



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

EFFECTO DE LOS FLAVONOIDES SOBRE LA ACTIVACIÓN
DE SEÑALES INTRACELULARES POR
LIPOPOLISACÁRIDOS EN CARDIOMIOCITOS (H9C2).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

C I R U J A N O D E N T I S T A

P R E S E N T A:

ALFREDO ENRIQUE TORRAS CEBALLOS

TUTORA: DRA. GLORIA GUTIÉRREZ VENEGAS



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos:

A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO por haberme dado la oportunidad de estudiar en sus aulas y haberme permitido formar parte de unas de las universidades más prestigiadas a nivel internacional.

A la Doctora Gloria Gutiérrez Venegas por haber puesto a mi disposición todo su conocimiento, tiempo y esfuerzo; y por haberme brindado todo su apoyo en el difícil mundo de la ciencia y la investigación.

Dedicatoria:

A mis padres, porque ellos se esforzaron tanto como yo, en todos mis años de licenciatura.

A mi abuelo, Alfredo Ceballos, por ser ejemplo y guía.

A todas aquellas personas que de una forma u otra colaboraron para que yo pudiera terminar mi carrera y aprovechar al máximo las enseñanzas de la Facultad de Odontología.

Índice

Resumen.....	5
Introducción.....	6
1.1 Enfermedad periodontal.....	7
1.1.2. Patogenicidad bacteriana.....	8
1.1.2.1. Factores de virulencia.....	8
1.1.2.2. Endotoxinas bacterianas.....	11
1.1.3. Microorganismos periodondopatógenos.....	12
1.2. Relación de la enfermedad periodontal con otros padecimientos sistémicos.....	15
2. Efectos en tipos celulares.....	16
2.1. Receptores semejantes a Toll.....	16
2.2. Sistema de Transducción de TLR.....	18
2.3. Receptores Toll en la enfermedad al Miocardio.....	19
3. Flavonoides.....	19
3.1. Estructura química.....	20
3.2 Tipos y fuentes de flavonoides.....	21
3.3 Síntesis, absorción y metabolismo.....	22
3.4 Acción antioxidante de los flavonoides.....	22
4. Endocarditis.....	24
4.1. Factores de riesgo.....	25
4.2. Etiología.....	25
4.3. Patogenia.....	26
4.4. Diagnóstico de la enfermedad.....	27
4.5. Prevención.....	29
4.6. Tratamiento.....	29
4.7. Complicaciones.....	29
5. Planteamiento del problema.....	30
6. Justificación del estudio.....	30
7. Hipótesis.....	30
7.1 Hipótesis verdadera.....	30
7.1 Hipótesis falsa.....	30
8. Objetivos.....	31
8.1. Objetivo general.....	31
8.2. Objetivo específico.....	31
9. Material y métodos.....	31
9.1 Materiales.....	31
9.2 Reactivos.....	32
9.3 Métodos.....	33
10. Análisis de Datos y Métodos estadísticos.....	33
11. Resultados.....	34
12. Discusión.....	39
13. Conclusiones.....	41
14. Bibliografía.....	42

RESUMEN:

La endocarditis es una enfermedad de origen bacteriano que ocasiona la inflamación del endocardio. Diversos estudios señalan que los microorganismos presentes en la placa dentobacteriana o componentes de la pared pueden ocasionar este padecimiento.

Entre los componentes que provocan este padecimiento se encuentran los lipopolisacáridos, moléculas que se encuentran en la membrana externa y que juegan un importante papel en la promoción de respuestas inflamatorias.

Por otra parte, los flavonoides son moléculas derivadas de vegetales que entre otras funciones promueven una respuesta antiinflamatoria.

Por este motivo, partimos de la hipótesis de que el tratamiento con lipopolisacáridos ocasionará la activación de cinasas intracelulares que regulan la expresión de genes involucrados en respuestas promotoras de procesos inflamatorios.

El objetivo de este estudio consistió en evaluar el efecto de los lipopolisacáridos obtenidos de *Porphyromonas Gingivalis* sobre la activación de cinasas involucradas en la transducción de señales y determinar si los flavonoides regulan éstas respuestas intracelulares.

Para la realización de estudio se utilizó la línea celular H9c2 y mediante ensayos de western-blot, se estudió la activación de ERK 1/2, p38, JNK, usando al lipopolisacárido como ligando externo y utilizando estas técnicas se determinó el papel de los flavonoides sobre la activación de estas cinasas.

Los resultados de esta investigación han sido adecuados a la línea inicial de la hipótesis, ya que se ha comprobado que los flavonoides disminuyen la fosforilación de las MAPk Erk, y p38. Como se mostrará en los resultados, las células que fueron previamente tratadas con flavonoides disminuyeron considerablemente la fosforilación, sugiriéndonos una disminución de la actividad que dicha proteína realiza.

En este trabajo he querido demostrar el efecto de los flavonoides en el control o inhibición de algunas cascadas celulares que promueven la inflamación, como es el caso de las MAPK estudiadas en cardiomiocitos de rata (H9c2). Este estudio es uno de los primeros pasos a seguir ya que demuestra la relación directa entre las sustancias vegetales llamadas flavonoides y la inflamación, tan presente en todas las afecciones de carácter periodontal; nuestro estudio fue enfocado a cardiomiocitos, pero es perfectamente estudiable para fibroblastos, abriendo una nueva línea de investigación para controlar las reacciones inflamatorias que se dan a nivel oral y a nivel general.

INTRODUCCIÓN.

Entre las enfermedades dentales de mayor prevalencia en el mundo se encuentran la caries y la enfermedad periodontal. La etiología de ambas enfermedades ha sido ampliamente descrita y se ha demostrado que están involucradas a microorganismos específicos presentes en la placa dentobacteriana. En la caries dental se produce la desmineralización del esmalte promovida por los ácidos que liberan determinadas bacterias presentes en la placa dentobacteriana, como los estreptococos y lactobacilos. Por otra parte, la enfermedad periodontal afecta los componentes del periodonto (encía, ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar) lo que conlleva a la pérdida de las piezas dentales. Este padecimiento está asociado a microorganismos designados como colonizadores tardíos entre los que se encuentran *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Treponema denticola* entre otros (1). Los dos primeros organismos, ocasionan la enfermedad por su capacidad de adherirse a las diferentes células presentes en el periodonto y *Treponema denticola* por la habilidad de introducir una proteasa similar a quimiotripsina humana en las células.

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

1.1 ENFERMEDAD PERIODONTAL.

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



Fig. 1 Estructura del Periodonto.

En el esquema se muestra la estructura del periodonto, formado por encía, hueso alveolar, ligamento periodontal y cemento.

Se pueden presentar un sinnúmero de padecimiento periodontales, pero los más comunes son dos, 1) Gingivitis, que va a ser una inflamación gingival causada frecuentemente por la acumulación de bacterias o placas bacterianas, este padecimiento, es una de las enfermedades más comunes en la población mundial, y se va a presentar con enrojecimiento de la encía, y con sangrado frecuente de la misma; 2) La periodontitis, es una enfermedad, que va a comprometer la sujeción de los órganos dentarios, ya que en este padecimiento va a existir una migración del epitelio de unión (Fig. 2).

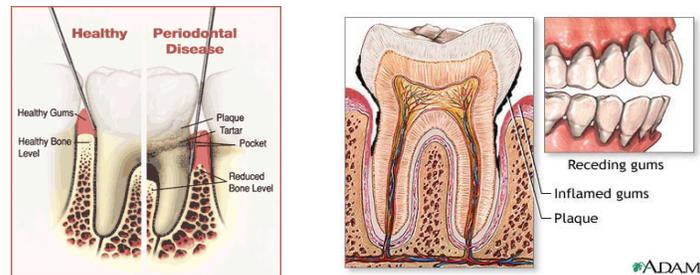


Fig. 2 Esquema que muestra un corte transversal de periodonto sano y con el padecimiento de la enfermedad periodontal.

1.1.2 PATOGENICIDAD BACTERIANA.

Las interacciones bacteria-hospedero son completamente dinámicas, ya que cada uno de ellos modifica sus actividades en función del otro. Por lo tanto, el resultado de esta interacción dependerá de las características del agente y de la capacidad del hospedero de defenderse frente a él. En esta interacción el agente puede ser un patógeno primario, es decir, que pueda causar enfermedad en individuos inmunocompetentes que no muestran ningún factor predisponente a la infección, o ser un patógeno oportunista que necesita de hospederos cuyos factores defensivos estén alterados (1). Estos patógenos oportunistas muchas veces pertenecen a nuestra microbiota y son capaces de producir enfermedad, si el hospedero se lo permite, al abandonar su hábitat natural e instalarse en un sitio diferente.

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

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

1.1.2.1. FACTORES DE VIRULENCIA.

Los factores de virulencia corresponden a los productos bacterianos o estrategias que utilizan las bacterias para dañar al hospedero. Estas estructuras se pueden clasificar en aquellos que dañan al hospedero: exotoxinas, enzimas hidrolíticas, endotoxinas y productos bacterianos que desencadenan una respuesta autoinmune y por otra parte las bacterias poseen factores de virulencia que promueven la colonización y sobrevivencia de ellas en nuestro organismo (Ver Tabla 1).

Tabla 1. RELACION ENTRE FACTORES DE VIRULENCIA Y SUS FUNCIONES.	
Factores de Virulencia.	Función.
Pili.	Adherencia superficies mucosas.
Adhesinas no fimbriales.	Permiten unión firme a células del hospedero.
Moléculas que inducen el reordenamiento del citoesqueleto de la célula hospedera.	Fagocitosis forzada de la bacteria por células que normalmente no son fagocíticas; movimiento de la bacteria dentro del hospedero.
Motilidad y quimiotaxis.	Permite llegada a las superficies mucosas.
Cápsulas.	Previenen la ingesta de fagocitos; reducen la activación del complemento.
slgA proteasas.	Previenen el atrapamiento de la bacteria en el mucus.

ADHERENCIA.

La adherencia es la capacidad del microorganismo para fijarse y colonizar el o los tejidos del hospedero. La colonización corresponde a la primera etapa de una infección. En esta etapa la bacteria se establece en un sitio de entrada, que puede incluir el tracto digestivo, respiratorio, urogenital, piel o conjuntiva.

Para que una bacteria logre adherirse o fijarse a la superficie de células eucariotas, debe emplear propiedades quimiotácticas y estructuras de adherencia llamadas adhesinas, que participan en la fijación a receptores específicos (2). Se requiere de la interacción receptor-ligando. Los receptores del hospedero son normalmente carbohidratos o residuos peptídicos a los cuales se fija la bacteria mediante sus adhesinas. Las adhesinas bacterianas corresponden normalmente a componentes de la superficie celular (cápsulas, pared celular, fimbrias, etc.), ambos, adhesina y receptor interactúan de una forma específica, similar a lo que ocurre en una reacción enzima sustrato específico o antígeno/ anticuerpo.

INVASIVIDAD.

Una bacteria es capaz de invadir al hospedero si ha completado con éxito la adherencia y multiplicación inicial, ha superado o traspasado los mecanismos de defensa del hospedero, y tiene la capacidad de producir sustancias extracelulares que faciliten la invasión (1,2).

Existen enzimas que actúan localmente para dañar las células del hospedero y tienen el efecto inmediato de facilitar el crecimiento y diseminación del patógeno, además pueden actuar en sitios vecinos al área de crecimiento bacteriano y no necesariamente destruyen las células (Tabla 2).

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

TOXICIDAD.

Las toxinas son proteínas solubles secretadas por la bacteria durante su crecimiento exponencial, de alta actividad biológica en sitios alejados del punto original de invasión y crecimiento del patógeno (3).

La capacidad de un microorganismo para producir éstas y la potencia de ellas son factores muy importantes en la producción de una enfermedad. Las toxinas bacterianas pueden ser clasificadas en dos grupos: exotoxinas, toxinas excretadas hacia el medio externo y endotoxinas, estructura bacteriana, correspondiente al lipopolisacárido presente en bacterias Gram-negativa.

En la tabla 3 se presenta una comparación entre las exotoxinas y las endotoxinas.

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

1.1.2.2. ENDOTOXINAS BACTERIANAS.

Las endotoxinas bacterianas son elaboradas por las bacterias Gram-negativas. La envoltura celular de estas bacterias va a estar compuesta por una membrana citoplasmática, una pared celular delgada de peptidoglicano, que rodea a la anterior, y una membrana externa que recubre la pared celular de estas bacterias. Entre la membrana citoplasmática interna y la membrana externa se localiza el espacio periplásmico relleno de una sustancia denominada periplasma, la cual contiene enzimas importantes para la nutrición en estas bacterias (2).

La membrana externa contiene diversas proteínas, siendo una de ellas las porinas o canales proteicos que permiten el paso de sustancias, a través de la estructura. También presenta unas estructuras llamadas lipopolisacáridos (LPS), formadas por tres regiones: el polisacárido O (antígeno O), una estructura polisacárida central (KDO) y el lípido A (endotoxina) (Fig.3).

La parte exterior de la membrana comprende un complejo de lipopolisacáridos cuya parte lipídica actúa como una endotoxina y es responsable de la capacidad patógena del microorganismo (4).

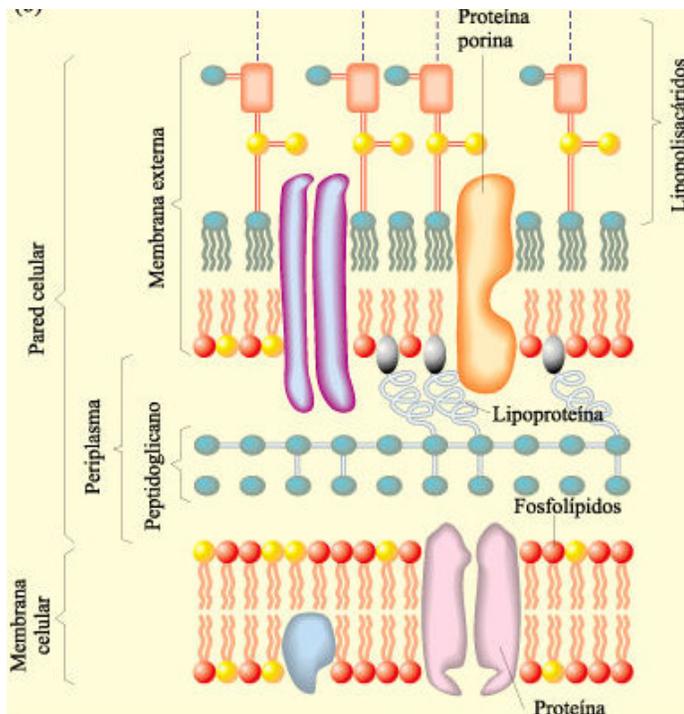


Fig. 3. Pared de la bacteria Gram negativa.

Este componente desencadena una respuesta inmune innata que se caracteriza por la producción de citocinas y la activación del sistema inmunológico. La inflamación es una consecuencia común de la producción de citocinas, que también pueden producir toxicidad. Si la endotoxina entra en el sistema circulatorio, provoca una reacción tóxica con aumento de la temperatura y de la frecuencia respiratoria y disminución de la presión arterial.

1.1.3 MICROORGANISMOS PERIODONTO-PATÓGENOS.

Un milímetro cúbico de placa dental contiene cerca de 100 millones de bacterias, según Thoden van Velzen y puede servir como un reservorio para la persistencia de los posibles agentes patógenos.

Los microorganismos que componen la placa dentobacteriana están conformados por más de 500 microorganismos que se agrupan en 22 géneros. La placa coloniza la superficie de los dientes y el epitelio mucoso formando la placa supra y subgingival.

