</sup>

Cuando algún antígeno se une a su respectivo TLR el resultado es la activación de NF-κB con producción de citosinas pro-inflamatorias, donde las MAPK juegan un papel importante en la transducción de señales.<sup>30</sup>

Se ha descrito que el PGN estimula varias vías de transducción de señales como MyD88, TRAF, protein-tirosin-cinasas y MAPK.<sup>31</sup>

La inflamación es una respuesta que tiene la vía de señalización de las MAPK. La activación inicia cuando el ligando (PGN) se une a su receptor (TLR-2), provoca la fosforilación de proteínas citoesqueléticas y factores de transcripción. Son por lo menos tres cinasas distribuidas jerárquicamente (MAPK, MAPKK, MAPKKK) que son fosforiladas a través de sus residuos de serina o treonina y estas cinasas fosforilan las MAPKs (JNK, p38 y ERK) en residuos treonina y tirosina.<sup>32</sup>

La liberación del PGN inicia la activación de la respuesta inmunológica. En el experimento se utilizó PGN de *S. sanguinis*. Sin embargo, la fuente de PGN de la microbiota oral principalmente es proporcionada por *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*.<sup>33</sup>

Hussain y cols. compararon células no tratadas y tratadas con PGN. Observó la elevada actividad de p38 después de 4 horas de tratamiento con PGN, lo que sugiere que la señalización por TLR-2 es el mediador de la señalización.<sup>30</sup>

Con la administración de PGN se inicia la activación de la señalización de la vía de las MAPK. Se demostró el incremento de la fosforilación de JNK, p38 y ERK después de la administración de PGN.

La activación de ERK, p38 y JNK en macrófagos por PGN se realizó simultáneamente, la actividad no se mantuvo igual para las tres cinasas, manteniendo la actividad ERK hasta 2 horas después, p38 y JNK disminuyeron su actividad a los 30 minutos.<sup>31</sup>

El uso indiscriminado de antibióticos ha causado que las bacterias se vuelvan resistentes a ellos. *Streptococcus viridans* es un ejemplo de bacteria la cual conforme la administración de antibiótico es más frecuente, su sensibilidad a él es cada vez menor. En pacientes con complicaciones (Endocarditis infecciosa, prótesis de válvulas cardíacas) es más difícil el tratamiento para resolver este problema. Por ejemplo, en una cirugía dental se administra antibiótico



(amoxicilina) antes del procedimiento para evitar una infección, pero ya iniciada la bacteriemia la válvula aortica es comúnmente la más afectada.<sup>34, 35</sup>

Se busca con los flavonoides una alternativa para profilaxis y tratamiento en la EI por disminuir la fosforilación de proteínas involucradas en la transcripción de cinasas proinflamatorias, reduce la vulnerabilidad del endotelio microvascular en procesos inflamatorios, además de sus propiedades antimicrobianas, quitan oxígeno reactivo como aniones superóxidos, radicales hidroxilos, peróxidos lipídicos o hidroperóxidos así evitan daño en la célula, pueden inhibir in vitro la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) por los macrófagos y disminuir su citotoxicidad.<sup>36</sup>

Investigaciones sobre los efectos farmacológicos del flavonoide rutina en células H9c2 donde se indujo muerte celular con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se demostró, por Western blot, que el tratamiento con rutina disminuye la expresión de caspasa-3 e incrementa Bcl-2/Bax en el cultivo celular H9c2. Así mismo, se incrementa la fosforilación de ERK y AKT. Con estos resultados se observa que la rutina reduce el estrés oxidativo.<sup>37</sup>

Se demostró que el pretratamiento con rutina en cardiomiocitos de ratón estimulados con PGN disminuye considerablemente la fosforilación de las MAPKs (JNK, p38 y ERK). Sin embargo se necesita continuar con experimentos para ver la expresión de las citosinas pro-inflamatorias.

En relación a su estructura, los flavonoides con sustituyentes hidróxilo en las posiciones 3' y 4' del anillo B el compuesto tiene mayor capacidad antioxidante, la cual es aumentado por un doble enlace entre los carbonos 2 y 3, un grupo OH libre en la posición 3 y un grupo carbonilo en la posición 4. La rutina presenta dos de estas características, un grupo hidróxido en la posición 3' y 4' del anillo B y doble enlace entre los carbonos 2 y 3. El flavonoide que cumple estas tres características es la quercetina<sup>38</sup>, sin embargo después de perder su glucósido la rutina tiene la estructura de quercetina.

