



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



FACULTAD DE ODONTOLÓGIA

**EFFECTO DE LOS FLAVONOIDES SOBRE LA ACTIVACIÓN DE SEÑALES
INTRACELULARES POR ÁCIDO LIPOTEICOICO EN CARDIOMIOCITOS (H9c2)**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANO DENTISTA

PRESENTA:

CARLOS GIROSHI BANDO CAMPOS

TUTORA: DRA. GLORIA GUTIÉRREZ VENEGAS

PROYECTO FINANCIADO POR PAPIIT IN218609-3

MÉXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGREDICIMIENTOS

- Principalmente agradezco a Dios por darme la oportunidad de terminar esta tesis y esta parte de mi vida. GRACIAS POR TODO.
- A mi papá y a mi mamá. Papá, a pesar de que ya no estas físicamente con nosotros se que desde el Cielo intercedes por cada uno de nosotros y que realmente fuiste una parte importante de este esfuerzo y serás una parte importante de mi vida por siempre junto con mi mamá. Mamá, gracias por todo lo que haces por mí y por nosotros.
- A la Dra. Gloria por todo lo que me ha enseñado, por su exigencia y su paciencia y principalmente por su apoyo.
- A mis hermanos por estar juntos en las buenas y en las malas.
- Dulce, gracias por toda tu ayuda y por todo tu apoyo.
- A mis amigos que me han apoyado en los momentos difíciles.

ÍNDICE

1.	RESUMEN	1
2.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
3.	JUSTIFICACIÓN DE ESTUDIO	4
4.	INTRODUCCIÓN	5
5.	ANTECEDENTES.	6
	5.1. ENFERMEDAD PERIODONTAL	6
	5.1.1. Definición	6
	5.1.2. Etiología	6
	5.1.3. Patogenia	7
	5.1.4. Microorganismos periodontopatógenos	12
	5.1.5. Endotoxinas bacterianas	18
	5.2. ENDOCARDITIS	23
	5.2.1. Etiología	23
	5.2.2. Factores de riesgo	23
	5.2.3. Patogenia	24
	5.2.4. Diagnóstico	25
	5.2.5. Tratamiento	26
	5.2.6. Complicaciones	27
	5.2.7. Prevención	27
	5.3. EFECTOS DE LOS MIRCROORGANISMOS PERIODONTOPATÓGENOS EN CARDIOMIOCITOS	28
	5.3.1. Receptores Toll	28
	5.3.2. Sistema de transducción de los TLR	32
	5.4. LOS FLAVONOIDES Y LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR	35
	5.4.1. Los flavonoides y la inflamación	36
	5.4.2. Mecanismos anti-inflamatorios de las flavonoides	38

5.4.3. Los flavonoides, la inflamación y la enfermedad cardiovascular	39
6. OBJETIVOS	43
6.1. GENERALES	43
6.2. ESPECÍFICOS	43
7. HIPÓTESIS	44
7.1. HIPÓTESIS VERDADERA	44
7.2. HIPÓTESIS FALSA	44
8. TIPO DE ESTUDIO Y TAMAÑO DE MUESTRA	45
9. MATERIAL Y MÉTODOS	46
10. RESULTADOS	51
11. DISCUSIÓN	66
12. CONCLUSIONES	69
11. REFERENCIAS	70

1. RESUMEN

Efecto de los flavonoides sobre la activación de señales intracelulares por ácido lipoteicoico en cardiomiocitos (H9c2)

Introducción: Las infecciones focales denominadas también de translocación bacteriana connotan enfermedades infecciosas ocasionadas ya sea por microorganismos o por diversos componentes de estas y que se caracterizan porque invaden en sitios distantes al lugar en donde se produjo su colonización inicial. Las infecciones focales dentales involucran a microorganismos que participan en el desarrollo de enfermedades en sitios extraorales. Las infecciones focales dentales están sujetas a una amplia controversia debido a la carencia de alguna evidencia que muestre cuales son las moléculas que ocasionan la enfermedad. Sin embargo, padecimientos dentales como periodontitis, lesiones periapicales y caries dental, están asociadas a enfermedades coronarias entre las que se encuentran infarto, arteroesclerosis coronaria, isquemia y endocarditis. Así mismo, diversas evidencias muestran que cuando *Streptococcus sanguis*, está presente en el torrente sanguíneo es capaz de promover agregación plaquetaria, en estudios realizados *in vitro*, lo que conduce a la evolución de endocarditis, trombosis coronaria e infarto. *Streptococcus sanguis* es una bacteria Gram-positiva presente en la placa dentobacteriana que libera moléculas al entorno evitando de esta manera la colonización de otras especies de *Streptococcus* que ocasionan cavidades. De igual manera en la superficie presenta moléculas de ácido lipoteicoico, que en últimas fechas han estado sujetas a un amplio estudio ya que se consideran como las endotoxinas de las bacterias Gram-positivas, por su capacidad de inducir la expresión de moléculas promotoras de procesos inflamatorios. Por otra parte los flavonoides son compuestos polifenólicos que se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal y que presentan actividades anti-inflamatorias.

Objetivo: Determinar si el tratamiento con ácido lipoteicoico induce la activación y expresión de moléculas que actúan en la endocarditis. Así mismo en este estudio nosotros analizamos el efecto de algunos flavonoides sobre la activación de las MAP cinasas, fosforilación de I κ B y expresión de ciclooxigenasa-2 (COX2) e interleucina-1 β (IL-1 β) inducida por el LTA obtenido de *Streptococcus sanguis* en cardiomiocitos.

Resultados: Nuestros resultados mostraron que LTA induce la fosforilación de ERK, p38, JNK, AKT e I κ B en cardiomiocitos. En otra serie de experimentos, encontramos que cuando se preincubaron las células con los flavonoides se bloqueó la fosforilación de los miembros de la familia de las MAPK (p38, JNK y ERK), AKT e I κ B inducida por el ácido lipoteicoico. Encontramos así mismo, que el flavonoide que presentó una mayor actividad en bloquear la fosforilación de estas proteínas fue la quercetina en relación con los siguientes flavonoides: quercetina, genisteina y luteolina. Por otra parte el tratamiento con LTA promovió la fosforilación de I κ B y la expresión de IL-1 β y de ciclooxigenasa-2 (COX-2) y síntesis de prostaglandina E2. En otra serie de resultados, encontramos que el tratamiento con los flavonoides bloqueó la fosforilación de I κ B y la expresión de COX2 y de IL-1 β , así como la síntesis de prostaglandina E2.

Conclusión: Con estos resultados podemos concluir que los flavonoides interfieren con la señalización de LTA reduciendo la activación de las MAP cinasas y este evento inhibitorio se correlaciona con la inhibición en la síntesis de COX-2 y de IL-1 β .

Palabras clave: flavonoides, ácido lipoteicoico, cardiomiocitos, endocarditis.