La cavidad bucal es estéril en el momento del nacimiento, pero entre las 6 y 10 horas se establece una flora microbiana compuesta principalmente por organismos aerobios. Los anaerobios aparecen en algunas bocas en los 10 primeros días (1). Con la edad, aumentan los anaerobios, pero los de tipo facultativo siguen predominando numéricamente. El cálculo microscópico de microorganismos presentes en la saliva oscila de entre 43 millones a 5 500 millones de microorganismos por mililitro, con un promedio de 750 millones (Tabla 4). En la tabla se resume la información obtenida de un censo representativo de la población bacteriana de la saliva. Así mismo, en la boca hay hongos, incluso *Candida*, *Cryptococcus* y *Saccharomyces* y protozoos como *Entamoeba gingivalis* y *Tricomonas texas*.

Tabla 4. FLORA NATURAL DE LA SALIVA HUMANA		
GRUPO BACTERIANO.	AISLADOS PREDOMINANTES DEL GRUPO.	PORCENTAJE.
Cocos facultativos Gram-positivos.	Los estreptococos representan 41% de todos los aislados y se componen de <i>Streptococcus salivarius</i> , <i>Streptococcus mitis</i> y pequeñas cantidades de enterococos; el resto son estafilococos.	46.2
Cocos anaerobios Gram-negativos.	<i>Veillonella</i> .	15.9
Cocos anaerobios Gram-positivos.	<i>Peptostreptococcus</i> o peptococos.	13
Bacterias facultativas Gram-positivas.	<i>Difteroides</i> , <i>Actinomyces</i> .	11.8
Bacterias anaerobias Gram-negativas.	<i>Campylobacter sputorum</i> , <i>Porphyromonas</i> , <i>Fusobacterium</i> .	4.8
Bacterias anaerobias Gram-positivas.	Propionibacterias, <i>Actinomyces</i> .	4.8
Bacterias facultativas Gram-negativas.	No identificadas.	2.3
Cocos facultativos Gram-negativos.	No identificadas.	1.2

La mayoría de las bacterias salivales provienen del dorso de la lengua, de donde son desprendidas por acción mecánica; cantidades menores vienen del resto de las mucosas bucales. El número de microorganismos aumenta temporalmente durante el sueño, y decrece después de las comidas y el cepillado.

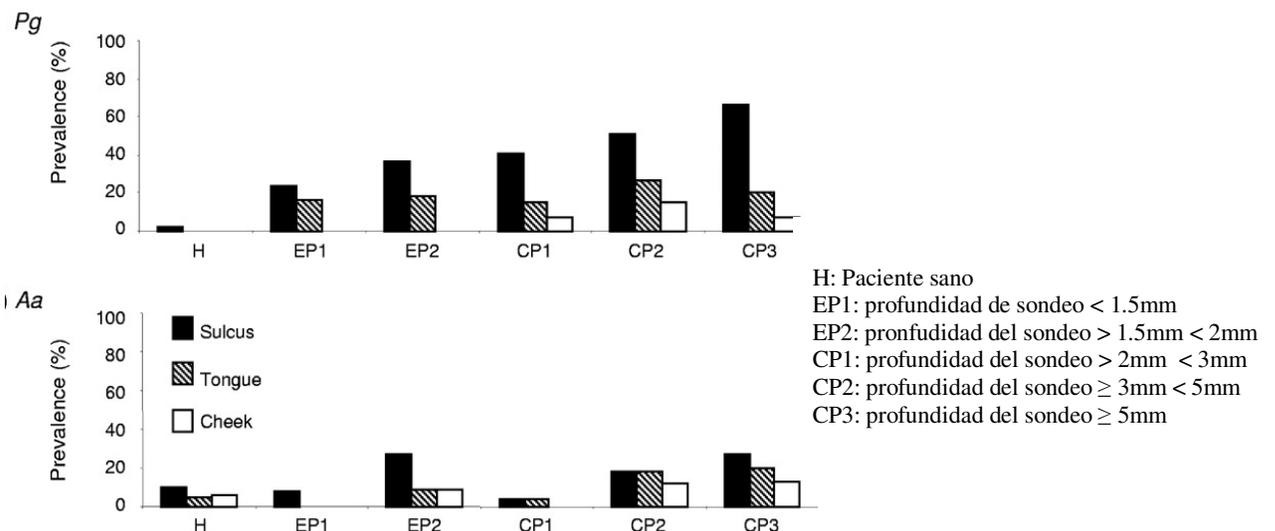
La placa dentobacteriana, por mucho tiempo se ha considerado que está confinada únicamente a la encía, las mucosas, lengua, superficie de los dientes y membranas. Sin embargo, bacterias como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis* invaden tanto células epiteliales como tejido conectivo lo que ocasiona inflamación de las encías y sangrado lo que ocasiona el ingreso de microorganismos de manera sistémica y promueve la enfermedad. De igual forma otros procedimientos como el cepillado dental, cirugías, extracción de piezas dentales promueve el ingreso de las bacterias en el torrente sanguíneo (5).

Entre los patógenos periodontales, de mayor patogenicidad vamos a encontrar: *Campylobacter recto*, *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, y *Tannerella forsythia* (6).

Recientes estudios han demostrado que no sólo patógenos periodontales, como *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia*, están exclusivamente presente en el espacio subgingival de pacientes enfermos, sino que también se ha visto que estos microorganismos pueden colonizar otros sitios, incluyendo zonas supragingivales, como lengua, mejillas, etc. Esto indica que estas bacterias Gram negativas anaerobias también están presentes en una atmósfera aeróbica (7). Además, estos patógenos se encontraron en zonas sub y supragingival y placas dentobacterianas de sujetos sanos (9). Estos resultados implican que la colonización por estos patógenos puede ocurrir en un medio ambiente aeróbico o anaeróbico, ya sea tanto de sujetos sanos como enfermos; cabe destacar que en paciente sanos, estas bacterias se encuentran como bacterias comensales. Sin embargo, cuando las bacterias comensales se agrupan y adquieren la organización necesaria, puede transformar su entorno y adquieren un estado patógeno, una implicación más importante es que esta conversión puede ser causal de la aparición de la enfermedad periodontal.

Estos agentes patógenos bacterianos, incluyendo *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, y *Tannerella forsythia*, son patógenos oportunistas y, por lo tanto, no siguen postulados de Koch (13). Los patógenos oportunistas son agentes infecciosos que normalmente no induce la enfermedad en un huésped sano, pero puede afectar a las personas con un mal funcionamiento o que se encuentren inmunodeprimidos.

P. gingivalis se encuentra destacado en los sujetos con periodontitis, mientras que la incidencia de esta bacteria en los sujetos sanos es muy baja (2% en el surco, 0% en lengua y mejilla mucosa). Resulta interesante, que la incidencia de *P. gingivalis* en el surco gingival va en aumento, directamente proporcional en relación con la severidad de la enfermedad periodontal.



Los microorganismos *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Treponema denticola* se consideran los colonizadores tardíos, colonizan inicialmente el surco gingival y posteriormente la bolsa periodontal. En respuesta al proceso invasivo, el hospedero moviliza y libera leucocitos polimorfonucleares y citocinas. Esta respuesta del hospedero constituye un mecanismo de defensa que al ser un estímulo de naturaleza crónica ocasiona la destrucción de los tejidos periodontales, que en ocasiones involucra el hueso alveolar y conlleva a la pérdida del órgano dentario.

Porphyromonas gingivalis. Este microorganismo se adhiere con todos los componentes de la cavidad oral. Como con las células epiteliales, monocitos, eritrocitos, se une a otras bacterias, a componentes salivales y a proteínas de la matriz extracelular como fibronectina, fibrinógeno y colágena.

Se agrega a microorganismos como *actinomyces* y *estreptococos*. Entre los componentes de la bacteria que intervienen en la agregación se encuentran fimbrias, proteasas y vesículas.

La bacteria presenta dos tipos de fimbrias: las mayores (8,9) y fimbrias menores (10). La fimbria mayor promueve la congregación de microorganismos tales como *Streptococcus gordonii* (11,12) y *Actinomyces viscosus*. De igual manera esta fimbria participa en la adherencia a la superficie dental por asociación con la película dental, a células epiteliales y fibroblastos.

Esta bacteria sintetiza proteasas, colagenasas, peptidasas y hialuronidasas. Las proteasas sirven como vehículo para la congregación de microorganismos como *Actinomyces viscosus* y en la adherencia a células epiteliales y fibroblastos (13,14).

Produce vesículas que son liberadas de su superficie, las cuales contienen lipopolisacáridos. Así mismo se ha demostrado que estas vesículas se adhieren a *Actinomyces viscosus* a matriz extracelular entre las que incluyen colágena, laminina, fibronectina y fibrinógeno (15,16).

Se ha demostrado que la fimbria mayor induce la activación de una enzima, una cinasa que participa en la fosforilación de una proteína de 68 kDa. Se ha observado de igual forma que la adherencia de la bacteria promueve la formación de "coated pits" en la superficie de las células epiteliales lo que sugiere que la internalización de la bacteria se lleva a cabo por el modelo clásico de endocitosis (17,18).

Aggregatibacter actinomycetemcomitans. Entre los mecanismos de adherencia que utiliza esta bacteria se encuentran las fimbrias, vesículas y material proteico amorfo.

Las fimbrias de estas bacterias juegan un papel importante en la adherencia a células epiteliales, hidroxiapatita, y a fibroblastos.

Esta bacteria produce vesículas extracelulares que participa en la adherencia. Produce así mismo una leucotoxina, que es un importante factor de virulencia que promueve la destrucción de leucocitos polimorfonucleares y macrófagos.

Secreta un material amorfo extracelular que permite la adherencia de otras bacterias que presentan una adhesividad débil facilitando de esta forma la colonización de otras bacterias (19).

1.2 RELACIÓN DE LAS ENFERMEDADES PERIODONTALES CON OTROS PADECIMIENTOS SISTÉMICOS.

Los pacientes que padecen enfermedad periodontal pueden aumentar el riesgo de desarrollar enfermedades sistémicas como la diabetes mellitus, enfermedad pulmonar, enfermedad del corazón y derrame cerebral (20). También parece tener una relación directa con otras enfermedades crónicas como la osteoporosis, la artritis y la enfermedad de Alzheimer (20).

La diabetes mellitus es el resultado de una degeneración del metabolismo de la glucosa debido a la disminución de la producción o de respuesta a la hormona insulina liberada por células especializadas dentro de los islotes de Langerhans en el páncreas. Puede conducir a la ceguera, neuropatía periférica, nefropatía, infecciones secundarias, las enfermedades del corazón y enfermedad periodontal. La diabetes incontrolada se piensa que es un factor de riesgo grave para periodontitis (21,22). De un punto de vista médico, la enfermedad periodontal podría influir en el curso de la diabetes. La evidencia sugiere que los padecimientos periodontales se asocia con mal control glucémico en prediabéticos y el tratamiento de la enfermedad periodontal mejora el control glucémico en pacientes diabéticos (23,24).

Las enfermedades respiratorias (especialmente neumonía) es una causa común de mortalidad en los adultos mayores. La cavidad oral, es próxima y contigua a la tráquea, por lo que es un punto potencial de entrada de patógenos respiratorios, y los dientes pueden servir como un importante reservorio de estos patógenos (25). Estas colonias de biofilms se encuentran en las superficies, tales como prótesis o dientes. Una vez establecido en biofilms, los agentes patógenos pueden ser aspirados o derramados en la parte inferior de las vías respiratorias, aumentando el riesgo de infección (26).

Azarpazhooh y Leake (27) llevaron a cabo una revisión sistemática en la que encontraron que la mejora de la higiene bucal y la frecuencia de atención de profesionales en el cuidado de la salud oral redujo la progresión o aparición de enfermedades respiratorias entre los adultos de edad avanzada que se encontraban en alto riesgo de desarrollar enfermedades respiratorias y vivían en hogares de ancianos.

La higiene bucal y la frecuencia de profesionales de atención de la salud oral también pueden ser buenas para el corazón y la salud del cerebro. Los estudios epidemiológicos han encontrado una fuerte asociación entre la enfermedad periodontal y las enfermedades cardiovasculares o accidentes cerebro-vasculares, especialmente en jóvenes de sexo masculino (28,29).

En un estudio radiográfico, con radiografía panorámica de pacientes de 60 a 75 años de edad, los investigadores encontraron una correlación entre la pérdida de hueso alveolar y un aumento del riesgo de experimentar enfermedades cardiovasculares (30).

La enfermedad periodontal, induce la recesión gingival y las posteriores caries radiculares podrían conducir a un mayor riesgo de experimentar enfermedades cardíacas (31). Para los adultos mayores, los investigadores han demostrado un aumento del 1,5% de probabilidades de sufrir aterosclerosis y las enfermedades coronarias en aquellos pacientes mayores que han sufrido periodontitis y pérdida de dental (32).

Uno de los peligros de la aterosclerosis es un mayor riesgo de sufrir un accidente cerebrovascular, la enfermedad periodontal podrían estar asociadas con este aumento del riesgo. Un estudio caso-control encontró que los hombres menores de 60 años que habían tenido periodontitis severa

presentaron un aumento del 4,3% de sufrir un accidente cerebrovascular que los pacientes del mismo grupo de edad que habían presentado la enfermedad leve o no la habían padecido (32). La artritis severa también puede disminuir la calidad de vida de los pacientes, y la pérdida de hueso alveolar se ha asociado con artritis (33). Bartold y colaboradores (34) plantaron la hipótesis de que existe una común des-regulación de las vías proinflamatorias, tanto en la periodontitis como en la artritis, y sugieren firmemente que aquellos pacientes que tienen artritis tienen grandes probabilidades de padecer periodontitis.

La enfermedad periodontal se asocia significativamente con la pérdida de hueso alveolar y el auto-reporte de osteoporosis (35). Algunos estudios indican que la terapia de reemplazo hormonal para la prevención de la osteoporosis en las mujeres también reduce el riesgo de sufrir la pérdida de los dientes (36,37), pero los estrógenos no ha sido utilizado como un agente potencial de reducir la pérdida de dientes en las mujeres de edad avanzada.

2. EFECTOS EN TIPOS CELULARES.

2.1. RECEPTORES SEMEJANTES A TOLL.

En el año de 1997, se descubrió en vertebrados un receptor homólogo al que está presente en la mosca *Drosophila melanogaster* al que se designó como receptor semejante a Toll (TLR de su abreviatura en inglés). Y a partir de su descubrimiento hasta el momento se han descubierto 10 diferentes receptores en humanos y 13 en ratón.

Se ha descubierto que este es un sistema inmune innato. La mayoría de las TLRs interactúan con factores microbianos que son rara vez o casi nunca encontrados en células o tejidos mamíferos y son definidos como modelos moleculares de asociación patógena (PAMP). De los ligandos conocidos que reconocen los TLRs del 1 al 10 y los microorganismos que poseen el ligando se listan en la tabla 5 (38). Los receptores TLR 1 y TLR6 no reconocen a los PAMP directamente pero parecen estar regulados por la respuesta del TLR2 al ácido lipoteicoico de las bacterias.

Receptor	Encontrado en
TLR1	Regulado por TLR2
TLR2	Lipoarabinomannan (Mycobacteria)
	Ácido lipoteicoico (bacterias Gram-pos)
	Peptidoglicanos (bacterias Gram-pos)
TLR3	?
TLR4	LPS (bacterias Gram-neg)
TLR5	Flagelina (muchas bacterias)
TLR6	Regulado por TLR2
TLR7	?
TLR8	?
TLR9	DNA CpG motifs
TLR10	?