La rutina se hidroliza y pierde su glucósido, entonces la aglicona es absorbida, de esta forma sus acciones farmacológicas son más potentes que unidas a él glucósido y tiene diferentes aplicaciones farmacéuticas. Entre ellas, se encuentran actividad antioxidante que han sido aprovechadas en medicina y nutrición. También tiene propiedades antimicrobianas, anti fúngicas y como agente anti alérgico. En investigaciones previas se ha encontrado los beneficios como tratamiento para enfermedades crónicas como cáncer, diabetes, hipertensión e hipercolesteremia.<sup>24, 36</sup>

Para tener una dieta correcta de flavonoides es importante consumir frutas y vegetales de los cuales se encuentran distribuidos, en el té, café, cocoa, cerveza y vino rojo.

Los flavonoides pueden actuar como agentes prooxidantes si se lleva la reducción de Cu (II) a Cu (I). En estudios se obtuvieron resultados donde flavonoides como quercetina, rutina, galangina provocaron daños al DNA por generación de especies reactivas de oxígeno.<sup>23</sup>

## 9. Conclusiones

- Los resultados sugieren que el mecanismo pato-fisiológico de la EI ocurre por una sucesión de fenómenos de naturaleza inmune en la que participan TLR y PGN, produciendo la fosforilación de MAPK y se sabe que estas inducen la expresión de citosinas inflamatorias como interleucina-1 y Factor de Necrosis Tumoral.
- Un pre-tratamiento con rutina regula procesos inflamatorios estimulados por peptidoglicano en cardiomiocitos de ratón.
- Rutina modula la respuesta inflamatoria por medio de la inhibición en la fosforilación de ERK, p38 y JNK.

## 10. Bibliografía

1. Rosas M., & Attie F., (2007). Enfermedad cardiovascular. Primera causa de muerte en adultos de México y el mundo. *Mediagraphic. Vol. 77 (Número 2)*. pp. 91.  
Recuperado de: <http://www.scielo.org.mx/pdf/acm/v77n2/v77n2a1.pdf>
2. Secretaría de Salud. México. (2010). *Diagnóstico y Tratamiento de la Endocarditis Infecciosa*. Recuperado de:  
[http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/404\\_IMS\\_S\\_10\\_Endocarditis\\_Infecciosa/EyR\\_IMSS\\_404\\_10.pdf](http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/404_IMS_S_10_Endocarditis_Infecciosa/EyR_IMSS_404_10.pdf)
3. Peña M., Calzado M., González M., Cordero S., & Azahares H., (2012). Patógenos periodontales y sus relaciones con enfermedades sistémicas. *MEDISAN. Vol. 17 (Número 7)*. pp. 1137. Recuperado de:  
<http://scielo.sld.cu/pdf/san/v16n7/san14712.pdf>
4. Taboada O. & Talavera I. (2011). Prevalencia de gingivitis en una población preescolar del oriente de la Ciudad de México. *Bol Med Hosp Infant Mex. Vol. 68 (número 1)*. pp. 21-22. Recuperado de:  
<http://www.scielo.org.mx/pdf/bmim/v68n1/v68n1a3.pdf>
5. Miller, W. (1891) THE HUMAN MOUTH AS A FOCUS OF INFECTION. *The Lancet*. Volume 138 , Issue 3546 , 340 - 342
6. Lindhe J., Niklaus L., Thorkild K., (2008). *Periodontología Clínica e Implantología Odontológica*. España. Editorial Médica Panamericana.  
Recuperado de :  
[https://books.google.com.mx/books?id=c\\_Cx0X7\\_DNkC&pg=PA185&dq=colonizaci%C3%B3n+primaria+dental&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiwtPKXkrzNAhVMUVIKHUaoD1oQ6AEILzAE#v=onepage&q&f=true](https://books.google.com.mx/books?id=c_Cx0X7_DNkC&pg=PA185&dq=colonizaci%C3%B3n+primaria+dental&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiwtPKXkrzNAhVMUVIKHUaoD1oQ6AEILzAE#v=onepage&q&f=true)
7. Arias J., Aller M., Arias J., Aldamenti I., (2000). *Enfermería médico quirúrgica: I*. España. Tebar, pp. 136. Recuperado de:  
[https://books.google.com.mx/books?id=Oo9mSTz6lowC&printsec=frontcover&dq=Enfermer%C3%ADa+m%C3%A9dico+quir%C3%BArgica&hl=es&sa=X&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.mx/books?id=Oo9mSTz6lowC&printsec=frontcover&dq=Enfermer%C3%ADa+m%C3%A9dico+quir%C3%BArgica&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)