Abreviaturas: ERK, cinasa regulada extracelularmente; JNK, cinasa terminal c-jun; LTA, ácido lipoteicoico; MAPK, proteínas cinasa activadas por mitógeno; COX-2, ciclooxigenasa-2, IL-1 β , interleucina-1 β

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la cavidad bucal se encuentran diferentes tipos de bacterias que desarrollan la placa dentobacteriana y que provocan la caries dental. Dentro de la gran variedad de estas bacterias se encuentra *Streptococcus sanguis* que es una bacteria Gram-positiva del grupo viridans la cual cuando está presente en la boca en una gran cantidad y llega al torrente sanguíneo por casi cualquier tratamiento odontológico puede colonizar alguna estructura anatómica como las válvulas cardiacas donde desencadena una severa respuesta inflamatoria y apoptótica en las células del endocardio y miocardio.

3. JUSTIFICACIÓN DE ESTUDIO

Mediante la caracterización e inhibición por medio de los flavonoides de una de las vías de transcripción más importantes de la respuesta inmune innata en células miocárdicas provocada por *Streptococcus sanguis*, una bacteria muy común en la cavidad bucal, se da un paso muy importante para una futura creación de fármacos a base de sustratos vegetales que inhiban específicamente la respuesta pro-inflamatoria y muerte celular provocada por diferentes enfermedades sistémicas como la endocarditis infecciosa y la aterosclerosis entre otras y evitar el daño tisular en estructuras tan importantes como el corazón.

4. INTRODUCCIÓN

Entre las enfermedades dentales de mayor prevalencia en el mundo se encuentran la caries y la enfermedad periodontal. La etiología de ambas enfermedades ha sido ampliamente descrita y se ha demostrado que están involucrados microorganismos específicos presentes en la placa dentobacteriana. 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. 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 (1-4).

Como mencionamos en líneas anteriores, 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, los microorganismos presentes en la placa subgingival pueden ocasionar infecciones en otras partes del organismo. Se ha establecido con certeza que los microorganismos de la placa dentobacteriana pueden ocasionar trombosis coronaria, infarto y endocarditis (5-9).

5. ANTECEDENTES

5.1. ENFERMEDAD PERIODONTAL

5.1.1. DEFINICIÓN

El término enfermedad periodontal, se refiere a un conjunto de enfermedades inflamatorias que afectan los tejidos de soporte del diente, encía, hueso y ligamento periodontal. Se considera el resultado del desequilibrio entre la interacción inmunológica del huésped y la flora de la placa dental marginal que coloniza el surco gingival (10).

5.1.2. ETIOLOGÍA

Durante siglos los libros de texto odontológicos recomendaban la higiene bucal correcta como medida de prevención contra las enfermedades dentarias. Sin embargo la importancia de los depósitos dentarios para la generación de enfermedad periodontal careció de bases científicas hasta mediados del siglo pasado, cuando se realizaron estudios epidemiológicos bien trazados (11). A partir de tales estudios quedó establecido que la presencia de depósitos dentarios, mineralizados o no es sin duda el factor más importante en la generación de enfermedad periodontal (OMS 1961).

La enfermedad periodontal se inicia cuando los microorganismos de la placa dental (i.e. los colonizadores tardíos *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, y *T. denticola*) colonizan el surco gingival y, provocando después, la bolsa periodontal. La respuesta del huésped al daño bacteriano se da por una entrada de leucocitos polimorfonucleares hacia la gingival (12).

5.1.3. PATOGENIA

Placa dentobacteriana

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. 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. En la Tabla I 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*. En algunos casos, en la cavidad oral se encuentran algunos virus (11).

Tabla I. 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	46.2

	estafilococos	
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, Actinomyces</i>	11.8
Bacterias anaerobias Gram-negativas	<i>Campylobacter sputorum, Porphyromonas, 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.

Placa Supragingival

Las superficies dentarias, tanto el esmalte como el cemento expuestos, están normalmente cubiertos por una delgada película adquirida de glucoproteínas. Si se retira, mediante instrumentación mecánica, se vuelve a formar en pocos minutos. Se cree que la película desempeña un papel activo en la adhesión selectiva de las bacterias a la superficie dentaria.

En la zona supragingival, las bacterias vinculadas con la salud periodontal llegan a acumular hasta aproximadamente 12 células de espesor en la superficie dental, y está compuesta principalmente por cocos y bacilos Gram-positivos (Fig. 1) (1).

La colonización de la superficie dental por las bacterias de la placa supragingival es bastante específica y depende de la interacción de la superficie bacteriana con las glucoproteínas presentes en saliva y en la película. Se comprobó que es *Streptococcus sanguis* y los bacilos Gram-positivos son los grupos principales de bacterias que inician la formación de la placa supragingival (Fig. 2).

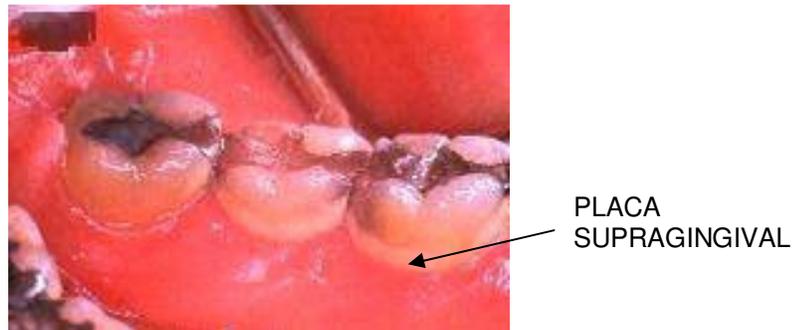


Figura 1. En esta fotografía se muestra la placa supragingival. Está compuesta principalmente de microorganismos Gram-positivos.

Una vez iniciado el crecimiento de la placa supragingival, se produce el crecimiento secundario y maduración. Durante esta fase hay un desplazamiento de la población bacteriana. La proporción de microorganismos filamentosos y bacterias Gram-negativas aumenta. En general, esta placa aparece más compacta. También son más evidentes las interacciones bacterianas adherentes.

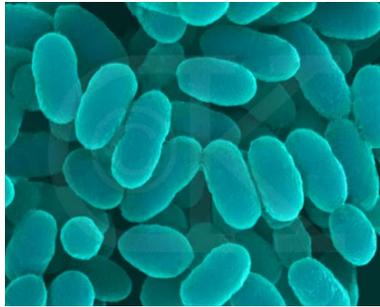


Figura 2. Microfotografía de *Streptococcus sanguis*. Identificado como bacteria que inicia la formación de placa supragingival.

Los microorganismos encontrados comúnmente en dichos sitios en adultos incluyen *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Rothia dentocariosa*, *Actinomyces viscosus*, *Actinomyces naeslundii* y a veces especies de *Neisseria* y *Veillonella*.

Placa Subgingival

Los mecanismos involucrados en la formación de la placa subgingival han sido parcialmente dilucidados. Una razón es la dificultad para obtener muestras con la placa subgingival conservada en su posición original entre los tejidos blandos de la encía y los tejidos del diente (Fig. 3).

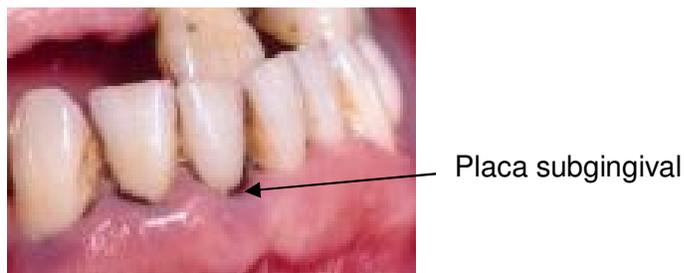


Figura 3. La placa subgingival está asociada a la presencia microorganismos densamente apretados y se observa de color café oscuro.