Aún no es claro si los ligandos que reconocen los TLRs se unen directamente a ellos. La unión de algunos ligandos a las células con elementos de respuesta de TLR requiere de la participación de una proteína co-receptora como CD14, para el LPS de las bacterias. CD14 no es una proteína transmembranal pero está atado a un extremo de la membrana plasmática de las células por la unión de glicosilfosfatidilinositol. Además, la unión del LPS con el CD14 se aumenta por la participación de otras dos proteínas: la proteína de unión de LPS (LBP) y CD55. Se piensa que LBP y CD55 que juegan un papel en la unión del LPS y luego transfieren el LPS a CD14 que se asocia a TLR4 (Fig. 4).

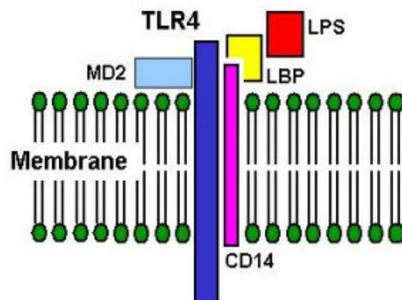


Fig. 4. Representación del TLR 4 y sus proteínas co-receptoras.

Después de la respuesta con su ligando afín, un TLR comienza la señalización de la célula. La señalización procede por medio de rutas bioquímicas; la vía que mejor se ha caracterizado es la de la activación de la ruta del factor nuclear- κ B (NF- κ B). La unión de los ligandos desencadena la dimerización del TLR, lo cual significa que dos ligandos se asocian con los TLRs. Este evento recluta moléculas de señalización adicionales al complejo del receptor en el citoplasma de la célula activada. El reclutamiento se logra a través de eventos de multimerización entre dos tipos diferentes de dominios de proteínas: el dominio TIR y el dominio muerto. El dominio TIR (nombrado así por su importancia en la señalización del receptor toll y la interleucina-1) esta presente en el citoplasma de la cola de los TLRs y en la terminal C de la proteína MyD88. El dominio muerto (nombrado así por la observación temprana de dominios en proteínas que median la vía apoptosis) están presentes en la terminal N de la proteína MyD88 y en la proteína cinasa llamada receptor de interleucina-1 asociada a cinasa (IRAK). De esta forma, MyD88 posee tanto al dominio TIR y al dominio muerto y sirve como un puente entre el complejo TLR y las enzimas de señalización. Se ha referido frecuentemente que MyD88 como una proteína adaptativa. Otra proteína adaptativa, la proteína de adaptación tipo MyD88 (MAL) transduce señales del TLR4, después de la interacción del TLR4 con el LPS bacterial y es parte de una cascada de señalización que es distinta de aquella que es mediada por MyD88. La cascada de señalización activada dentro de la célula involucra a un número de cinasas y otras enzimas y culmina en la activación y translocación nuclear de factores de transcripción como NF- κ B, que resulta en la transcripción de moléculas de importancia inmunológica o las citocinas (Fig. 5).

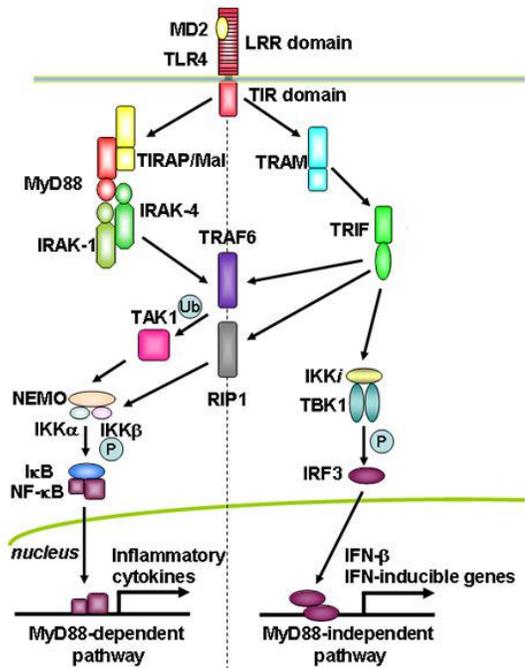


Fig. 5. Mecanismos de señalización a partir del TLR 4.

La vía de señalización usada por la familia de los receptores TLR esta muy reservada con respecto a la evolución, y genes ortólogos de esta vía de señalización se han encontrado en numerosos mamíferos, insectos y plantas. En insectos, la vía de señalización ortóloga es también responsable de mediar el desarrollo de la parte dorso ventral durante la embriogénesis. Esta misma vía de señalización media la producción de péptidos antimicóticos, en moscas de fruta. Por lo tanto la vía de señalización de los TLR se puede derivar de una respuesta antigua de evolución a la infección (38).

El sistema inmune innato reconoce a los microorganismos que se encuentran en individuos sanos y de forma más tardía la respuesta adaptativa del sistema inmune responde a las moléculas patógenas mediante la síntesis de anticuerpos. La respuesta innata se activa porque los receptores denominados Toll reconocen diferentes patrones asociados a patógenos.

2.2. SISTEMA DE TRANSDUCCIÓN DE TLR.

La activación de los receptores deriva en a la producción de citocinas que inducen procesos inflamatorios y moléculas anti-microbiales como óxido nítrico, es decir activa a componentes del sistema inmune. De esta forma se activa a los macrófagos para que eliminen a los microorganismos invasores.

Los TLR presentes en células dendríticas cuando son activados estimulan a las células T para su expansión y diferenciación y se esta forma se inicia la respuesta inmune adaptativa. Otra función adicional de los TLR es inducir la expresión de moléculas co-estimatorias como B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) que son indispensables para activación de la respuesta inmune adaptativa.

Estructuralmente los receptores Toll se consideran proteínas de membrana tipo I, que contienen un motivo repetido de Leucinas y un motivo de señalización que es similar al del receptor a IL-1. Este motivo de señalización actualmente se denomina "receptor Toll-II-1" (TIR).

Cada receptor Toll activa un gran número de vías de transducción. La porción TIR de estos receptores unen a moléculas adaptadores como MyD88 (proteína de respuesta primaria para la diferenciación mieloide); TIRAP (proteína adaptadora que contiene el dominio TIR); TRIF (Dominio TIR que contiene al adaptador inductor de Interferon β) y TRAM (molécula adaptadora relacionada a TIR).

2.3. RECEPTORES TOLL EN LA ENFERMEDAD AL MIOCARDIO.

Los receptores Toll no se expresan de forma exclusiva en el sistema inmune se expresan también en células vasculares y cardíacas. En donde se expresan los tipos 2, 3, 4 y 6. Los receptores Toll2 participan en respuesta al estrés oxidativo. El bloqueo de los receptores Toll2 inhibe la activación de NFkB inducida por peróxido de hidrógeno y disminuye los efectos tóxicos del peróxido de hidrógeno como la apoptosis. Los receptores TLR4 reduce la respuesta apoptótica en cardiomiocitos.

3. FLAVONOIDES.

Los flavonoides son compuestos fenólicos constituyentes de la parte no energética de la dieta humana, incapaces de ser producidos de manera natural por el ser humano. Se encuentran en vegetales, semillas, frutas y en bebidas como vino y cerveza. Se han identificado más de 5.000 flavonoides diferentes. Aunque los hábitos alimenticios son muy diversos en el mundo, el valor medio de ingesta de flavonoides se estima como 23 mg/día, siendo la quercetina el predominante con un valor medio de 16 mg/día. En un principio, fueron consideradas sustancias sin acción beneficiosa para la salud humana, pero más tarde se demostraron múltiples efectos positivos debido a su acción antioxidante y eliminadora de radicales libres (39).

Estos compuestos fueron descubiertos por el premio Nobel Szent-György, quien en 1930 aisló de la cáscara del limón una sustancia, la citrina, que regulaba la permeabilidad de los capilares. Los flavonoides se denominaron en un principio vitamina P (por permeabilidad) y también vitamina C2 (porque se comprobó que algunos flavonoides tenían propiedades similares a la vitamina C)(40). Sin embargo, el hecho de que los flavonoides fueran vitaminas no pudo ser confirmado, y ambas denominaciones se abandonaron alrededor de 1950.

Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante (41,42). Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis o el cáncer (43, 44). Sus propiedades anti-radicales libres se dirigen fundamentalmente hacia los radicales hidroxilo y superóxido, especies altamente reactivas implicadas en el inicio de la cadena de peroxidación lipídica (45) y se ha descrito su capacidad de modificar la síntesis de eicosanoides (con respuestas anti-prostanoide y anti-inflamatoria), de prevenir la agregación plaquetaria (efectos antitrombóticos) y de proteger a las lipoproteínas de baja densidad de la oxidación (prevención de la placa de ateroma) (43, 46-48).

3.1. ESTRUCTURA QUÍMICA.

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6' (fig. 6). La actividad de los flavonoides como antioxidantes depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química (49). Esta estructura básica permite una multitud de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C.

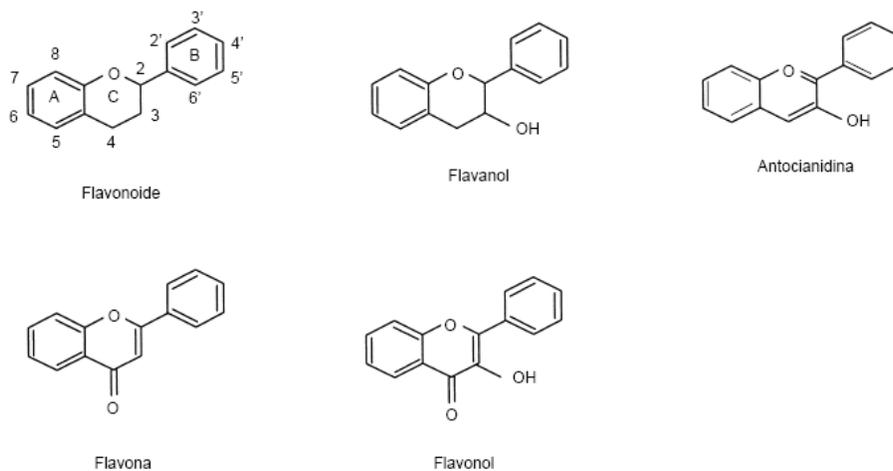


Fig. 6. Composición química de los flavonoides.

En función de sus características estructurales se pueden clasificar en:

1. Flavanos, como la catequina, con un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
2. Flavonoles, representados por la quercitina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y grupo -OH en posición 3 del anillo C.
3. Flavonas, como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3.
4. Antocianidinas, que tienen unido el grupo -OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.

Características estructurales importantes para su función (50):

- a) La presencia en el anillo B de la estructura catecol u O-dihidroxi.
- b) La presencia de un doble enlace en posición 2,3.
- c) La presencia de grupos hidroxilo en posición 3 y 5.

La quercitina presenta las tres características, mientras que la catequina solo presenta la segunda y la diosmetina la primera (fig. 7).

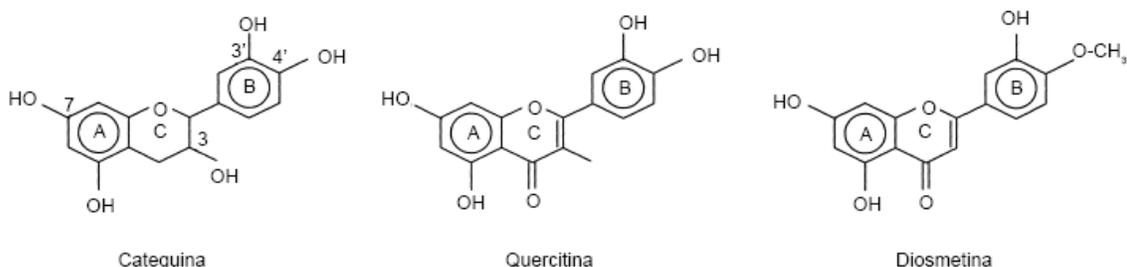


Fig. 7. Estructura química de flavonoides prototipos.

Las propiedades ácido-base muestran que los radicales flavonoides son neutros en un medio ácido (debajo de pH 3) y con una carga negativa a pH 7.

Las repercusiones de la carga negativa son sumamente importantes en la evaluación del potencial antioxidante de los flavonoides (51):

- 1) El radical cargado negativamente no es probable que pase a través de la membrana celular.
- 2) La reacción de los radicales flavonoides con la vitamina E, que es termodinámicamente factible para algunos radicales flavonoides, tiene un obstáculo adicional a causa de la repulsión electrostática entre el anión del radical flavonoide y la membrana fosfolipídica cargada negativamente, donde la vitamina E se incrusta.
- 3) La oxidación de un solo electrón de los flavonoides por cualquier oxidante tendrá una barrera entrópica, porque por lo menos dos protones se intercambian en la reacción. Los protones pueden intercambiarse entre los reactantes o con el solvente en el estado de transición, en este caso, la interfase del enlace con hidrógeno debe tenerse en cuenta (51).

3.2. TIPOS Y FUENTES DE FLAVONOIDES.

Los flavonoides se encuentran en frutas, verduras, semillas y flores, así como en cerveza, vino, té verde, té negro y soja, los cuales son consumidos en la dieta humana de forma habitual y también pueden utilizarse en forma de suplementos nutricionales, junto con ciertas vitaminas y minerales.

Los flavonoides se encuentran también en extractos de plantas como arándano, ginkgo biloba, cardo, mariano o crataegus. Desempeñan un papel importante en la biología vegetal; así, responden a la luz y controlan los niveles de las auxinas reguladoras del crecimiento y diferenciación de las plantas. Otras funciones incluyen un papel antifúngico y bactericida, confieren coloración, lo que puede contribuir a los fenómenos de polinización y tienen una importante capacidad para fijar metales como el hierro y el cobre (52).

3.3. SÍNTESIS, ABSORCIÓN Y METABOLISMO.

Su formación tiene lugar a partir de los aminoácidos aromáticos, fenilalanina y tirosina y también de unidades de acetato (53). La fenilalanina y la tirosina dan lugar al ácido cinámico y al ácido parahidroxicinámico (54), que al condensarse con unidades de acetato, originan la estructura cinamol de los flavonoides (55). Posteriormente se forman los derivados glicosilados o sulfatados.

El metabolismo de los flavonoides es intenso y una parte importante se excretan por la orina. La transformación de los flavonoides tiene lugar en dos localizaciones: en primer lugar en el hígado, por medio de reacciones de biotransformación de fase I en las que se introducen o exponen grupos polares; en segundo lugar en el colon mediante reacciones de biotransformación de fase II, en las que microorganismos degradan los flavonoides no absorbidos. La conjugación con el ácido glucurónico, sulfatos, o glicina (56), parecen tener lugar tanto para los flavonoides como para sus metabolitos procedentes del colon. Los conjugados, solubles en agua, pueden excretarse por la orina (57).

3.4 ACCIÓN ANTIOXIDANTE DE LOS FLAVONOIDES.

La capacidad de los polifenoles vegetales para actuar como antioxidantes en los sistemas biológicos fue ya reconocida en los años treinta (58); sin embargo, el mecanismo antioxidante fue ignorado en gran medida hasta hace poco tiempo. El creciente interés en los flavonoides se debe a la apreciación de su amplia actividad farmacológica. Pueden unirse a los polímeros biológicos, tales como enzimas, transportadores de hormonas, y ADN; quelar iones metálicos transitorios, tales como Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , catalizar el transporte de electrones, y depurar radicales libres (59).

Los criterios químicos para establecer la capacidad antioxidante de los flavonoides (49), son:

- Presencia de estructura O-dihidroxi en el anillo B; que confiere una mayor estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de los electrones.
- Doble ligadura, en conjunción con la función 4-oxo del anillo C (59,60).
- Grupos 3- y 5-OH con función 4-oxo en los anillos A y C necesarios para ejercer el máximo potencial antioxidante.