8. Villa F., Mondragón M., Suárez A., Hernández L., López L., Perillán C., Díaz B., Pardo B., Álvarez C., Alfonso N., Mansilla O., Cobo M., (2005). *Manual del Técnico Superior en Higiene Bucodental*. España. Editorial MAD. pp.162-164. Recuperado de:  
[https://books.google.com.mx/books?id=2hWZ4Q-O\\_4UC&pg=SL26-PA164&dq=flora+normal+boca&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjSi\\_m0ibrNAhV VXIIXHXfYBQAQ6AEIHDA#v=onepage&q&f=true](https://books.google.com.mx/books?id=2hWZ4Q-O_4UC&pg=SL26-PA164&dq=flora+normal+boca&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjSi_m0ibrNAhV VXIIXHXfYBQAQ6AEIHDA#v=onepage&q&f=true)
9. Romero R. (2007). *Microbiología y Parasitología Humana*. México. Editorial Médica Panamericana. pp. 637,671. Recuperado de:  
<https://books.google.com.mx/books?id=Wv026CUhR6YC&pg=PA637&dq=beneficios+flora+normal&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiE28XCkbrNAhVBdIIKHwvODYAQ6AEIHDA#v=onepage&q&f=true>
10. Barrancos J., Barrancos P., (2006). *Operatoria dental: integración clínica*. Argentina. Editorial Médica Panamericana. pp. 262, 265, 266, 271, 273, 277. Recuperado de:  
<https://books.google.com.mx/books?id=zDFxeYR8QWwC&pg=PA261&dq=estructura+dental&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjYk7PR-cTNAhVK7oMKHdtiCWoQ6AEISjAH#v=onepage&q&f=true>
11. Ross M., Wojciech P., (2008). *Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular*. Argentina. Editorial Médica Panamericana. pp. 528, 535, 538. Recuperado de:  
[https://books.google.com.mx/books?id=NxYmIRZQi2oC&pg=PA540&dq=histologia+dental&hl=es&sa=X&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=true](https://books.google.com.mx/books?id=NxYmIRZQi2oC&pg=PA540&dq=histologia+dental&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q&f=true)
12. Rocha R., Lozano P., Martínez Y., (2004). *Mecanismo de Patogenicidad e Interacción parásito-hospedero*. México. Dirección de Fomento Editorial. pp. 6-8, 57-65. Recuperado de:  
<https://books.google.com.mx/books?id=aIEwbl7zHAYC&pg=PA6&dq=factores+de+patogenicidad&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjcoPjPtMTNAhXMzIMKHr4wCV0Q6AEIJTAC#v=onepage&q&f=true>

13. Negroni M. (2009). *Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica*. Argentina. Editorial Médica Panamericana. pp. 264. Recuperado de:  
<https://books.google.com.mx/books?id=Gxmui-vjZBgC&pg=PA263&dq=formacion+de+placa+dental&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwWij79Wlyb7NAhXF1CYKHdxvBykQ6AEIJTAA#v=onepage&q&f=true>
14. Crespo E. Año. *Influencia de las fuerzas oclusales sobre la reabsorción radicular en dientes con enfermedad periodontal*. (Tesis Doctoral). Universidad de Santiago de Compostela, Facultad de Medicina y Odontología. España.
15. Riott I., Delves P., Martín S., Burton D. (2008). *Roitt inmunología: fundamentos*. Argentina. Editorial Médica Panamericana. Recuperado de:  
[https://books.google.com.mx/books?id=TGxGADaoZwEC&pg=PA426&dq=inmunologia&hl=es&sa=X&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=true](https://books.google.com.mx/books?id=TGxGADaoZwEC&pg=PA426&dq=inmunologia&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q&f=true)
16. Villena A., Rueguero J., López C. (1995). *Inmunología*. Editorial Complutense. pp. 14 Recuperado de:  
<https://books.google.com.mx/books?id=UhN9f8wilKIC&printsec=frontcover&dq=inmunologia&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEWjprYbDvsnNAhXHpYMKHREIBBUQ6AEIHZAB#v=onepage&q&f=true>
17. Hernández M., Sastre A. (1999) *Tratado de Nutrición*. España. Editorial Díaz de Santos. Recuperado de:  
[https://books.google.com.mx/books?id=SQLNJOsZClwC&pg=PA66&dq=peptidoglicano&hl=es&sa=X&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=true](https://books.google.com.mx/books?id=SQLNJOsZClwC&pg=PA66&dq=peptidoglicano&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q&f=true)
18. Rabinovich G. *Inmunopatología molecular: nuevas fronteras de la medicina: un nexo entre la investigación biomédica y práctica clínica*. Editorial Médica Panamericana. (2004).
19. Blanco J., Cañete J., Pablos J. (2007). *Monografías SER, Técnicas de investigación básica en reumatología*. Editorial Panamericana, España, pp. 99, 100.
20. Owen J., Punt J., Stranford S. (2013). *Kuby: inmunología*. Mc Graw Hill.