La estructura de la placa subgingival tiene cierta similitud con la variedad de microorganismos presentes en la placa supragingival, en particular cuando se

vincula a placa asociada a gingivitis sin formación de bolsas profundas. Se observa un cúmulo de microorganismos densamente apretados adyacentes al material cuticular que recubre la superficie dentaria. Los microorganismos comprenden cocos y bacilos Gram-positivos y negativos y organismos filamentosos. También se pueden encontrar espiroquetas y diversas bacterias flageladas, en especial en la extensión apical de la placa. La capa superficial suele estar menos densamente apretada y hay leucocitos interpuestos regularmente entre la placa y el recubrimiento epitelial del surco gingival.

Cuando la enfermedad periodontal genera una bolsa patológica, el aspecto del depósito microbiano subgingival se torna mucho más variado. En este caso, la superficie dentaria puede representar el esmalte o el cemento del cual se desprende el tejido conectivo periodontal. La acumulación de placa en la porción del diente antes cubierta por los tejidos periodontales no difiere marcadamente de la observada en la gingivitis. En esta capa, predominan los microorganismos filamentosos, pero también existen cocos y bacilos. Sin embargo, en el fondo de la bolsa, se reduce el número de los organismos filamentosos y en la porción más apical estos microorganismos están ausentes (Fig. 4).

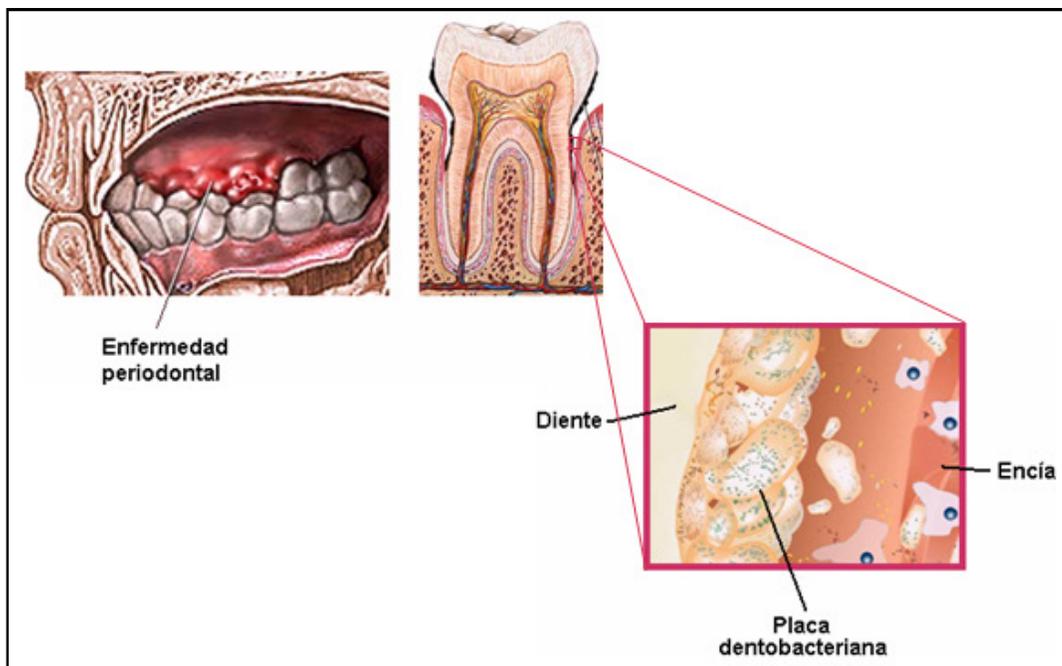


Figura 4. La enfermedad periodontal, como la gingivitis y la periodontitis, es causada principalmente por la placa dentobacteriana en donde se pueden encontrar principalmente distintos tipos de bacterias las cuales se adhieren por diferentes mecanismos y provocan una respuesta inflamatoria en las células de la encía.

Las capas superficiales de microorganismos de la bolsa periodontal que se encuentran próximos al tejido blando son claramente diferentes de la capa adherente a la superficie dentaria, y no se aprecia una matriz intermicrobiana definida. Los microorganismos comprenden una gran cantidad de espiroquetas y bacterias flageladas. También hay cocos y bacilos Gram-negativos. La multitud de espiroquetas y organismos flagelados son bacterias con motilidad, y como no existe una matriz intermicrobiana entre ellos, es probable que esa parte externa del cúmulo microbiano se adhiera muy laxamente con la pared del tejido blando de la bolsa como elemento responsable de su retención.

5.1.4. MICROORGANISMOS PERIODONTOPATÓGENOS

Mecanismos de colonización bacteriana

Las bacterias orales han evolucionado y han desarrollado una serie de estrategias de colonización muy específicas, incluyendo múltiples mecanismos de adherencia (7,8). Tanto *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* como *Porphyromonas gingivalis* pueden invadir las células epiteliales, mediante la estrategia de migración a la parte profunda de los tejidos en los sitios donde ocurre el daño a los tejidos del hospedero (12). Por otra parte la invasión de *Treponema denticola* se lleva a cabo por la introducción de una proteasa similar a la quimiotripsina en las células (13) (Tabla II).

<p>Tabla II. BACTERIAS DE LA PLACA DENTOBACTERIANA CON CAPACIDAD DE COAGREGACIÓN O INVASIÓN.</p>

Género	Coagregación positiva	Invasión
<i>Aggregatibacter</i>	Kolenbrander PE, Andersen RN, Moore LVH. 1989.	+
<i>Actinomyces</i>	Gibbons RJ, Nygaard M. 1970.	—
<i>Bacteroides</i> ^a	Yao ES, Lamont RJ, Leu SP, Weinberg A. 1996.	—
<i>Campylobacter</i>	Kolenbrander PE, London J. 1992.	—
<i>Capnocytophaga</i>	Kolenbrander PE, Celesk RA. 1983.	—
<i>Corynebacterium</i> (comúnmente llamado <i>Bacterionema</i>)	Mouton C, Reynolds HS, Gasiiecki EA, Genco RJ. 1979.	—
<i>Eikenella</i>	Ebisu S, Nakae H, Okada H. 1988.	—
<i>Eubacterium</i>	George KS, Falkler WA Jr . 1992.	—
<i>Fusobacterium</i>	Kolenbrander PE, Andersen RN, Moore LVH. 1989.	—
<i>Gemella</i>	Kolenbrander PE, Andersen RN, Moore LVH. 1989.	—
<i>Actinobacillus.</i>	Liljemark WF, Bloomquist CG, Fenner LJ. 1985.	—
<i>Lactobacillus</i>	Willcox MDP, Patrikakis M, Harty DWS, Loo CY, Knox KW. 1993.	—
<i>Neisseria</i>	Gibbons RJ, Nygaard M. 1970.	—
<i>Peptostreptococcus</i>	Kolenbrander PE, Andersen RN, Moore LVH. 1989.	—
<i>Porphyromonas</i> (formalmente llamados bacteroides)	Kolenbrander PE, Andersen RN, Moore LVH. 1989.	+
<i>Prevotella</i>	Kolenbrander PE, Andersen RN, Holdeman LV. 1985.	—
<i>Propionibacterium</i> (formalmente llamados bacteroides)	Ciardi JE, McCray GFA, Kolenbrander PE, Lau A. 1987.	—
<i>Rothia</i>	Kolenbrander PE, Andersen RN.	—

	1984.	
<i>Selenomonas</i>	Kolenbrander PE, Andersen RN, Moore LVH. 1989.	—
<i>Streptococcus</i>	Gibbons RJ, Nygaard M. 1970.	—
<i>Treponema</i>	Kolenbrander PE, Parrish KD, Andersen RN, Greenberg EP. 1995.	+
<i>Veillonella</i>	Gibbons RJ, Nygaard M. 1970.	—

Los microorganismos causales tanto de la caries como de la enfermedad periodontal pueden invadir otras partes del organismo, como en el caso de la endocarditis y diabetes, los patógenos orales contribuyen al desarrollo de la enfermedad coronaria y al infarto (14-18).