Los flavonoides retiran oxígeno reactivo especialmente en forma de aniones superóxidos, radicales hidroxilos, peróxidos lipídicos o hidroperóxidos, de esta manera bloquean la acción deletérea de dichas sustancias sobre las células. Sus efectos citoprotectores son patentes en fibroblastos de la piel humana, queratinocitos, células endoteliales y ganglios sensoriales cultivados en presencia de sulfoxina- utionina, un inhibidor irreversible de la glutatión sintetasa (61).

Diversos flavonoides han mostrado su eficiencia para eliminar los procesos de peroxidación lipídica del ácido linoleico o de los fosfolípidos de las membranas, la peroxidación de los glóbulos rojos o la autooxidación de los homogeneizados de cerebro (62, 63). Asimismo, se ha comprobado su potente capacidad de inhibir in vitro la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) por los macrófagos y reducir la citotoxicidad de las LDL oxidadas (64, 65). De hecho, las poblaciones que consumen productos ricos en flavonoides estadísticamente presentan menores riesgos de afecciones cardiovasculares (48).

En ratas se ha podido observar que la quercetina mejora la función contráctil del ventrículo izquierdo y reduce la incidencia de trastornos de la conducción cardíaca. El proceso se limita al área isquémica, protegiendo la ultraestructura de las arterias coronarias, mejorando la circulación coronaria y previniendo la formación de trombos intravasculares. También se han demostrado efectos vasodilatadores en aorta aislada de ratas, efectos antitrombóticos y disminución de las lesiones de reperfusión del miocardio (46, 51). Además, evitan el daño producido al endotelio vascular al prevenir la sobreexpresión de mediadores inflamatorios (IL-8, MCP-1 y ICAM-1) a través de la citocina proinflamatoria TNF- α (61, 66).

Asimismo, se ha puesto de manifiesto que inhibe la peroxidación lipídica producida por el hierro y aumenta la concentración de glutatión en la mucosa intestinal de ratas alimentadas durante tres días con este flavonoides.

La función antioxidante de la quercetina muestra efectos sinérgicos con la vitamina C. El ácido ascórbico reduce la oxidación de la quercetina, de manera tal que combinado con ella permite al flavonoide mantener sus funciones antioxidantes durante más tiempo.

Por otra parte, la quercetina protege de la oxidación a la vitamina E, con lo cual también presenta efectos sinergizantes. Se ha demostrado que los flavonoides inhibe la foto-oxidación de la vitamina E en la membrana celular de las células sanguíneas en presencia de hematoporfirina como fotosensibilizador (53).

En el hígado se ha descrito que la quercitina es capaz de inhibir la activación de las células estrelladas así como la producción de óxido nítrico, alterando vías de expresión de proteínas celulares (67) y en estudios in vitro se ha comprobado que diversos flavonoides inhiben la expresión de la óxido nítrico sintetasa y la formación de óxido nítrico en macrófagos estimulados por LPS (68).

Además, flavonoides como la quercitina y el kaempferol son importantes para el control de las concentraciones intracelulares de glutatión. Son capaces de aumentar el nivel de producción de glutatión en un 50%, induciendo el sistema antioxidante celular y contribuyendo así a la prevención de enfermedades.

Los flavonoides protoantocianídicos pueden ser absorbidos por las membranas celulares y protegerlas de la acción de los radicales libres. Tienen la ventaja de ser liposolubles e hidrosolubles. Por eso, en contraste con otros antioxidantes que no poseen esa doble cualidad, son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y pueden proteger a las células cerebrales, que son muy sensibles a las lesiones producidas por los radicales libres.

Además combaten la inflamación (65, 66) y las alergias y aumentan la efectividad de las células natural killer del sistema inmunológico (66). Muchos de estos efectos antiinflamatorios y antialérgicos podrían explicarse a través de su acción inhibidora sobre el factor de transcripción nuclear kappa B, activador de muchas citocinas proinflamatorias (67, 68). También ejercerían su acción antiinflamatoria al inhibir las actividades enzimáticas del metabolismo del ácido araquidónico por la vía de la 5-lipooxigenasa (69), así como por su actividad antiproteolítica al inhibir algunas proteasas de la matriz.

4. ENDOCARDITIS.

El corazón es un músculo, de forma cónica, con paredes musculares bien desarrolladas (Fig. 8). Está situado en la porción inferior del mediastino anterior, sobre el centro tendinoso del diafragma.

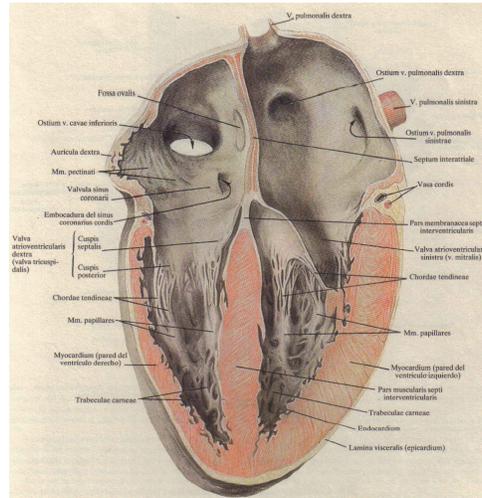


Fig. 8. Corazón (Aspecto anterior)

La pared del corazón consta de tres túnicas: la externa (pericardio), la intermedia (miocardio) y la interna (endocardio).

El endocardio está formado por fibras colágenas y elásticas, entre las cuales se distinguen células del tejido conjuntivo y células de la musculatura lisa. Por el lado de las cavidades del corazón el endocardio está tapizado por un endotelio (70).

La endocarditis es una enfermedad que se produce como resultado de la inflamación del endocardio, un proceso inflamatorio localizado en el revestimiento interno de las cámaras y válvulas cardíacas, ya sea estas naturales o protésicas.

Se caracteriza por la colonización o invasión de las válvulas del corazón formando vegetaciones compuestas por plaquetas, fibrina y microcolonias de microorganismos y, ocasionalmente, células inflamatorias (71). Otras estructuras se pueden ver afectadas, como el tabique interventricular, las cuerdas tendinosas, el endocardio mural o aún implantes intracardiacos.

La endocarditis bacteriana se produce cuando las bacterias del torrente circulatorio (bacteriemia) se alojan en válvulas cardíacas anormales u otro tejido cardíaco dañado. Ciertas bacterias viven normalmente en partes del cuerpo, como la boca y el aparato respiratorio superior, el tracto intestinal, las vías urinarias y la piel. Algunos procedimientos odontológicos y quirúrgicos provocan una leve bacteriemia. La bacteriemia es común después de muchos procedimientos invasivos, pero solamente ciertas bacterias provocan comúnmente la endocarditis (72).

4.1. FACTORES DE RIESGO.

De entre los factores de riesgo más comúnmente asociado al desarrollo de la endocarditis están el consumo de drogas por vía intravenosa, colocación de vías de acceso permanente a las venas, cirugías dentales, algunos defectos cardíacos, debilitamiento valvular y cirugía generales (76,77). En la población pediátrica, el principal factor de riesgo es la presencia de una cardiopatía congénita (75).

Un corazón normal tiene un revestimiento uniforme y es difícil que las bacterias se le adhieran. Sin embargo, las personas con cardiopatía congénita pueden tener zonas no uniformes en el revestimiento del corazón debido a la presión de una abertura anormal, o de una válvula que no cierre correctamente. Incluso después de la cirugía, las zonas no uniformes pueden persistir debido a la formación de tejido de cicatrización o parches utilizados para redirigir el flujo sanguíneo. Estas áreas ásperas dentro del corazón son puntos atractivos y oportunos para que las bacterias se acumulen y multipliquen (73).

En casi todos los casos de endocarditis infecciosa, los microorganismos necesitan un sitio de fijación, tal como una lesión en el endotelio, o un trombo y otras lesiones cardíacas como, una estenosis aórtica (71). El lupus eritematoso sistémico y patologías de hipercoagulabilidad pueden favorecer la deposición de vegetaciones y de microorganismos en ellos. Las bacterias más virulentas pueden adherirse directamente al endotelio intacto.

Los individuos con enfermedades cardíacas congénitas podrían tener un mayor riesgo de desarrollar una infección dentro del corazón. Existe un mayor riesgo entre las personas con afecciones cardíacas cianóticas crónicas o hipertensión pulmonar (síndrome de Eisenmenger). Otras afecciones congénitas que permanecen en riesgo son las que tienen defectos residuales que causan un flujo sanguíneo turbulento a través de las cámaras del corazón y áreas de reparación quirúrgica con materiales artificiales como parches o reemplazos de válvulas (73).

4.2. ETIOLOGÍA.

Aunque la etiología más frecuente de la endocarditis es bacteriana, lo cierto es que los hongos y virus también son considerados como agentes causales de la enfermedad (77). En otras ocasiones resulta imposible identificar el organismo responsable del desarrollo de la endocarditis.

La mayor proporción de los casos de endocarditis son producidas por un pequeño número de bacterias, los cuales llegan al torrente sanguíneo por portales de entrada, como la cavidad bucal, la piel y las vías respiratorias.

Las bacterias más frecuentemente asociadas a la endocarditis infecciosa incluyen:

- *Streptococcus viridans*.
- *Streptococcus pneumoniae*; corresponde al 3 - 7% de los casos de endocarditis en niños.
- *Staphylococcus*; cerca del 85% de los estafilococos coagulasa-negativos que causan endocarditis de prótesis valvulares son resistentes a la meticilina—; el *S. aureus* es la causa más frecuente de endocarditis infecciosa con una tasa bruta de mortalidad cercana al 50% y aproximadamente la mitad de los casos no están asociados a valvulopatías (70).
- *Pseudomonas aeruginosa*.
- Especies de *Candida*.
- Los microorganismos del grupo HACEK (*Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Cardiobacterium*, *Eikenella* y *Kingella*).

Las infecciones que siguen a una prótesis valvular, implantación de catéteres o de marcapasos o dispositivos de desfibrilación y cardioversión eléctrica, son consideradas infecciones nosocomiales y suelen ser causadas por el *Staphylococcus aureus*. Las infecciones en consumidores de drogas por vía intravenosa también tienden a ser por *S. aureus* y casi todos son igualmente resistentes al tratamiento con antibióticos.

En ciertos casos se nota una combinación concomitante de focos infecciosos, como la tríada de endocarditis, meningitis y neumonía, conocida como la tríada de Osler, especialmente en adultos (74). La glomerulonefritis suele aparecer como consecuencia de fenómenos inmunológicos post-infecciosos.

Las bacterias pueden entrar al cuerpo de distintas formas. Según la Asociación Estadounidense del Corazón (American Heart Association), algunas de las maneras más comunes incluyen las siguientes:

- Procedimientos odontológicos (incluyendo la limpieza dental profesional).
- Amigdalectomía o adenoidectomía.
- Examen de las vías respiratorias con un instrumento conocido como broncoscopio rígido.
- Ciertos tipos de cirugía (respiratorias, gastrointestinales, tracto urinario).
- Cirugía de la vesícula biliar o de la próstata.

4.3. PATOGENIA.

Las bacterias que causan endocarditis se ven favorecidas por la presencia en sus superficies de proteínas fijadoras, como los glucanos sobre los estreptococos y las proteínas fijadoras de fibrina sobre el *S. aureus*. Una vez adheridas las bacterias, se forma una densa red de plaquetas, fibrina y microorganismos (Fig. 9). Estas estructuras pueden crear émbolos y causar infartos en sitios distantes del corazón.



Fig. 9. Diseción de un corazón con endocarditis.
Válvula mitral.

La endocarditis bacteriana es una enfermedad grave. Es una infección que puede causar un grave daño al revestimiento interno del corazón y a las válvulas. En la mayoría de los casos, la infección se puede tratar con fuertes antibióticos administrados por vía intravenosa durante varias semanas. No obstante, puede producirse daño cardíaco antes de que se pueda controlar la infección.

4.4. DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD.

El grado de sospecha se incrementa en el momento en el que existen antecedentes de una cardiopatía congénita, consumo intravenoso de drogas, fiebre reumática o una intervención dental reciente. El examen físico puede mostrar esplenomegalia.

Se puede detectar un nuevo soplo cardíaco o un cambio en un soplo cardíaco previo, lo cual está presente en cerca de la mitad de los pacientes con endocarditis (79). El examen de las uñas puede mostrar hemorragias en astilla.

El examen oftalmológico puede mostrar hemorragias retinales caracterizadas por un área central clara (llamada manchas de Roth) y petequias que se pueden detectar en la conjuntiva. Las puntas de los dedos de las manos se pueden agrandar y las uñas pueden encorvarse (Fig. 10).



Fig. 10. Dedos hipocráticos.

En la endocarditis, los síntomas pueden generarse de un modo lento, dependiendo del microorganismo infectante, que puede prolongarse semanas o meses, o en cambio, de modo agudo, producido por microorganismos virulentos (76). No siempre existe una clara separación entre la forma aguda y la subaguda.

En más del 50% de los pacientes se nota:

- Debilidad y fatiga.
- Escalofríos.
- Fiebre.
- Soplo cardíaco.

En menos de la mitad de los pacientes puede verse (79):

- Pérdida de peso.
- Sudoración excesiva y sudoración nocturna.
- Sangre en la orina u orina de color anormal.
- Lesiones de Janeway, (manchas cutáneas en manos y pies).
- Nódulos de Osler (ganglios rojos y dolorosos en las yemas de los dedos).
- Anomalías en las uñas.

Exámenes:

- Hemocultivo repetitivo y pruebas de sensibilidad (la mejor prueba para la detección).
- Serología para ciertas bacterias.
- ECG.
- ESR (tasa de sedimentación eritrocítica, elevada en <90 de los pacientes).
- Factor reumatoide y complejos inmunes circulantes.
- Radiografía del tórax.
- Ecocardiograma transesofágico en adultos y transtorácico en niños.

Criterios de Duke

Los criterios de Duke consisten en un esquema sumamente sensible y específico para el diagnóstico de una endocarditis infecciosa y se dividen en dos; criterios mayores y criterios menores (80).

Criterios mayores:

1. Hemocultivo positivo. Los organismos comunes asociados a una endocarditis infecciosa:
 - a) *Streptococcus viridans*, *Streptococcus bovis*, o el grupo de microorganismos HACEK.
 - b) *Staphylococcus aureus* adquirido en la comunidad o *Enterococcus*.
2. Microorganismos consistentes con una endocarditis infecciosa en hemocultivos definidos por:
 - a) Hemocultivos positivos tomados con más de 12 horas de separación.
 - b) Todos hemocultivos positivos (el 1ro y último tomados con 1 hora de separación)
3. Evidencia de trastornos en el endocardio en el ecocardiograma positivo, definido como:
 - a) Masas cardíacas oscilantes en la válvula o estructuras de soporte
 - b) Absceso.
 - c) Deshaderencia reciente de una válvula protésica.
 - d) Regurgitación nueva de una válvula.

Criterios menores:

1. Predisposición: un trastorno cardíaco pre existente o el uso de drogas intravenosas.
2. Fiebre: temperatura > 38.0° C.
3. Fenómenos vasculares: gran embolismo arterial, infarto pulmonar séptico, aneurisma miótica, hemorragia intracraneal, hemorragias conjuntivales y lesiones de Janeway.
4. Fenómenos inmunológicos: glomerulonefritis, nodos de Osler, manchas de Roth.
5. Evidencia microbiológica: hemocultivo positivo pero no cumple el criterio mayor.
6. Hallazgos ecocardiográficos consistentes con una endocarditis y que no caben dentro del criterio mayor.