21. Longo D., Kasper D., Larry J. (2012). *Harrison principios de medicina interna*. México. Mc Graw Hill. pp. 1055, 1061, 1062. Recuperado de: <https://books.google.com.mx/books?id=PiMnCGAAQBAJ&pg=PA1055&dq=diagnostico+de+la+endocarditis&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjHodr44s3NAhVHYyYKHRxMAYEQ6AEIKjAD#v=onepage&q&f=true>
22. Martínez S., González J., & Culebras, J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición hospitalaria*, 17(n06). pp. 271-274.
23. Pérez Trueba, G. (2003). Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 22(1), pp. 48-49
24. Russo O., & Speranza M., (2006). Los flavonoides en la terapia cardiovascular. *Revista Costarricense de Cardiología*, 8(1), 13-18. Recuperado de [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1409-41422006000100003&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-41422006000100003&lng=en&tlng=es).
25. Martínez S., González J., & Culebras J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición hospitalaria*, 17(n06). pp. 271-274.
26. Sharapin N. (2000). *Fundamentos de Tecnología de productos fitoterapéuticos*. Colombia. Convenio Andrés Bello. pp. 87-89. Recuperado de: <https://books.google.com.mx/books?id=XH2HzSIJPywC&pg=PA87&dq=flavonoides&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiQ06TUg9DNAhUG2SYKHf2mBMAQ6AEIMjAE#v=onepage&q&f=true>
27. Domitrović R., Jakovac H., Vasiljev V., Vladimir S., Cvijanović O., Tadić Ž., Romić Ž., Rahelić D. (2012). Differential hepatoprotective mechanisms of rutin and quercetin in CCl4-intoxicated BALB/cN mice. *Acta Pharmacologica Sinica*, 33(10), 1260–1270. Obtenida de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4002705/>

28. Ganeshpurkar A. & Saluja A. (2017) *The Pharmacological Potential of Rutin*, Saudi Pharmaceutical Journal 25, 149-164 Obtenido de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28344465>
29. Giacaman R., Muñoz C., Bravo E., Farfán P. (2013). Cuantificación de bacterias relacionadas con las caries dentales en saliva de adultos y adultos mayores. *Revista Clínica Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral* Vol. 6(2), p.p. 71-74.
30. Hussain T., Nasreen N., Lai Y., Bellew B., Anthony V., Mohammed K. (2008), Innate immune responses in murine pleural mesothelial cells: Toll-like receptor-2 dependent induction of  $\beta$ -defensin-2 by staphylococcal peptidoglycan. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 295, L461-L470.
31. Bhatt K. & Chakraborty R. Role of Mitogen-Activated Protein Kinases in Peptidoglycan-Induced Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase and Nitric Oxide in Mouse Peritoneal Macrophages: Extracellular Signal-Related Kinase, a Negative Regulator. (2011), *Clinical and Vaccine Immunology*, Vol. 18 No. 6 p. 994-1001.
32. Kitanaka, T., Nakano R., Kitanaka N., Kimura T., Okabayashi K., Narita T., Sugiya H. JNK activation is essential for activation of MEK/ERK signaling in IL-1 $\beta$ -induced COX-2 expression in synovial fibroblasts. *Sci. Rep.* 7, 39914; doi: 10.1038/srep39914 (2017).
33. Clarke T., Davis K., Lysenko E., Zhou A., Weiser J. (2010). Recognition of Peptidoglycan from the Microbiota by Nod1 Enhances Systemic Innate Immunity. *Nat. Med.* Vol. 16(2), p.p. 228-231.
34. Segura J., Gould K., Hakan B., Jonasson P., Cotti E., Mazzoni A., Sunay H., Tjaderhane L., Dummer P. (2016). Antibiotics in Endodontics: a review. Doi:10.1111/iej.12741.
35. Nakano K. & Ooshima T. Common knowledge regarding prevention of infective endocarditis among general dentists in Japan, *Journal of Cardiology*, doi: 10.1016/j.jjcc.2010.09.001 (2010).



36. Al-Dhabi N., Arasu M., Park C., Park S. (2015). An up-to-date review of Rutin and its Biological and pharmacological activities. *Excli journal*, 14: 59-63.
37. Jeong J., HA Y., Jin Y., Lee E., Kim J., Kim H., Seo H., Lee J., Kang S., Kim Y., Chang K. (2009), Rutin from *Lonicera japonica* Inhibits myocardial ischemia/reperfusion-induced apoptosis *in vivo* and protects H9c2 cells against hydrogen peroxide –mediated injury via ERK 1/2 and PI3K/Akt signals *in vitro*. *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 47, p.p. 1569-1576.
38. Escamilla C., Cuevas E., Guevara J. (2009). Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Rev. Fac Med UNAM* Vol. 52 No. 2, p.p. 73-75.