Modelos de Adherencia e Invasión de los organismos Periodontopatógenos

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 huésped 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.

El gene contiene fimA, que codifica para la subunidad principal de fibrilina y fim CDE que codifica para la subunidad accesoria, presenta un marco de lectura abierto (ORF) cuya función se desconoce. El producto de ORP1 no está asociado a la estructura de la fimbria (Fig. 5) (19).

Fimbrias: la bacteria presenta dos tipos de fimbrias: las mayores (20,21) y fimbrias menores (22). La fimbria mayor promueve la congregación de microorganismos tales como *Streptococcus gordonii* (23,24) 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.

Proteasa: 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 (25-28).

Vesículas: Este organismos produce vesículas que son liberadas de su superficie. Las cuales contienen la endotoxina denominada lipopolisacárido. Se ha demostrado que estas vesículas se adhieren a *Actinomyces viscosus* a matriz extracelular entre las que incluyen colágena, laminina, fibronectina y fibrinógeno (29,30).

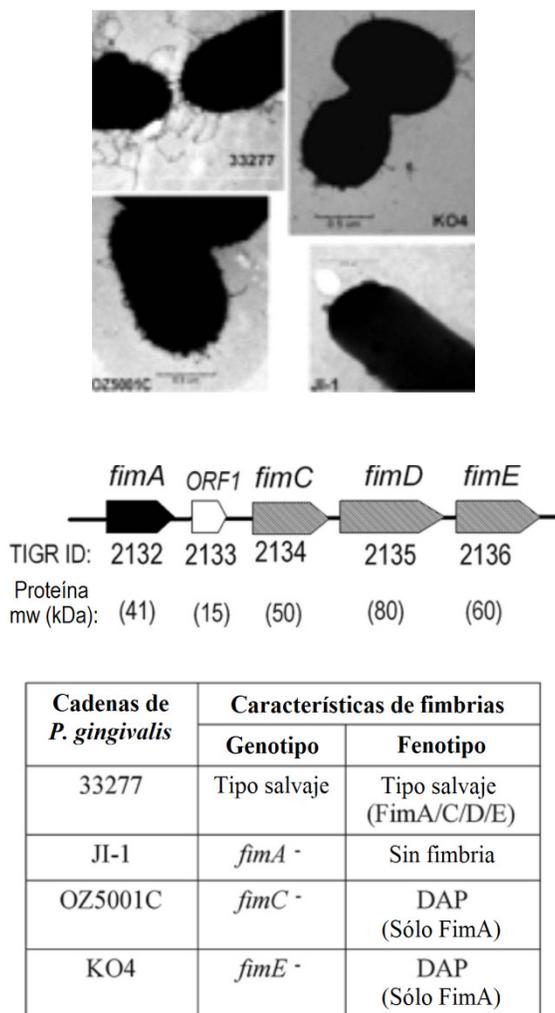


Figura 5. Arriba. Microscopía electrónica de la estructura de la superficie de *Porphyromonas gingivalis*. **Abajo.** Estructura del gen fimbrial de *Porphyromonas gingivalis* (64).

Entre los modelos de invasión de *Porphyromonas gingivalis* más estudiados, se encuentra el modelo de estudio con células epiteliales. Se ha

mostrado 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 así mismo 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 (31-34).

Algunos estudios muestran que agentes que previenen la formación de microtúbulos o microfilamentos disminuyen la invasión, lo que sugiere que los componentes del citoesqueleto están involucrados en el proceso de invasión. Otro evento que participa en la invasión es la movilización intracelular de calcio (35). Toda vez que la bacteria ha realizado el proceso de invasión prosigue con la invasión de las capas más profundas del epitelio.

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

Fimbrias: Las fimbrias son estructuras que están presentes cuando las bacterias se cultivan en condiciones de anaerobiosis y disminuyen conforme las bacterias son sembradas de forma consecutiva. Se ha sugerido que la pérdida de las fimbrias está asociada con la variante rugosa a lisa que afecta tanto la capacidad adhesiva como la capacidad invasiva de la bacteria (36-38). Las variantes rugosas se adhieren con más firmeza que las lisas. Sin embargo las lisas resultan más invasivas. Las fimbrias de estas bacterias juegan un papel importante en la adherencia a células epiteliales, hidroxapatita en saliva y a fibroblastos.

Vesículas: 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.

Material Amorfo Extracelular: Se localiza en la superficie de la bacteria y permite la adherencia de otras bacterias que presentan una adhesividad débil facilitando de esta forma la colonización de otras bacterias (39).

Mecanismos de Invasión

Porphyromonas gingivalis. La invasión de esta bacteria está en relación con la fimbria mayor como en el caso de su capacidad de adherencia. Sin embargo, no existe una relación aparente entre la adherencia y la invasión (40,41). La fimbria es capaz de inducir la fosforilación de una proteína de 68 kDa en un proceso mediado por una proteína cinasa en células de eucariontes (42).

La bacteria en células epiteliales se fija a las microvellocidades. Lo que sugiere que la bacteria se internaliza por un proceso de endocitosis mediado por receptor. La proteína de la bacteria, el DNA y la síntesis de RNA son necesarios para el proceso de invasión. Sin embargo no se conoce si el proceso de síntesis proteica sea necesaria. La entrada de la bacteria requiere tanto del metabolismo energético de la bacteria como del hospedero. El proceso de invasión disminuye cuando se utilizan agentes que previenen la formación de microtúbulos y microfilamentos lo que sugiere que estos componentes del citoesqueleto juegan un importante papel en la entrada. De igual manera inhibidores de proteasas inhiben la invasión lo que posiblemente proteasas presentes en la bacteria estarían involucradas en la entrada. Un requisito en la entrada de la bacteria consiste en la movilización de calcio de depósitos intracelulares al citosol (4). Una vez que la bacteria ha entrado en las células se puede localizar en las capas epiteliales más profundas (43-47).

Aggregatibacter actinomycetemcomitans. La invasión de células epiteliales por esta bacteria es un proceso dinámico en el que intervienen diversos pasos en los que está involucrado un proceso dependiente de actina, rápida multiplicación intracelular y su diseminación en las células (48-50). En otros estudios se ha

demostrado que el ingreso de la bacteria en ocasiones es independiente de actina y dependiente de microtúbulos (51).