De acuerdo a los criterios de Duke para una endocarditis infecciosa, se requiere (81):

- Cumplimiento de dos criterios mayores.
- Cumplimiento de un criterio mayor y tres menores.
- Que estén presentes cinco criterios menores.

4.5. PREVENCIÓN.

La higiene oral es un paso importante para prevenir la endocarditis bacteriana. Las visitas regulares al dentista para una revisión y limpieza dentales son esenciales. La adecuada higiene oral es fundamental, incluyendo el cepillado y uso de hilo dental con regularidad (73).

La American Heart Association, a partir del 2007, no recomienda la administración de antibióticos a los pacientes antes de los procedimientos dentales excepto a los pacientes con el mayor riesgo de sufrir consecuencias graves a causa de la endocarditis.

Actualmente, se recomienda la profilaxis antibiótica sólo para las siguientes afecciones cardíacas:

- Válvulas cardíacas protésicas (artificiales).
- Antecedentes previos de endocarditis.
- Enfermedad cardíaca congénita.
- Recipientes de trasplante cardíaco con enfermedad de la válvula cardíaca.

4.6. TRATAMIENTO

Con cierta frecuencia, se hace necesario hospitalizar al paciente con el fin de administrarle tratamiento intravenoso de carácter antibiótico. Es necesaria la antibioterapia por un tiempo prolongado para erradicar la bacteria de las cámaras y válvulas cardíacas. Cuando el tratamiento es multidisciplinario, en especial con la intervención de un equipo quirúrgico la sobrevida mejora de un 33% a un 88%, especialmente en niños.

Frecuentemente, este proceso terapéutico se prolonga durante 6 semanas (78). Además, el antibiótico seleccionado debe ser específico para el organismo involucrado en este padecimiento, lo cual se determina a través de un hemocultivo y de las importantes pruebas de sensibilidad. La frecuencia de eventos tromبóticos se reduce con la administración de antibióticos.

En el caso de que se desarrolle una insuficiencia cardíaca como resultado de la afección válvular del músculo cardíaco o si el fenómeno infeccioso se está separando en fragmentos pequeños, dando lugar a una extensa una serie de accidentes cerebro vasculares, o existe evidencia de lesión a un órgano, por lo general se hace necesaria una cirugía para reemplazar la válvula cardíaca afectada.

4.7. COMPLICACIONES

Algunas de las complicaciones que podemos encontrar a partir de este padecimiento son:

- Coágulos sanguíneos e infectados a partir de endocarditis que se desplazan al cerebro, riñones, pulmones o abdomen.
- Insuficiencia cardíaca congestiva.
- Arritmias.
- Daño grave de válvulas cardíacas.
- Accidente cerebrovascular.
- Glomerulonefritis.
- Absceso cerebral.
- Ictericia.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La enfermedad periodontal es uno de los padecimientos con mayor índice de prevalencia a nivel internacional. Su etiología es principalmente la placa dentobacteriana y las endotoxias que se encuentran en la pared de las bacterias Gram-negativas, como *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*. En la pared de estas bacterias hay un compuesto denominado lipopolisacárido (LPS), este tiene un alto poder para desencadenar reacciones inmunológicas exageradas.

En la enfermedad periodontal severa se crean separaciones o espacios entre tejidos, permitiendo así que bacterias que forman parte de la microbiota bucal lleguen al torrente sanguíneo, causando una bacteremia, lo cual pone en riesgo la salud y la vida del paciente.

La endocarditis es un padecimiento ocasionado generalmente por bacterias, estas se alojan en las válvulas cardiacas y se reproducen, imposibilitando el correcto funcionamiento del corazón, además de causar inflamación en el endocardio, producir trombos y émbolos, y ser un foco infeccioso que amenaza la integridad de sujeto.

6. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.

Al caracterizar el efecto del lipopolisacárido sobre la activación de proteínas cinasas (MAPK) que participan en la transducción de señales intracelulares en cardiomiocitos, vamos a tener una mayor información acerca de los daños celulares o reacciones a nivel tisular, que va a causar la presencia de bacteria Gram-negativas en el tejido cardiaco.

De igual forma deseamos estudiar la acción de los flavonoides, los cuales son moléculas que tienen efectos anti-inflamatorios, ya que podemos encontrar en estas sustancias vegetales una alternativa para disminuir el daño causado por una inflamación exagerada en los cardiomiocitos.

7. HIPÓTESIS.

7.1. HIPÓTESIS VERDADERA.

Si el LPS se une a su receptor TLR-4 en el H9C2 entonces se desencadenarán cascadas de señalización intracelulares asociadas a la producción de mediadores inflamatorios.

7.2. HIPÓTESIS FALSA.

Si el LPS se une a su respectivo receptor TLR-4 y no es capaz de activar la vía de transducción.

8. OBJETIVOS.

8.1. OBJETIVO GENERAL.

Caracterizar el efecto de los lipopolisacáridos sobre la activación de ERK $\frac{1}{2}$, JNK, p38, y determinar si los flavonoides regulan esta activación.

8.2. OBJETIVO ESPECÍFICO.

- Identificar la fosforilación de ERK $\frac{1}{2}$, JNK, p38, inducida por lipopolisacárido.
- Determinar si los flavonoides, quercetina, luteolina, genisteina y quercetagina regulan esta activación.

9. MATERIAL Y MÉTODOS.

Tipo de estudio: experimental, comparativo y prospectivo.

Tamaño de la Muestra: 1×10^6 células, tejido sano.

9.1 MATERIAL:

Agitador magnético (Nuova).
Balanza GA200 (Ohaus).
Baño de agitación (Precision Scientific).
Cajas de cultivo celular de 6 pozos (Costar).
Cámara de electroforesis vertical (Hoeffer).
Cámara de transferencia (Hoeffer).
Campana de flujo laminar (Nuaire).
Centrifuga (Sorvall).
Espectrofotómetro (Perkin Elmer).
Gendarme (Costar).
Gradillas (Nalgene).
Incubadora (Nuaire).
Megatoscopio.
Microscopio de objetos invertidos C22 (Olympus).
Orbit Shaker (Labline).
Pipetas de 10ml y 5 ml (Finnipipette).
Potenciometro (Equipar).
Probetas graduadas.
Propipeta (Pepet-aid).
Sonicador (Lab-Line instruments).
Timer.
Tubos clínicos.
Tubos de ensayo.
Tubos Eppendorf.
Vasos de precipitado.
Vortex (Scientific industries).

9.2 REACTIVOS:

Acrilamida (Sigma).
Antibiótico-Antimicótico 1% penicilina G sódica, estreptomycin, anfotericina B (GIBCO BRL).
Anticuerpos primarios y Secundarios (Santa Cruz Biotechnologies).
Glicina (Baker).
Kit de quimioluminiscencia (Santa cruz Biotechnology).
Marcador de peso molecular (Bio-rad).
Medio de cultivo Eagle modificado por Dubelcco (GIBCO BRL).
Medio de cultivo de Hanks (GIBCO BRL).
Membrana de PVDF (Amersham Biosciences).
PBS (SIGMA).
Persulfato de amonio.
Suero bovino fetal (GIBCO BRL).
Trisma (Sigma).
NaCl (GIBCO BRL).
Tripsina.
Tween (Sigma).

Vanadato de sodio.

Población en estudio: Línea celular derivada de cardiomiocitos de ratón H9c2 (ATTC).

Selección y tamaño de la muestra: 1×10^6 células.

Criterios de inclusión: Morfología, transparencia del medio.

Exclusión: Cambios en la morfología.

Eliminación: Turbidez del medio.

Tamaño de la muestra: 1×10^6 células.

VARIABLES: tiempo, dosis.

Tipo de estudio: experimental, comparativo y prospectivo.

Escalas de medición: Densidad óptica, microgramos/ml.

9.3 MÉTODOS:

Cultivo de H9c2: Las células (H9c2) crecen en medio de Eagle modificado por Dulbecco (INVITROGEN Life Technologies. Ca, USA.) adicionado con 10% de Suero Bovino Fetal (INVITROGEN Life Technologies. Ca, USA.) y 1% de antibiótico antimicótico (INVITROGEN Life Technologies. Ca, USA.). Se mantienen hasta la confluencia en una incubadora a una atmósfera de 5% de CO₂ y una temperatura de 37°C.

Ensayo de western blot: Detección de la fosforilación de las proteínas ERK, JNK, p38. Por medio del ensayo western blot se realizaron experimentos dosis-respuesta (1, 5, 10, 15, 25 μ l) y curso-temporal (5, 10, 15, 30 y 60 min.). Las H9c2 se sembraron en cajas de 6 pozos con medio de Eagle modificado por Dulbecco adicionado con 10% de Suero Bovino Fetal y 1% de antibiótico antimicótico, cambiando el medio todos los días hasta llegar a la confluencia. Se procedió a ayunar las cajas 2 horas antes del experimento con DMEM libre de suero bovino fetal con 1% de antibiótico antimicótico (INVITROGEN Life Technologies. Ca, USA). Posteriormente se trató cada pozo con LPS de *Porphyromonas gingivalis* (Invivogen, Ca. USA) bajo las condiciones señaladas

en los resultados. Después del tratamiento, se retiró el medio y se colocaron 500 de buffer de fosfato salino (NaCl, KCl, Na₂HPO₄, H₂O, KH₂PO₄) adicionado con 1 Mm de ortovanadato de sodio (INVITROGEN Life Technologies. Ca, USA.) y se rasparon los pozos con gendarme recolectando las células en tubos eppendorf etiquetados que se centrifugaron durante 15 min a 10 000 rpm a 4°C. El sobrenadante fue desechado y la pastilla resuspendida en 20 µl de buffer de lisis (Tris-HCl 20 mM, Triton 1%, Na Cl 137 mM, EDTA 2mM, Vanadato de sodio 1 mM, Glicina, pH 8). Las muestras fueron sonicadas durante 30 segundos a 30 W. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford. Se tomaron 50 µg/ml de cada muestra para su hidrólisis con jugo azul desnaturizante para fosfoproteínas y se colocaron en baño seco a 65°C. Se realizó la electroforesis en gel de acrilamida (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO. Mi. USA) al 10% a 80 V. Las proteínas fueron transferidas a membrana de PVDF (Amersham Biosciences) durante 1 hora, 0.30 Amp. y 20 V. Posteriormente se utilizó solución de bloqueo durante 30 min y 3 lavados de 10 min. cada uno. Se utilizan diferentes anticuerpos para identificar determinadas proteínas.

10. ANÁLISIS DE DATOS Y MÉTODOS ESTADÍSTICOS.

Los resultados se realizaron en dos ocasiones por separado. Se analizaron con el software Labworks el cual obtiene la densidad óptica. Se obtuvo el promedio de los experimentos y se compararon con el control de cada caso, el cual se tomó como el 100% del basal. Sobre estos datos se obtuvo el análisis del gráfico. Se muestra en los resultados un experimento representativo y el análisis gráfico del total de los casos. Se representaron como la media ± Error Standard.

11. RESULTADOS.

EFFECTO DEL LIPOPOLISACÁRIDO OBTENIDO DE *PORPHYROMONAS GINGIVALIS* SOBRE LA ACTIVACIÓN DE ERK ½.

Se realizó un curso temporal con el propósito de evaluar el efecto del LPS sobre la activación de ERK ½. Para el análisis de activación de ERK se realizó un ensayo curso temporal utilizando anticuerpos que detectan la forma fosforilada de ERK ½ (Thr202/Tyr204), que es en última instancia la forma activa de este miembro de las MAPK cinasas. La línea celular de cardiomiocitos de ratas neonatales (H9c2) se sometió a ayuno durante 16 hrs y posteriormente se trataron con LPS a una concentración de 1ug/ml durante diferentes periodos de tiempo, alcanzando como máximo 120 minutos (Fig. 11A). Como se puede observar en la figura el momento máximo de fosforilación fue alcanzado a los 5 minutos de empezado el experimento, luego decrece, entre los 15 y 30 minutos del experimento, para luego aumentar su valor al minuto 60, y posteriormente volver a decrecer a los 120 minutos. Se decidió usar el tiempo de 5 minutos como máxima fosforilación.

En el segundo experimento realizado (Fig. 11B), se llevó a cabo una dosis respuesta con la finalidad de analizar la concentración del LPS optima para tener una fosforilación máxima de ERK ½; se usaron diferentes concentraciones del ligando externo en un tiempo constante; dándonos la concentración de 0.01ug/ml para la fosforilación de la fracción 44 y 0.1ug/ml para la concentración de la fracción 42.

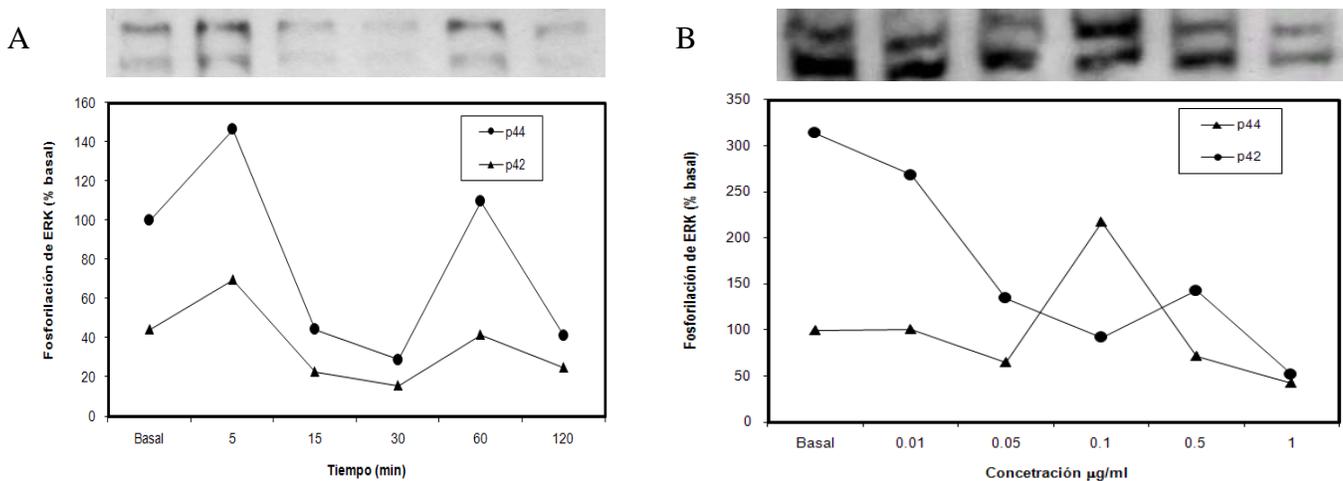


Fig. 11. Curso temporal y Dosis respuesta para la fosforilación de ERK ½. A) Las células adheridas en cajas de 6 pozos; posterior al ayuno de 16 horas, fueron tratadas con LPS (1ug/ml) a una concentración fija y variando los tiempo. B) Las células fueron tratadas con LPS (pg.) como ligando externo a diferentes concentraciones para observar el tiempo máximo de fosforilación, en un periodo de 5 minutos.

Para el tercer experimento realizamos una inhibición con la finalidad de corroborar la capacidad que tiene los flavonoides en la disminución de algunos mediadores químicos de la inflamación (61,66). En este experimento (Fig. 11C) se preincubó con los flavonoides durante 30 minutos, luego se colocó el LPS a las concentraciones adecuadas para desencadenar la fosforilación de ERK ½, durante 5 minutos, y luego se observó que aquellos pozos que fueron tratados previamente con los flavonoides mostraron un descenso en la fosforilación, en comparación a los que solo presentaron el lipolisacárido.

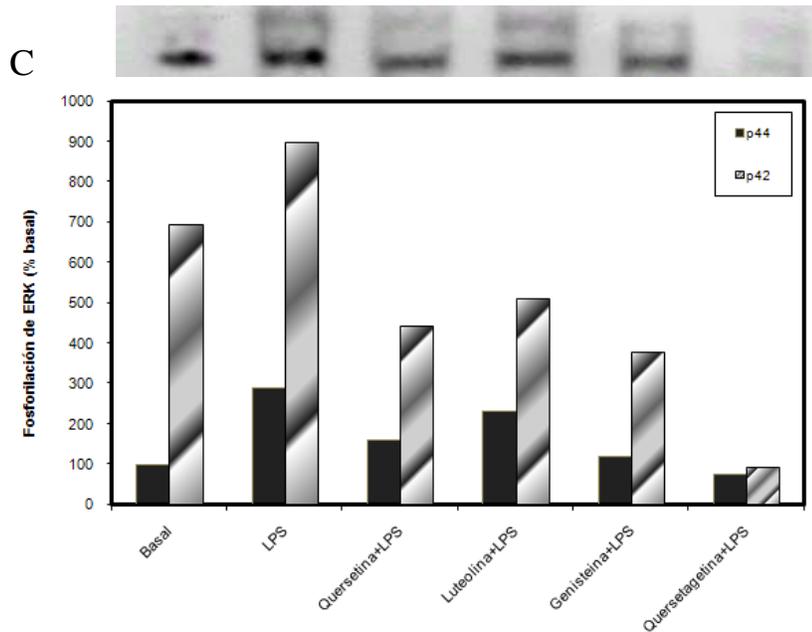


Fig. 11C. Inhibición de la fosforilación de ERK ½ mediante el uso de flavonoides. En la figura se muestra la fosforilación de ERK ½ en cardiomiocitos adheridos en cajas de 6 pozos. Algunos pozos fueron tratados con flavonoides y luego todas las células fueron tratadas con LPS (pg.) como ligando, en aquellos que hubo flavonoides la activación de ERK ½ disminuyó considerablemente.

EFEECTO DEL LPS SOBRE LA ACTIVACIÓN DE P38.

En otra serie de experimentos evaluamos los efectos del LPS sobre la activación de p38 en H9c2. Para lo cual realizamos otro ensayo de western blot mediante el uso de anticuerpos anti-fosfo-p38 (Tyr 182). Se realizó un curso temporal para determinar el tiempo óptimo de fosforilación de esta proteína (Fig. 12A). Se usó una concentración fija de LPS (1ug/ml), variando los tiempos para determinar cual era el tiempo en el cual ocurría la máxima activación de la proteína p38, el cual se encontró a los 15 minutos de colocar el LPS en las células H9c2.

A continuación se elaboró una dosis respuesta (Fig. 12B) para definir cual debía ser la concentración del lipopolisacárido; en este tipo de experimento se usaron diferentes concentraciones de LPS, manteniendo constante el tiempo, el cual fue de 15 minutos, nuestros resultados mostraron que la concentración para desencadenar la máxima fosforilación de p38 es 0,05 ug/ml.

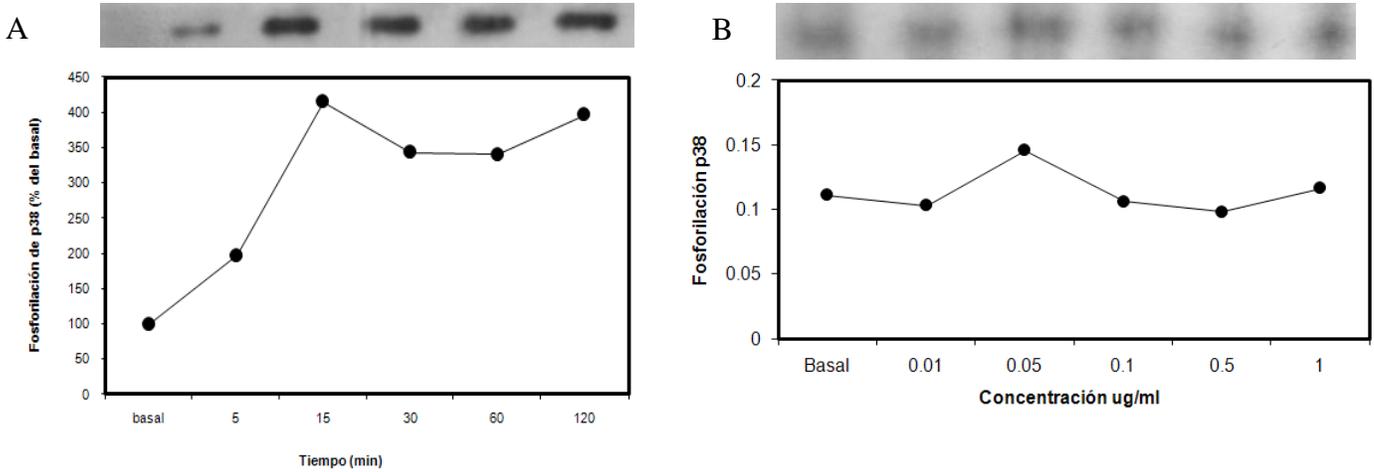


Fig. 12. Curso temporal y Dosis respuesta para la fosforilación p38. A) Las células adheridas en cajas de 6 pozos, posterior al ayuno de 16 horas, fueron tratadas con LPS (1ug/ml) a una concentración fija y variando el tiempo. B) Las células fueron tratadas con LPS (pg.) como ligando externo a diferentes concentraciones para observar el tiempo máximo de fosforilación, a un tiempo fijo de 15 minutos.

El último experimento realizado para la proteína p38 fue una inhibición de la fosforilación de dicha proteína, utilizando para este fin flavonoides (Fig. 12C). En este experimento se preincubó con los flavonoides por 30 minutos y luego se colocó el LPS a la concentración seleccionada con la finalidad de analizar si los flavonoides podían influir en las manifestaciones celulares desencadenadas por el ligando externo. Observamos como los flavonoides disminuyeron la fosforilación de la proteína y por tanto la activación de la misma, siendo la quercetagina, la que presentó una mayor disminución de la fosforilación de p38.

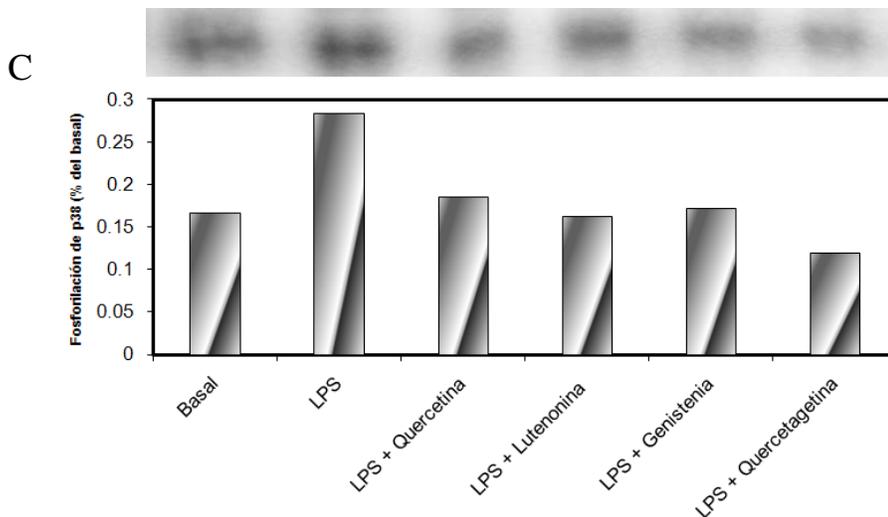


Fig. 12C. Inhibición de la fosforilación de p38 mediante el uso de flavonoides. En la figura se muestra la fosforilación de p38 en cardiomiocitos adheridos en cajas de 6 pozos. Algunos pozos fueron tratados con flavonoides y luego todas las células fueron tratadas con LPS (pg.) como ligando, en aquellos que hubo flavonoides la fosforilación de p38 disminuyó.

EFECTO DEL LPS SOBRE LA ACTIVACIÓN DE JNK.

Se realizaron los experimentos correspondientes para analizar la fosforilación de JNK, se hicieron dos experimentos, 1) Curso temporal y 2) Dosis respuesta.

El primer experimento que se realizó fue un curso temporal (fig. 13A), donde se usaron anticuerpos para detectar la forma fosforilada de JNK (Thr 183/ Tyr 185), mediante un experimento de western blot. Luego de ayunar las células por 16 horas, se colocó LPS a una concentración constante de 1ug/ml, variando los tiempos, para determinar el tiempo máximo de fosforilación de la proteína. Dando como resultado una mayor fosforilación a los 15 minutos.

En el segundo experimento variamos la concentración del lipolisacárido para provocar una mayor fosforilación de JNK, en un ensayo dosis respuesta (fig. 13B). En este experimento pudimos observar que las H9c2 son más sensibles a las concentraciones de 0.5ug/ml de LPS en relación a la fosforilación de la proteína a estudiar (JNK), en un tiempo fijo de 15 minutos.

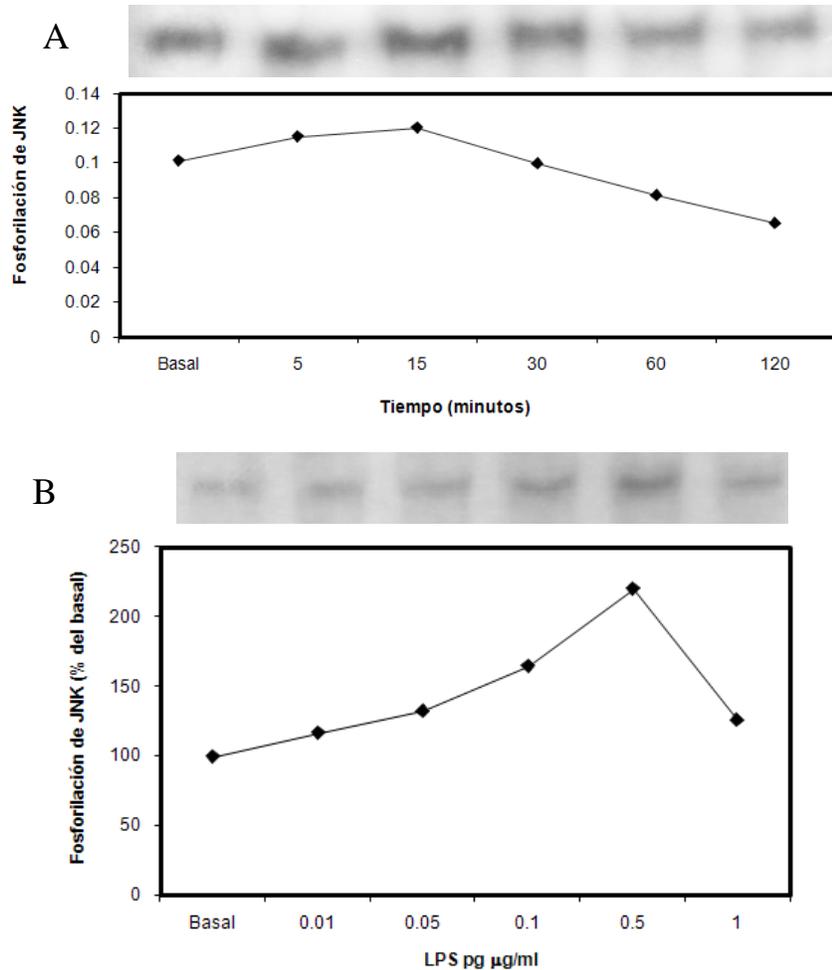


Fig. 13. Curso temporal y Dosis respuesta para la fosforilación p38. A) Las células fueron adheridas en cajas de 6 pozos, posterior al ayuno de 16 horas, fueron tratadas con LPS (1ug/ml) a una concentración fija y variando los tiempo. B) Las células fueron tratadas con LPS (pg.) como ligando externo a diferentes concentraciones para observar el tiempo máximo de fosforilación con un tiempo constante.

EFFECTO DE LAS MAPK EN LA PRODUCCIÓN DE COX2.

La Ciclooxygenasa (COX), es una enzima que permite al organismo producir una sustancia llamada prostaglandina, a partir del ácido araquidónico. Tiene como función mediar en los procesos de inflamación. La COX-2 se expresa tras inducción inflamatoria, aunque es constitutiva en SNC y riñón (82). La expresión de la COX-2 es provocada por diversos mediadores inflamatorios (interferón γ , factor de necrosis tumoral α , interleucina 1, factores de crecimiento).

Para este experimento se realizó una inhibición de las MAPK para caracterizar que cinasa afectaba la expresión de COX2. En este experimento se trabajo con células H9c2, las cuales se pusieron ayunar por 16 horas, posteriormente se preincubaron los pozos con los respectivos inhibidores: PD980390 para inhibir la fosforilación de ERK $\frac{1}{2}$, SB203580 para la inhibición la fosforilación p38, SP600125 para inhibir la fosforilación de JNK y Calfostin C para la inhibición fosforilación de PKC, luego de aplicar los inhibidores se espero 45 minutos y se paso a aplicar el ligando externo.

Los resultados arrojados en la Fig. 14 nos indican que la producción de COX2 esta mediada en un alto grado por las proteínas JNK y p38, de ahí que las disminuciones en las fosforilaciones de estas MAPK, afecten ampliamente las propiedades inflamatorias.

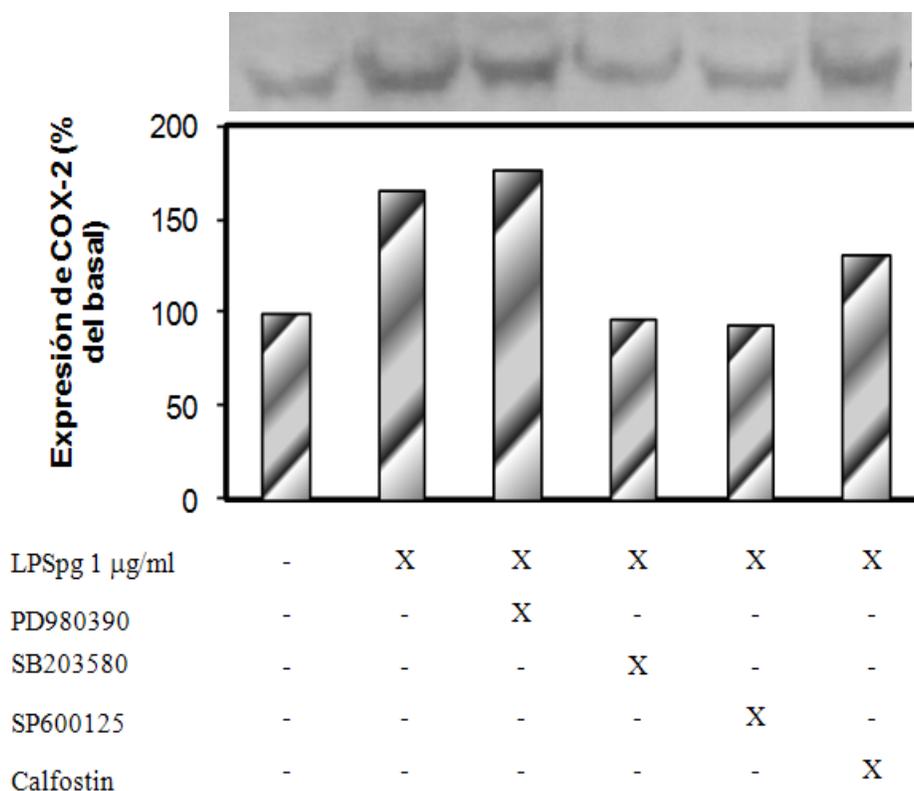


Fig.14. Las células H9c2 (1×10^4) se colocaron en caja de seis pozos y se dejaron adherir durante la noche, el cultivo subconfluyente se ayunó durante 16 hrs en DMEM + 2% SBF. Para el ensayo las células se incubaron por 45 minutos con cada uno de los inhibidores. PD98059 (10 μ M) inhibidor de ERK 1/2; SB203580 (10 μ M) inhibidor de p38; SP600125 (10 μ M) inhibidor de JNK y Calfostina C (1 μ M) posteriormente se trataron con LPS (1 μ g/ml) por 4 hrs. Al término las muestras se procesaron para el ensayo de western-blot.