La invasión de la cepa SUNY465 de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* se produce por la interacción con microvelocidades y formación de cráteres en la superficie del hospedero (50, 52). Este proceso es mediado por el mecanismo dependiente de actina (50, 53). La adherencia de la bacteria no ocasiona rearrreglos de actina de la periferia a los puntos focales de la bacteria (38). No se ha caracterizado al receptor responsable del proceso pero algunas evidencias sugieren que se trata del receptor a transferrina o a citocina (50). De manera muy veloz se forma una vacuola derivada de la membrana que rodea a la bacteria y que posteriormente desaparece. Posiblemente por la activación de la fosfolipasa C (54).

Por otra parte inhibidores de microtúbulos como colchicina o taxol incrementan la concentración intracelular de la bacteria y previene su salida (52, 54, 55). La salida de la bacteria y la invasión de otras células es mediada por estructuras que se proyectan en la superficie celular (54). Ocurren dos tipos de proyecciones un tipo es intracelular y conecta a diferentes células y el otro tipo está asociado únicamente por la célula donde se originó la invasión. Estas estructuras se forman porque la bacteria empuja la membrana de la célula.

Por otra parte, 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 promociona el ingreso de las bacterias en el torrente sanguíneo (56).

5.1.5. ENDOTOXINAS BACETRIANAS

Ácido lipoteicoico.

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

Se han identificado tres eventos ocasionados por bacterias Gram-positivas y que conducen a la liberación de citocinas por parte de diferentes células del hospedero como monocitos, macrófagos y células dendríticas. El primero se produce por presencia de componentes provenientes de las bacterias Gram-positivas, seguida de la interacción con receptores presentes en las células inmunes y finalmente por la activación de mecanismos de transducción que conducen a la expresión de moléculas proinflamatorias. El LTA es un componente único de la pared celular de las bacterias Gram-positivas, es un polímero de glicerol-fosfato que contiene azúcar y dos grupos acilo, estos últimos le confieren la propiedad de anclarse en la membrana celular.

En la tabla II se muestran las diferencias en los lípidos de anclaje entre las diferentes especies. Una forma no acetilada del LTA es el ácido teicoico, que está unido covalentemente al peptidoglucano de la pared celular de las bacterias Gram-positivas. Desde 1993, el LTA se extrae con fenol seguido de una cromatografía de interacción hidrofóbica (57). La purificación del LTA permitió determinar cómo se activan las células inmunes y estudiar el papel que tiene esta molécula en la síntesis de citocinas. En estudios *in vitro* se demostró que los monocitos expresan interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) y el factor de

necrosis tumoral (TNF- α) en respuesta al tratamiento con LTA. El LTA aislado de *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* y de cepas de *Enterococci*, promueven la liberación de las citocinas mencionadas en líneas anteriores tanto en macrófagos y como en monocitos (58).

En contraste el LTA aislado de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae* no inducen liberación de citocinas (2). En el mismo estudio se muestra también que la inducción de citocinas ocurre tanto en presencia como en ausencia de suero, lo que sugiere que la estimulación no es dependiente de factores del complemento. Por otra parte cuando el LTA es desacilado pierde la capacidad de estimular a monocitos, lo que demuestra que el componente lipídico es el que confiere al LTA la actividad biológica. Estudios *in vitro* realizados en macrófagos muestran que el LTA de diferentes especies induce la secreción de TNF- α y la inducción de la enzima óxido nítrico sintasa y producción de óxido nítrico. Estos estudios sugieren que la capacidad del LTA para estimular respuestas inmunes depende de la especie. Sin embargo, el LTA obtenido de *S. aureus* no induce la secreción de TNF- α y nitratos.

Las preparaciones de LTA que se obtienen únicamente por extracción fenólica estimulan a las células solo cuando se utiliza a altas dosis de LTA. Por ejemplo el LTA de *S.aureus* induce la liberación de IL-12 en una línea celular de monocitos (1 a 10 $\mu\text{g/ml}$) (3), así como la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible en cardiomiocitos y en la línea celular de macrófagos J774 (4), la expresión de TNF- α , IL-6 e interleucina-10 (IL10) en monocitos y células T (5) y de la ciclooxigenasa-2 en células epiteliales pulmonares. El LTA activa también la vía del complemento clásica y alterna. En estudios *in vivo*, el LTA extraído con fenol actúa en sinergia con el peptidoglucano para causar falla de órganos en ratas (59) y protege contra el daño por isquemia y la reperfusión del corazón y los riñones. Recientemente se demostró que la aplicación nasal de LTA provoca la infiltración de neutrófilos en los pulmones, lo que sugiere que el LTA comparte muchas propiedades con los lipopolisacáridos (LPS).

Otros estudios muestran que preparaciones comerciales de LTA aislado de *S.aureus*, *B.subtilis* y *S. sanguis* contienen concentraciones significativas de LPS y de otros componentes distintos al LTA con capacidad de inducir respuestas inflamatorias (59,63). Por ejemplo, se ha demostrado que la capacidad del LTA para estimular la producción de óxido nítrico en macrófagos de rata RAW 264.7 es fuertemente atenuada por el tratamiento con polimixina (es un péptido catiónico cíclico que se asocia con alta afinidad al LPS y reduce su toxicidad) lo que sugiere que la muestra que utilizaron para este estudio presentaba contaminación por LPS. Cuando las preparaciones de LTA de *S.aureus*, *Bacillus subtilis* y *S. sanguis* fueron sometidas a cromatografía de interacción hidrofóbica se obtuvieron dos fracciones una enriquecida en LTA y otra en LPS. Al tratar los macrófagos con la fracción enriquecida en LTA, las células no sintetizaron óxido nítrico. Las preparaciones enriquecidas en LTA obtenidas de *Bacillus subtilis* y *S. pyogenes* inducen la liberación de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 en macrófagos y linfocitos. El LTA de *S. aureus* no tuvo ningún efecto, algunos investigadores sugieren que durante la extracción del LTA se produce una descomposición en su estructura y por este motivo no presenta actividad biológica. La utilización de otros métodos como la extracción con butanol permite la obtención de LTA de *S.aureus* con actividad biológica. En estudios *in vivo* este LTA no tiene efecto sobre la adhesión y emigración. El receptor TLR2 reconoce una gran variedad de componentes microbianos. Entre los que se encuentran las lipoproteínas y lipopéptidos de varios patógenos, peptidoglucano y ácido lipoteicoico de bacterias Gram-positivas, lipoarabinomano de micobacteria y glucolípidos de *Treponema maltophilum* (60).

Los receptores TLR2 reconocen un amplio rango de productos bacterianos debido a la cooperación con diversas proteínas. Se ha demostrado que forma heterodímeros con otros TLRs como TLR1 y TLR6 los cuales estructuralmente están relacionados con TLR2. De igual forma colabora con distintos tipos de receptores como dectina-1, receptor de la familia de las lectinas para β -glucano

componente de la pared celular de hongos. Otras observaciones muestran también que los dominios citoplasmáticos de diferentes TLR no son funcionalmente equivalentes, lo que sugiere que la capacidad de tipos celulares específicos para responder a bacterias Gram-positivas no está definida solamente por la expresión de TLR2. La expresión diferencial y heterodimerización entre los receptores TLR incrementa el repertorio de respuestas celulares que pueden activarse por diversos estímulos infecciosos, y es posible que esta sea la base para las respuestas celulares específicas.

Entre las vías de transducción activadas en respuesta al tratamiento con LTA se encuentran la de las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK) y la fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3K). En la sepsis en humanos la activación de MAPK está implicada en la granulocitosis y permite de esta forma restaurar la función inmune en sepsis.

La inhibición de MAPK en granulocitos aislados de pacientes con sepsis severa causa la restauración de la apoptosis inducida por lipopolisacáridos. Por otra parte la MAPK p38 regula la supresión inmune en el bazo y la inhibición de p38 puede restaurar la función de linfocitos. La activación de MAPK está implicada en la tolerancia a endotoxinas y la activación de macrófagos alveolares después de trauma por hemorragia (60).

5.2. ENDOCARDITIS

El **endocardio** consiste en el revestimiento interno de las aurículas y ventrículos; es análogo a la capa íntima de los vasos sanguíneos y es más grueso en las aurículas.

Presenta tres capas:

1. Capa interna o endotelial medusa positiva
2. Capa media o subendotelial
3. Capa externa o subendocárdica

5.2.1. ETIOLOGÍA

La **endocarditis** es una enfermedad que se produce como resultado de la inflamación del endocardio. Es decir, un proceso inflamatorio localizado en el revestimiento interno de las cámaras y válvulas cardíacas. La endocarditis puede afectar el músculo cardíaco, las válvulas o el revestimiento del corazón. La gran mayoría de los enfermos que padecen una endocarditis sufren también algún otro tipo de enfermedad cardíaca subyacente.

Un paso clave en el desarrollo de la endocarditis infecciosa consiste en la adherencia bacteriana en válvulas dañadas (Fig. 6). *Streptococcus parasanguis* y *Streptococcus sanguis* se asocian y contribuyen al desarrollo de lesiones en las válvulas cardíacas (61). Las especies de estreptococos producen glucanos que se adhieren a coágulos de fibrina derivados de las plaquetas y promueven también la agregación plaquetaria (62).

5.2.2. FACTORES DE RIESGO

Entre los factores de riesgo que más comúnmente se asocian al desarrollo de la endocarditis están el consumo de drogas por vía intravenosa, colocación de vías de acceso permanente a las venas, cirugía dental reciente, debilitamiento valvular y cirugía anterior de las mismas. Los hongos también son considerados como un agente causal de la endocarditis. En otras ocasiones resulta imposible identificar el organismo responsable del desarrollo de la endocarditis (63).

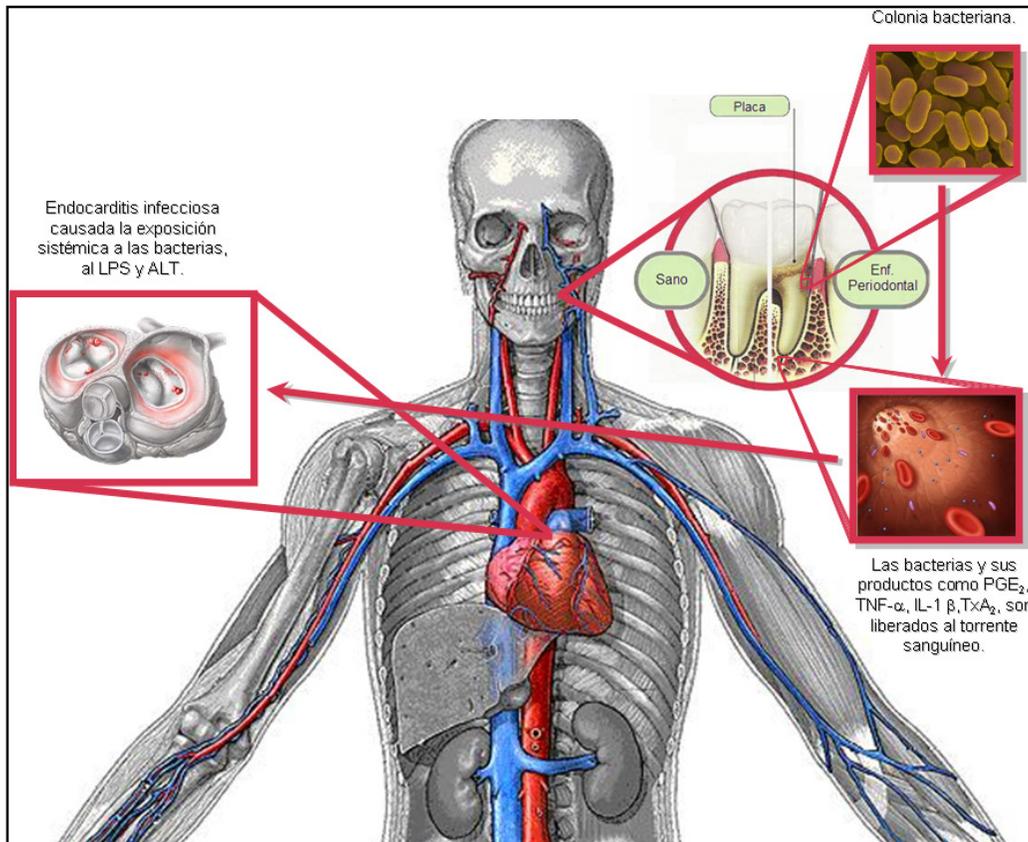


Figura 6. Desarrollo de la endocarditis bacteriana. Las bacterias bucales poseen unos mecanismos de adherencia muy específicos y como resultado colonizan y provocan enfermedades principalmente en la cavidad bucal. Cuando se realizan procedimientos bucales en los cuales exista hemorragia estas bacterias y sus productos, como PGE_2 , $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, TxA_2 , etc., pueden ser liberados al torrente sanguíneo y provocar enfermedades sistémicas. También se sabe que estas bacterias son agentes causales de la endocarditis infecciosa y/o aterosclerosis y enfermedades coronarias.

5.2.3. PATOGENIA

En modelos experimentales de conejos inoculados con *Streptococcus sanguis* muestran que unas proteínas denominadas proteínas asociadas a la agregación plaquetaria que se expresan en la pared celular bacteriana inducen la agregación plaquetaria. Lo que conduce a cambios en la frecuencia cardíaca, en presión sanguínea, contractibilidad cardíaca e isquemia. Posiblemente las proteínas

asociadas a la agregación plaquetaria ocasionen la trombosis plaquetaria así como infarto al miocardio (64).

La proteína FimA está asociada con la colonización de *Streptococcus parasanguis* y participa en la colonización de tejido cardíaco dañado y en endocarditis en ratas (65).

5.2.4. DIAGNÓSTICO

Entre los síntomas asociados a la endocarditis se encuentran: debilidad, fatiga, escalofríos, fiebre, pérdida de peso, soplo cardíaco, sudoración nocturna, que en ocasiones puede ser severa, dificultad para respirar cuando se realiza alguna actividad, dolores musculares, palidez, dolores articulares, sangre en la orina, orina de color anormal, inflamación de pies, piernas o abdomen, sudoración excesiva, lesiones de Janeway (manchas cutáneas rojas e indoloras, localizadas en las palmas de las manos y en las plantas de los pies), ganglios rojos y dolorosos en las yemas de los dedos de la manos y de los pies (llamados nódulos de Osler), anomalías en las uñas. En las endocarditis, estos síntomas pueden generarse de un modo lento (subagudo) o, en cambio, de modo repentino (agudo).