12. DISCUSIÓN.

En este estudio, investigamos los efectos biológicos y farmacológicos de los siguientes flavonoides: quercetina, luteolina, quercetagina y genisteína sobre la función de las proteínas activadas por mitógeno en cardiomiocitos tratados con lipopolisacárido obtenido de *Porphyromonas gingivalis*.

Hago referenciar que los cardiomiocitos, son las unidades contráctiles del corazón y regulan el ciclo celular durante el periodo perinatal. El subsecuente crecimiento de cardiomiocitos (corazón) refleja un incremento en el tamaño de miocitos cardiacos sin proliferación celular (83). Sin embargo, el crecimiento hipertrófico sostenido conduce a la dilatación ventricular, disfunción contráctil y falla cardiaca (84,85). Algunos estudios muestran que en pacientes que presentan respuesta hipertrófica no requieren de un proceso de adaptación ante el incremento en la actividad física (86).

Recientes investigaciones, muestran que cardiomiocitos H9c2 tratados con lipopolisacárido presentan un incremento en la expresión de los niveles de RNA mensajero que codifica para marcadores de hipertrofia patológica como ANP y BNP. Otras evidencias, señalan que las concentraciones de lipopolisacárido en el plasma de pacientes con falla crónica del corazón se incrementa, con la consecuente activación del sistema inmune (87).

Los LPS son moléculas que actúan como potentes inductores de la producción de citocinas proinflamatorias en cardiomiocitos (88), entre las citocinas que se han caracterizado se encuentran TNF- α , IL-1 e IL-6. Todas estas citocinas están asociadas con los peores síntomas de la disfunción cardiaca y en casos severos con defunciones, provocadas por una disminución en la contracción del miocardio (89,90).

De igual forma, el receptor TLR-4 ha sido caracterizado como la molécula que reconoce de forma específica a los lipopolisacáridos (91). Estudios realizados con LPS, sugieren que la activación de la señal intracelular mediada por el receptor TLR-4 puede estar implicada en el progreso de la aterosclerosis (92). El incremento en la expresión de TLR-4 se ha observado en la falla del corazón y en corazón isquémico (93). Muchos estudios muestran que TLR-4 juega un importante papel en la disfunción del corazón durante la sepsis bacteriana (94) y en el daño del corazón por isquemia/reperfusión.

Corazones de ratones deficientes en TLR-4 muestran una reducción en la respuesta hipertrófica después de la estimulación de la aorta en estudios realizados in vivo. Algunas evidencias muestran que el tratamiento de cardiomiocitos hipertróficos con otros estímulos como estrés osmótico, daño al DNA, radiación ultravioleta, promueve la activación de señalización intracelular entre las que se encuentran las cascadas de cinasas como la de las proteínas activadas por mitógeno (MAPK) como ERK, p38 y JNK (95). Estas cinasas pertenecientes al grupo de las cinasas con actividad serina-treonina son mediadores importantes que participan en la regulación de eventos como proliferación celular, diferenciación celular y crecimiento celular, todos estos procesos asociados con la hipertrofia cardiaca (96-99). Muchos otros estudios sugieren que la activación de NF- κ B está involucrada en la respuesta hipertrófica en cultivos de cardiomiocitos (100).

Así mismo, la endocarditis infecciosa por lo general muestra efectos fatales y puede causar mortalidad a pesar de la infinidad de tratamientos que existen actualmente como el uso de antibacterianos. Históricamente, y desde los comienzos del siglo XXI, se ha sugerido la relación entre las bacterias de la placa dentobacteriana con la endocarditis infecciosa. Desde entonces, ha habido un gran interés por relacionar los procedimientos dentales con la endocarditis infecciosa, y la bacteremia como resultado de tratamientos dentales. Entre los organismos asociados a la endocarditis infecciosa se encuentran el grupo de los estreptococos como *S. sanguis* (31.9%) y *S. oralis* (29.8%).

Por otra parte *Porphyromonas gingivalis* es una bacteria Gram-negativa, involucrada en la patogénesis de la enfermedad periodontal y juega un importante papel en regular un gran número de respuestas celulares. Porque posee moléculas con actividad virulenta como fimbrias, proteasas “gingipains”, lipopolisacáridos y componentes de la cápsula. El lipopolisacárido de esta bacteria induce apoptosis cardíaca. Sin embargo los mecanismos y la naturaleza de sus efectos se desconocen.

Nosotros investigamos el papel del lipopolisacárido obtenido de *Porphyromonas gingivalis* sobre la activación de las proteínas activadas por mitógeno. Encontramos que el tratamiento con LPS induce la activación de ERK $\frac{1}{2}$. Diversos estudios señalan que ERK, está directamente involucrada en mediar efectos como hipertrofia y apoptosis (101-103).

Posteriormente, decidimos evaluar el papel del LPS sobre la activación de p38, encontramos que LPS activa a p38. En una serie de estudios se ha mostrado que la activación de p38 tiene efectos citoprotectores, cuando los cardiomiocitos son expuestos a choque hiperosmótico (104). Sin embargo, los estudios realizados por Shu et al. 2005 (105) no muestran estos efectos en miocitos obtenidos del ventrículo de ratones neonatos. Así mismo, evaluamos el papel de LPS sobre la activación de JNK, encontramos que LPS activa a JNK, cinasa que participa en la regulación del estrés oxidativo y regula respuestas como la apoptosis.

Por otra parte, los flavonoides son compuestos no nitrogenados que tienen como función la atracción de polinizadores hacia las flores o animales que comen sus frutos con la intención de dispersar sus semillas. Estas moléculas tienen diversas propiedades entre las que se encuentran la actividad antioxidante, anticancerosa, antitrombótica, disminución de colesterol, protección hepática y estomacal, así como actividad antimicrobiana. Por este motivo y una vez que hemos caracterizado que los LPS activan a los miembros de la familia de las MAPK, decidimos evaluar el papel de los flavonoides sobre la regulación de las MAPK en cardiomiocitos tratados con LPS.

Encontramos que los flavonoides bloquean la activación de las MAPK inducida por LPS, mostrando un mayor efecto la quercetina.

La quercetina inhibe varias cinasas con actividad de tirosina y de serina-treonina entre las que se incluye a la proteína cinasa C y los miembros de las MAPK (106-108). Por otra parte, los mecanismos moleculares implicados en la regulación de la respuesta inflamatoria de la quercetina, no han sido esclarecidos completamente, pero algunas investigaciones sugieren que podrían estar involucradas vías de señalización como la de tirosina-cinasa y de las MAPK (109). Yoshishima demostró que la quercetina inhibe la actividad de tirosin-cinasas, JNK, ERK, p38 en células mesangiales cuando se exponen a peróxido de hidrógeno (110).

La proteína p38, miembro de la familia de la MAPK, es un importante mediador de la expresión de genes asociados a la respuesta a estrés. Particularmente, p38 tiene un importante papel en la activación de vías transducción intracelular asociada a LPS y a la síntesis de citocinas (111). Así mismo, Joseph demostró que p38 puede funcionar en la transcripción del gene que codifica para IL-1 β en macrófagos estimulados con LPS (112). De igual manera Annabel demostró que la activación de ERK $\frac{1}{2}$ por LPS se requiere para la correcta inducción de las citocinas IL-1B, IL-6 y de TNF α . Nuestros datos muestran que LPS induce la activación de las MAPK (p38, JNK y ERK $\frac{1}{2}$) y que los flavonoides bloquean la activación de estas cinasas.

En conclusión nosotros mostramos por primera ocasión que el LPS obtenido de la bacteria *Porphyromonas gingivalis*, activa la vía señalización de las MAPK cinasas, promueve la expresión de la enzima ciclooxigenasa-2 mediante la activación de la vía de señalización de p38 y JNK. Por otra parte, nuestros resultados muestran que los flavonoides bloquean los efectos del LPS sobre la activación de las MAPK. Por este motivo nuestras investigaciones futuras estarán encaminadas a determinar el efecto de los flavonoides sobre la regulación en la actividad de factores de transcripción en la expresión de genes como IL-1.

13. CONCLUSIONES.

La familia de proteínas MAPK se compone de tres niveles cascadas que participan en la regulación de varios procesos celulares que van desde la expresión de genes hasta la muerte celular. La exposición de células de mamíferos a LPS ha demostrado que activa todas las de señalización relacionada con las MAPK.

Se ha demostrado de igual forma que el lípido A purificado induce en los ratones la fosforilación de las MAPK, siendo este componente la parte activa del LPS y que esto se asocia con la fosforilación de ERK (p44/42), y por tanto su activación (113).

De acuerdo a los resultados expuestos en este trabajo, la exposición de células H9c2 (cardiomiocitos de rata) a LPS, causan la fosforilación de ERK 1/2, JNK y p38 (114,115). Curiosamente, el pre tratamiento de estas células con diferente tipos de flavonoides abolió los cambios causados por LPS en la fosforilación de ERK 1/2 y p38, aun queda pendiente la investigación del comportamiento de JNK, en dichas condiciones.

Con este estudio hemos querido comprobar la importancia de los flavonoides para la inhibición de procesos inflamatorios. Y hemos visto que puede ser un camino a seguir para la disminución de la inflamación del miocardio y así disminuir la capacidad de patogenicidad de algunas bacterias.

Esta capacidad de los flavonoides para inhibir la fosforilación desencadenada por los LPS debe ser estudiada en fibroblastos gingivales humanos (HgF) con la esperanza de hallar un método de menguar la inflamación gingival, responsable de un alto número de patologías orales.

14. BIBLIOGRAFÍA.

1. Liébana Ureña J. "Microbiología oral". Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 1995.
2. Jawetz E, Melnick, Adelberg JL y cols. "Microbiología médica" 15a. edición: México: Manual Moderno; 1996.
3. *Jawetz E, Melnick, Adelberg JL y cols. "Microbiología médica" 15a. edición: México: Manual Moderno; 1996.*
4. Salton MJR, Kim KS (1996). Structure. in: Baron's Medical Microbiology (Baron S et al, eds.), 4th ed., Univ of Texas Medical Branch.
5. DT Durack, Prevention of infective endocarditis. N Engl J Med 332 (1995), pp. 38–44
6. Dalwai, F., D. A. Spratt, and J. Pratten. 2006. Modeling shifts in microbial populations associated with health or disease. Appl. Environ Microbiol. 72:3678-3684.
7. Socransky, S. S. 1979. Criteria for the infectious agents in dental caries and periodontal disease. J. Clin. Periodontol. 6:16-21.
8. RJ Genco, H Sojar, J-Y Lee, A Sharma, G Bedi, M-I Cho and DW Dyer , Porphyromonas gingivalis fimbriae: structure, function, and insertional inactivation mutants. In: RJ Genco, S Hamada, T Lehner, J McGhee and S Mergenhagen, Editors, Molecular pathogenesis of periodontal disease, ASM Press, Washington, DC (1994), pp. 13–23.
9. T Njoroge, RJ Genco, HT Sojar, N Hamada and CT Genco , A role for fimbriae in Porphyromonas gingivalis invasion of oral epithelial cells of special interest . Infect Immun 65 (1997), pp. 1980–1984.
10. Hamada, HT Sojar, M-I Cho and RJ Genco , Isolation and characterization of a minor fimbriae from Porphyromonas gingivalis. Infect Immun 64 (1996), pp. 4788–4794.
11. RJ Lamont, CA Bevan, S Gil, RE Persson and B Rosan. Involvement of Porphyromonas gingivalis fimbriae in adherence to Streptococcus gordonii. Oral Microbiol Immunol 8 (1993), pp. 272–276.
12. PA Goulbourne and RP Ellen. Evidence that Porphyromonas (Bacteriodes) gingivalis fimbriae function in adhesion to Actinomyces viscosus. J Bacteriol 173 (1991), pp. 5266–5274
13. J Li, RP Ellen, CI Hoover and JR Felton. , Association of proteases of Porphyromonas (Bacteriodes) gingivalis with its adhesion to Actinomyces viscosus. J Dent Res 70 (1991), pp. 82–86.
14. RJ Gibbons, DI Hay, WC Childs and G Davis , Role of cryptic receptors (cryptitopes) in bacterial adhesion to oral surfaces. Arch Oral Biol 35 (1990), pp. S107–S114)
15. D Grenier and D Mayrand, Functional characterization of extracellular vesicles produced by Bacteriodes gingivalis. Infect Immun 55 (1987), pp. 111–117
16. RP Ellen and DA Grove, Bacteriodes gingivalis vesicles bind to and aggregate Actinomyces viscosus. Infect Immun 57 (1989), pp. 1618–1620.
17. MJ Duncan, S Nakao, Z Skobe and E Xie, Interactions of Porphyromonas gingivalis with epithelial cells. Infect Immun 61 (1993), pp. 2260–2265
18. B Rosan, J Slots, RJ Lamont, M Listgarten and GM Nelson. Actinobacillus actinomycescomitans fimbriae. Oral Microbiol Immunol 3 (1988), pp. 58–63.
19. M Fives-Taylor, D Meyer and K Mintz, Characteristics of Actinobacillus actinomycescomitans invasion of and adhesion to cultured epithelial cells. Adv Dent
20. J Am Dent Assoc, Vol 138, No suppl_1, 26S-33S. 2007 American Dental Association
21. Tsai C, Hayes C, Taylor GW. Glycemic control of type 2 diabetes and severe periodontal disease in the US adult population. Community Dent Oral Epidemiol 2002;30(3):182–92.
22. Emrich LJ, Shlossman M, Genco RJ. Periodontal disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. J Periodontol 1991;62(2):123–31.
23. Stewart JE, Wager KA, Friedlander AH, Zadeh HH. The effect of periodontal treatment on glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus. J Clin Periodontol 2001;28(4):306–10.