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 una hipertrofia del bazo (esplenomegalia). El médico puede detectar un nuevo soplo cardíaco o un cambio en un soplo cardíaco previo. 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 (pequeños puntos de hemorragia) que se pueden detectar en la conjuntiva. Las puntas de los dedos de las manos se pueden agrandar y las uñas pueden encorvarse (dedos hipocráticos) (Fig. 7).

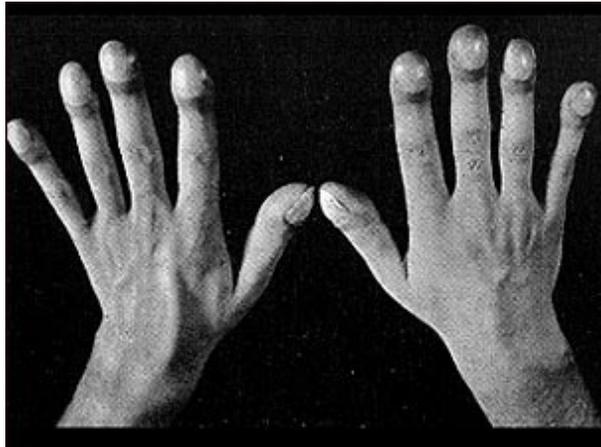


Figura 7. Dedos hipocráticos.

Exámenes para el diagnóstico:

1. Hemocultivo repetitivo y pruebas de sensibilidad (la mejor prueba para la detección)
2. Serología para ciertas bacterias que pueden ser difíciles de detectar por medio de hemocultivo
3. Electrocardiograma (ECG)
4. ESR (tasa de sedimentación eritrocítica)
5. CSC puede mostrar un conteo alto de glóbulos blancos y/o una anemia microcítica de bajo grado
6. Radiografía del tórax
7. Ecocardiograma
8. Ecocardiograma transesofágico

5.2.5. TRATAMIENTO

Con cierta regularidad, se hace necesario hospitalizar al paciente con el fin de llevar a cabo un tratamiento administrando antibióticos por vía intravenosa. Es necesaria la antibioterapia por un tiempo prolongado para erradicar la bacteria de

las cámaras y válvulas cardíacas. Frecuentemente, este proceso terapéutico se prolonga durante 6 semanas. Además, el antibiótico seleccionado debe ser específico para el organismo involucrado en esta dolencia, lo cual se determina a través de un hemocultivo y de las importantes pruebas de sensibilidad. En el caso de que se desarrolle una insuficiencia cardíaca como resultado de la afección valvular del músculo cardíaco o si el fenómeno infeccioso se está separando en fragmentos pequeños, dando lugar a 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.

5.2.6. COMPLICACIONES

Algunas de las complicaciones que se presentan debido a la endocarditis se mencionan a continuación:

1. Coágulos sanguíneos o coágulos infectados a partir de endocarditis que se desplazan al cerebro, riñones, pulmones o abdomen, ocasionando daños de diferente gravedad e infección a estos órganos.
2. Insuficiencia cardíaca congestiva si el tratamiento se retrasa
3. Arritmias
4. Daño grave de válvulas cardíacas
5. Accidente cerebro-vascular
6. Glomerulonefritis
7. Absceso cerebral
8. Ictericia

5.2.7. PREVENCIÓN

Los antibióticos con función profiláctica se suelen administrar a aquellas personas que presentan predisposición a las afecciones cardíacas, previamente a procedimientos dentales ó cirugías que pongan en compromiso las vías respiratorias, urinarias o intestinales. Se recomiendan revisiones médicas periódicas continuas para los pacientes que de alguna manera tengan antecedentes de endocarditis.

5.3. EFECTOS DE LOS MICROORGANISMOS PERIODONTOPATÓGENOS EN CARDIOMIOCITOS

5.3.1. RECEPTORES TOLL

Los receptores tipo Toll son una familia de proteínas membranales que sirven como receptores de reconocimiento de patrones para una variedad de moléculas derivadas de microbios y estimulan las respuestas de la inmunidad innata a los microbios expresando estas moléculas. La primera proteína en ser identificada en esta familia fue la proteína de *Drosophila* Toll, la cual está involucrada en establecer el eje dorso ventral durante la embriogénesis de la mosca así como también mediando respuestas antimicrobianas. Hasta ahora se han descubierto 10 diferentes TLRs en los mamíferos en la base de la homología de secuencia a los Toll de la *Drosophila*, y son nombrados TLR del 1 al 10, pero puede ser que existan más miembros de la familia. Todos estos receptores contienen repeticiones ricas en leucina flanqueados por motivos característicos ricos en cisteína en sus regiones extracelulares y un dominio homólogo al receptor Toll/IL-1 (TIR, por sus siglas en inglés) en su región citoplasmática, la cual es esencial para la señalización (Fig. 8).

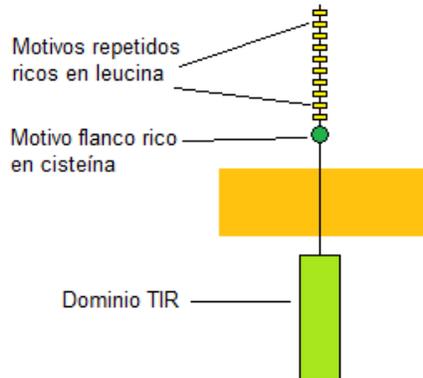


Figura 8. Composición de los receptores tipo Toll.

Los dominios TIR también se encuentran en las colas citoplasmáticas de los receptores de IL-1 e IL-18, y vías de señalización similares esta relacionadas con los TLRs, IL-1 e IL-18. Los TLRs se expresan en diferentes tipos celulares que son componentes importantes del sistema inmune innato, incluyendo macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, células de la mucosa epitelial, y células endoteliales (66).

Los TLRs de los mamíferos están involucrados en la respuesta a tipos muy divergentes de moléculas que son comúnmente expresados en células microbianas pero no mamíferas (Tabla 3). La respuesta inmune innata para una especie de microbios puede reflejar una integración de las respuestas de varios TLRs a diferentes moléculas producidas por los microbios. Algunos de los productos microbianos que estimulan a los TLRs, incluyen el lipopolisacárido (LPS) de las bacterias gram-negativas, peptidoglicano de las bacterias gram-positivas, lipoproteínas bacterianas, ácido lipoteicoico, lipoarabinomanano, zimosano, la proteína flagelar bacteriana flagelina, la proteína 60 de shock de calor, la proteína de fusión de virus respiratorio sincitial, motivos CpG no metilados, y doble cadenas de ARN. En muchos casos, un solo TLR es responsable de estimular la respuesta inflamatoria a un ligando microbiano en particular, como la respuesta mediada por el TLR9 a CpG. Sin embargo, el repertorio de especificidad del sistema TLR es aparentemente extendido por la habilidad de los TLRs para heterodimerizar con uno al otro. Por ejemplo, los

dímeros del TLR2 y TLR6 se requieren para la respuesta ha peptidoglicanos. En algunos casos, uno de los TLRs de un heterodímero puede conferir especificidad de unión al ligando, y el otro TLR se puede requerir para señalización (66).