24. Promsudthi A, Pimapansri S, Deerochanawong C, Kanchanasavita W. The effect of periodontal therapy on uncontrolled type 2 diabetes mellitus in older subjects. *Oral Dis* 2005;11(5):293–8.
25. Hayes C, Sparrow D, Cohen M, Vokonas PS, Garcia RI. The association between alveolar bone loss and pulmonary function: the VA Dental Longitudinal Study. *Ann Periodontol* 1998;3(1):257–61.
26. Scannapieco FA. Role of oral bacteria in respiratory infection. *J Periodontol* 1999;70(7):793–802.
27. Azarpazhooh A, Leake JL. Systematic review of the association between respiratory diseases and oral health. *J Periodontol* 2006;77(9):1465–82.
28. Beck JD, Offenbacher S. The association between periodontal diseases and cardiovascular diseases: a state-of-the-science review. *Ann Periodontol* 2001;6(1):9–15.
29. Genco R, Offenbacher S, Beck J. Periodontal disease and cardiovascular disease: epidemiology and possible mechanisms. *JADA* 2002;133(supplement):14S–22S.
30. Persson RE, Hollender LG, Powell LV, et al. Assessment of periodontal conditions as a systemic disease in older subjects. part II: focus on cardiovascular diseases. *J Clin Periodontol* 2002;29(9):803–10.
31. Holm-Pedersen P, Avlund K, Morse DE, et al. Dental caries, periodontal disease, and cardiac arrhythmias in community-dwelling older persons aged 80 and older: is there a link? *J Am Geriatr Soc* 2005;53(3):430–7.
32. Tuominen R, Reunanen A, Paunio M, Paunio I, Aromaa A. Oral health indicators poorly predict coronary heart disease deaths. *J Dent Res* 2003;82(9):713–8.
33. Al-Emadi A, Bissada N, Farah C, Siegel B, Al-Zaharani M. Systemic diseases among patients with and without alveolar bone loss. *Quintessence Int* 2006;37(10):761–5.
34. Bartold PM, Marshall RI, Haynes DR. Periodontitis and rheumatoid arthritis: a review. *J Periodontol* 2005;76 (supplement 11):2066–74.
35. Persson RE, Hollender LG, Powell LV, et al. Assessment of periodontal conditions as a systemic disease in older subjects. part II: focus on osteoporosis. *J Clin Periodontol* 2002;29(9):796–802.
36. Paganini-Hill A. Estrogen replacement therapy: something to smile about. *Compend Contin Educ Dent Suppl* 1998(22):S4–8.
37. Paganini-Hill A. The benefits of estrogen replacement therapy on oral health: the Leisure World cohort. *Arch Intern Med* 1995;155 (21):2325–9.
38. Carlos Ramón Bautista Garfias y Juan Joel Mosqueda Gualito. Papel de los receptores tipo toll en la inmunidad innata y su implicación en medicina veterinaria. *Veterinaria México* Número 4 Octubre-Diciembre Volumen 36.
39. Aherne SA y O'Brien NM.: Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*, 2002, 18:75-81.
40. Singleton VL: Flavonoids. En: Childester CO, Mrak EM, Stewart Gf (eds.): *Advances in Food Research*. New York: Academic Press, 1981, 149-242.
41. Havsteen B: Flavonoids. A class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol*, 1983, 32:1141-1148.
42. Peres W: *Radicais Livres em níveis biológicos*. Ed. Universidade Católica de Pelotas, Brasil, 1994, 49-81.
43. Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamandis EP, Soleas G y Goldberg DM.: The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation in eicosanoid synthesis: implication for protection against coronary heart disease. *Clin Chim Acta*, 1995, 235:207-219.
44. Jang M, Cai L, Udeani GO y cols.: Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 1997, 275:218-221.
45. Jovanovic SV, Steenken S, Simic MG y Hara Y: Antioxidant properties of flavonoids: reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoid radicals. En: Rice Evans C, Parker L (eds.): *Flavonoids in health and disease*. Marcel Dekker, Nueva York, 1998, 137-161.

46. Yang K, Lamprecht SA, Liu Y y cols.: Chemoprevention Studies of the flavonoids quercetin and rutin in normal and azoxymethane-treated mouse colon. *Carcinogenesis*, 2000, 21:1655-1660.
47. Igura K, Ohta T, Kuroda Y y Kaji K.: Resveratrol and quercetina inhibit angiogenesis in vitro. *Cancer Letts*, 2001, 171:11-16.
48. Geleijnse JM, Launer LJ, Van der Kuip DA, Hofman A y Witteman JC.: Inverse association of tea and flavonoid intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam study. *AmJ Clin Nutr*, 2002, 75:880-886.
49. Bors W, Heller W, Christa M y cols. Flavonoids as antioxidants:determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol*, 1990, 186:343-355.
50. Letan A: The relation of structure to antioxidant activity of quercetin and some of its derivatives. *J Food Sci*, 1966, 31:518-523.
51. Neta P, Huie RE, Maruthamuthy P y Steenken S.: Solvent effects in the reactions of alkyl peroxy radical with organic reductants.Evidence for proton-transfer-mediated electron transfer. *Arch Biochem Biophys*, 1989, 93:7654.
52. Formica JV y Regelson W.: Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol*, 1995, 33:1061-1080.
53. Heller W y Forkmann G: Biosynthesis, in *The Flavonoids.Advances in Research since 1986* (Harborne JB). Chapmanand Hall Ltd., London, 1993, 499-535.
54. Wagner H y Farkas L: Síntesis of flavonoids. En: *The Flavonoids.Part I* (Harborne JB, Mabry TJ and Mabry H eds). AcademicPress, New York, 1975, 127-213.
55. Middleton E Jr, Kandaswami C y Theoharides TC: The effectsof plant flavonoids on mammalian cells: implications forinflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev*,2000, 52:673-751.
56. Shargel L y Yu ABC.: Prentice Hall International (UK) Limited.Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics. 3d Ed.London, 1992.
57. Rowland M y Tozer TN: Concepts and Applications. *Pharmacokinetics*.3 Ed: Williams & Wilkins. Baltimore, 1995.
58. Benthath A, Rusznyak S y Szent-György A: Vitamin natureof flavona. *Nature*; 798. En: *Flavonoids in Health and Disease*.Ed Marcel Dekker, INC. New York, 1936, 5:137-161.
59. Rice-Evans CA, Miller NJ y Paganga J: Structure antioxidantactivity relationships of flavonoids and phenolic acids. *FreeRad Biol Med*, 1996, 20:933-956.
60. Cody V, Middleton E, Harborne JB y cols.: Plant flavonoidsin biology and medicine. Biochemical, pharmacological andstructure-activity relationships. Alan R Liss, New York, 1998.
61. Merck, S.A. Industrias Químicas: Bioflavonoides: Quercetinay Rutina. Informe a Profesionales, 2000.
62. Ursini F, Maiorino M, Morazzoni P y cols.: A novel antioxidantflavonoid (IdB 1031) affecting molecular mechanisms ofcellular activation. *Free Rad Biol Med*, 1994, 16:547-553.
63. Laughton MJ, Halliwell B, Evans PJ y cols.: Antioxidant andprooxidant actions of the plant phenolic quercetin, gossypoland myricetin. Effect on lipid peroxidation, hydroxyl radical generation, and bleomycin-dependent damage to DNA. *BiochemPharmacol*, 1989, 38:2859-286.
64. Hirano R, Sasamoto W, Matsumoto A, Itakura H, Igarashi O yKondo K: Antioxidant ability of various flavonoids againstDPPH radicals and LDL oxidation. *Internal Medicine I, NationalDefense Medical College, Tokorozawa, Saitama, Japan.J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 2001, 47:357-362.
65. Terao J, Yamaguchi S, Shirai M y cols.: Protection by quercetinand quercetin 3-O-beta-D-glucuronide of peroxynitrite-inducedantioxidant consumption in human plasma low-density lipoprotein. *Free Radic Res*, 2001, 35:925-931.
66. Wang J y Mazza G: Effects of anthocyanins and other phenoliccompounds on the production of tumor necrosis factor alphain LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages. *J Agric Food Chem*, 2002, 50:4183-4189.
67. Kawada N, Seki S, Inoue M y Kurobi T: Effect of antioxidants, resveratrol, quercetin and N-acetylcysteine, on thefunction of cultured rat hepatic stellate cells and Kupffer cells. *Hepatology*, 1998, 27:1265-1274.

68. Autore G, Rastrelli L, Lauro MR y cols: Inhibition of nitricoxide synthase expression by a methanolic extract of *Crescentialata* its derived flavonols. *Life Sci*, 2001, 70:523-534.
69. Sen CK, Khanna S, Gordillo G, Bagchi D, Bagchi M y Roy S: Oxygen, Oxidants, and Antioxidants in Wound Healing: An Emerging Paradigm. *Ann N Y Acad Sci*, 2002, 957:239-249.
70. Sinelnikov R. D. Atlas de Anatomía Humana. Editorial Mir. Impreso en el la URSS. 1986. pp240-255
71. Harrison 16 Ed. Principios de Medicina Interna. McGraw-Hill, pp. 731-740.
72. <http://www.americanheart.org/presenter.jhtml?identifier=3041073>
73. http://www.healthsystem.virginia.edu/UVAHealth/peds_cardiac_sp/bacteria.cfm
74. <HTTP://www.eMedicine.com/med/topic671.htm> Infective Endocarditis. Infectious Diseases. eMedicine.com.
75. Endocarditis caused by *Streptococcus pneumoniae* in children: Case report and review. *Rev. chil. infectol.* [online]. Dec. 2005, vol.22, no.4 p.361-367.
76. MedlinePlus (noviembre 2007). Endocarditis. (<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/001098.htm>) Enciclopedia médica en español.
77. Asociación Americana del Corazón. Endocarditis bacteriana (<http://www.americanheart.org/presenter.jhtml?identifier=3041073>).
78. *JAMA* Vol 288 (1): 128.
79. Instituto del Corazón de Texas (julio 2007). Endocarditis infecciosa (http://www.texasheartinstitute.org/HIC/Topics_Esp/Cond/endocard_span.cfm). Centro de Información Cardiovascular.
80. New criteria for diagnosis of infective endocarditis: utilization of specific echocardiographic findings: Duke Endocarditis Service. *Am J Med.* 96:200-209, 1994.
81. New criteria for diagnosis of infective endocarditis: utilization of specific echocardiographic findings. Duke Endocarditis Service. *American Journal of Medicine.* 96(3):200-9, 1994.
82. Fung H.B.; Kirschenbaum H.L. *Selective cicloxygenase-2 inhibitors for the treatment of arthritis* Clin. Ter. 1999. 21:1131-1157.
83. Clerk A, Cullingford TE, Fuller SJ et al (2007) Signaling pathways mediating cardiac myocyte gene expression in physiological and stress responses. *J Cell Physiol* 212:311–322
84. Towbin JA, Bowles NE (2002) The failing heart. *Nature* 415:227–233
85. Hunter JJ, Chien KR (1999) Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N Engl J Med* 341:1276–1283
86. Bartunek J, Weinberg EO, Tajima M et al (2000) Chronic N(G)-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension: novel molecular adaptation to systolic load in absence of hypertrophy. *Circulation* 101:423–429.
87. Niebauer J, Volk HD, Kemp M (1999) Endotoxin and immune activation in chronic heart failure: a prospective cohort study. *Lancet* 353:1838–1842.
88. Wagner DR, Combes A, McTiernan C et al (1998) Adenosine inhibits lipopolysaccharide-induced cardiac expression of tumor necrosis factor-alpha. *Circ Res* 82:47–56.
89. Rauchhaus M, Doehner W, Francis DP et al (2000) Plasma cytokine parameters and mortality in patients with chronic heart failure. *Circulation* 102:3060–3067.
90. Kumar A, Haery C, Parrillo JE (2000) Myocardial dysfunction in septic shock. *Crit Care Clin* 16:251–287.
91. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394–397.
92. Methe H, Kim JO, Kofler S, Weis M, Nabauer M, Koglin J (2005) Expansion of circulating Toll-like receptor 4-positive monocytes in patients with acute coronary syndrome. *Circulation* 111:2654–2661.
93. Frantz S, Kobzik L, Kim YD et al (1999) Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium. *J Clin Invest* 104:271–280.
94. Baumgarten G, Knuefermann P, Nozaki N et al (2001) In vivo expression of proinflammatory mediators in the adult heart after endotoxin administration: the role of toll-like receptor-4. *J Infect Dis* 183:1617–1624.

95. Karin M, Ben-Neriah Y (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol* 18:621–663
96. Glennon PE, Kaddoura S, Sale EM et al (1996) Depletion of mitogen-activated protein kinase using an antisense oligodeoxynucleotide approach downregulates the phenylephrine-induced hypertrophic response in rat cardiac myocytes. *Circ Res* 78:954–961.
97. Yue TL, Gu JL, Wang C et al (2000) Extracellular signal-regulated kinase plays an essential role in hypertrophic agonists, endothelin-1 and phenylephrine-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 275:37895–37901
98. Behr TM, Berova M, Doe CP et al (2003) p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors for the treatment of chronic cardiovascular disease. *Curr Opin Investig Drugs* 4:1059–1064
99. Choukroun G, Hajjar R, Kyriakis JM et al (1998) Role of the stress-activated protein kinases in endothelin-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Clin Invest* 102:1311–1320
100. Cook SA, Novikov MS, Ahn Y et al (2003) A20 is dynamically regulated in the heart and inhibits the hypertrophic response. *Circulation* 108:664–667.
101. Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 1999; 79: 143–180.
102. Bishopric NH, Andreaka P, Slepak T, Webster KA. Molecular mechanisms of apoptosis in the cardiac myocyte. *Curr Opin Pharmacol* 2001; 1: 141–150.
103. Ho PD, Zechner DK, He H, Dillmann WH, Glembotski CC, McDonough PM. The Raf-MEK-ERK cascade represents a common pathway for alteration of intracellular calcium by Ras and protein kinase C in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 1998; 273: 21730–21735
104. H.E. Hoover, D.J. Thuerauf, J.J. Martindale and C.C. Glembotski, *J. Biol. Chem.* 275 (2000), pp. 23825–23833.
105. E. Shu, H. Matsuno, S. Akamastu, Y. Kanno, H. Suga, K. Nakajima, A. Ishisaki, S. Takai, K. Kato, Y. Kitajima and O. Kozowa, *Arch. Biochem. Biophys.* 438 (2005), pp. 111–118.
106. Kawada N, Seki S, Inoue M, Kuroki T. Effect of antioxidants, reversatol, quercetin, and n-acetylcysteine, on the functions of cultured rat hepatic stellate cells and Kupper cells. *Hepatology* 27: 1256-1274, 1998
107. Hagiwara M, Inoue S, Tanada T, Nunoki K, Ito M, Hidaka H. Differential effects of flavonoids as inhibitors of tyrosine protein kinase and serine/threonine protein kinases. *Biochem. Pharmacol.* 37: 2987-2992, 1998.
108. Csokay B, Prajda N, Weber G, Olah E. Molecular mechanisms in the antiproliferative action of quercetin. *Life Sci.* 60: 2157-2163, 1997.
109. Yokoo T, Kitamura M: Unexpected protection of glomerular mesangial cells from oxidant-triggered apoptosis by bioflavonoid quercetin. *Am J Physiol* 273: 206–212, 1997
110. Yoshihisa I, Kitamura M: Bioflavonoid quercetin inhibit mitosis and apoptosis of glomerular cells in vitro and vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 297: 629–634, 2000
111. Lee JC, Young PR: Role of CSBP/p38/RK stress response kinase in LPS and cytokine signaling mechanisms. *J Leuk Biol* 59: 152–157, 1996
112. Joseph JB, Yanhua B, Clifford JB: The role of p38 mitogen-activated protein kinase in IL-1 β transcription. *J Immunol* 162: 5367–5373, 1999
113. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293: L336–L344, 2007. First published May 11, 2007; doi:10.1152/ajplung.00011.2007
114. Guha M, O'Connell MA, Pawlinski R, Hollis A, McGovern P, Yan SF, Stern D, Mackman N. Lipopolysaccharide activation of the MEK/ERK1/2 pathway in human monocytic cells mediates tissue factor and tumor necrosis factor alpha expression by inducing Elk-1 phosphorylation and Egr-1 expression. *Blood* 98: 1429–1439, 2001.
115. Kim HJ, Lee HS, Chong YH, Kang JL. p38 Mitogen-activated protein kinase up-regulates LPS-induced NF- κ B activation in the development of lung injury and RAW 264.7 macrophages. *Toxicology* 225: 36–47, 2006.
116. Lee HS, Kim HJ, Moon CS, Chong YH, Kang JL. Inhibition of c-Jun NH2-terminal kinase extracellular signal-regulated kinase improves lung injury. *Respir Res* 5: 23, 2004.