La especificidad de los TLR también esta influenciada por varias moléculas de adaptación que no son TLR. Esto esta completamente entendido para TLR4 y su ligando LPS. El LPS primero se une a la proteína soluble de unión al LPS (LBP, por sus siglas en inglés) en la sangre o fluido extracelular, y este complejo sirve para facilitar la unión del LPS a CD14, el cual existe tanto como una proteína plasmática soluble y una proteína de unión membranal glicofosfatidilinositol en la mayoría de las células excepto en el endotelio. Una vez que el LPS se une al CD14, el LBP se disocia, y el complejo LPS-CD14 se asocia físicamente con el TLR4. Una proteína accesoria extracelular adicional llamada MD2 también se une al complejo con CD14. El LPS, CD14, y MD2 se requieren para la señalización inducida por el LPS, pero no esta completamente claro si es necesario de una interacción física directa del LPS con el TLR4. Las diferentes combinaciones de las moléculas accesorias en el complejo TLR pueden servir para ensanchar el rango de productos microbianos que pueden inducir la respuesta inmune innata. Por ejemplo, tanto CD14 como MD2 están asociados con complejos de otros TLRs (e.g., TLR2), y TLR4 puede formar complejos con otras moléculas accesorias, como MD1 y RP105, en ciertos tipos de células, como los linfocitos B (66).

Tabla 3. RECEPTORES TIPO TOLL Y SUS LIGANDOS		
TLR	Ligando	Procedencia
TLR2	Lipoproteínas	Bacteria
	Peptidoglucano	Bacteria Gram-positiva
	Zimozano	Fungi
	LTA	Bacteria Gram-positiva
	GPI	Tripanosomas
	Lipoarabinomanano	Micobacteria
	Fosfatidilinositoldimanosdo	Micobacteria

TLR3	? Doble cadena de ARN	Virus
TLR4	LPS HSP60	Bacteria Gran-negativa Clamidia
TLR5	Flagelina	Varias bacterias
TLR9	CpG	Bacteria, protozoarios

La vía de señalización predominante usada por los TLRs resulta en la activación de NF- κ B. En esta vía, el ligando que se une al TLR de la superficie de la célula lleva al reclutamiento de varias moléculas citoplasmáticas de señalización a través de interacciones específicas dominio-dominio. La primera proteína en ser reclutada es la proteína citoplásmica de adaptación MyD88, la cual contiene un dominio TIR que probablemente se une al dominio TIR del TLR. MyD88 también contiene un dominio muerte, homólogo al encontrado en las moléculas de señalización de la familia de los receptores a TNF. Una segunda proteína en reclutarse dentro del complejo de señalización es llamada cinasa asociada al receptor de IL-1 (IRAK, por sus siglas en inglés). IRAK contiene un dominio muerte que media la interacción con el dominio muerte de MyD88 y un dominio cinasa proteína serina/treonina. En el reclutamiento, IRAK sufre de autofosforilación, se disocia de MyD88, y activa al factor-6 asociado a TNF-R (TRAF-6, por sus siglas en inglés). Luego TRAF-6 activa la cascada de la cinasa I κ B, lo cual lleva a la activación de NF- κ B. Esta misma vía está involucrada en la inducción de IL-1 e IL-18 por la activación de NF- κ B. En algunos tipos de células, ciertos TLRs también

comprometen otras vías de señalización, como la cascada de las proteínas cinasa activadas por mitógeno (MAPKs, por sus siglas en inglés), llevando a la activación del factor de transcripción AP-1 (66).

Los genes que se expresan en respuesta a la señalización de proteínas codificadas por TLR son importantes en diferentes componentes de las respuestas de la inmunidad innata. Esto incluye citocinas inflamatorias (TNF- α , IL-1, e IL-12), moléculas de adhesión endoteliales (E-Selectina), y las proteínas involucradas en mecanismos para matar microbios (iNOS). Los genes particulares expresados dependerán de la respuesta de tipo de célula (66).

5.3.2. SISTEMA DE TRANSDUCCIÓN DE TLR

Las respuestas desencadenadas por las señales de transducción incluyen la regulación de la expresión génica, la regulación de las vías metabólicas y la locomoción celular.

Los componentes que contribuyen al proceso de señalización intracelular y que estimulan el crecimiento, muerte y división celular tienen importancia médica cuando se intenta aislar los factores casuales de cánceres y muerte celular.

Existe un grupo de cinasas que han sido implicadas en las vías de señalización intracelular y que tienen efectos en la muerte y longevidad celulares. Las proteínas cinasas más destacables relacionadas con este tema, son algunas MAP Kinasas: ERK 1/2, p38 y JNK (las MAP Kinasas son “proteínas cinasas activadas por mitógeno”, un mitógeno es un inductor de proliferación y diferenciación celular) y otras proteínas como AKT, GSK3 y PI3-K (67).

Cascadas de señalización

Después del reconocimiento entre TLR2 y el LTA se produce un amplio espectro de señales intracelulares como la activación de la familia de MAPK, proteína cinasa B (PKB) y de la cinasa I κ B (IKK). El incremento en la actividad de estas cinasas consecuentemente activa a diversos factores de transcripción como NF- κ B (p50 y p65), Jun/Fos, factor de transcripción (ATF), factor de respuesta a suero (SRF), proteína semejante a Ets (ELK), proteína de unión y aumento de CCAAT (C/EBP) y la proteína de fijación del elemento de respuesta a AMP cíclico (CREB). El primer evento que inicia la cascada de transducción consiste en la co-localización y agrupamiento de receptores y señales de transducción en la membrana plasmática (68).

En respuesta al tratamiento con *Streptococcus* B, los receptores TLR2, TLR6 y CD14 se agrupan y la primera molécula intracelular reclutada por el complejo es el factor de diferenciación mieloide (MyD88) el cual recluta y activa a la cinasa asociada a receptor de interleucina-1 (IRAK). IRAK forma multímeros que se autofosforilan y reclutan grandes complejos consistentes en el factor activado por el receptor TNF (TNF/TRAF6), cinasa activadora del factor de crecimiento transformante β -1 (TAK1) proteína de asociación a TAK1 (TAB1) y TAB2.

IRAK 4 fosforila a IRAK1, esta fosforilación es indispensable para la activación de la transducción de señales, recientemente se ha descrito que la forma IRAK-M actúa como inhibidor. Así mismo, la activación de TAK1 promueve su liberación del complejo y de esta forma activa a IKK β y a MAP cinasa (67KK6). La cinasa inductora de NF- κ B (NIK) se requiere para la activación de la cinasa de I κ B (IK κ B) que promueve la fosforilación, ubiquitinación y degradación en el proteosoma 26S de I κ B y la translocación de NF- κ B al núcleo. La proteína cinasa MAP- β (MKK β) es responsable de la activación de las MAPK p38 y la cinasa terminal N-JUN (JNK) (69).

En presencia de la proteína adaptadora denominada intermediario conservando evolutivo de la vía de Toll (ECSIT) y MEK cinasa (1/MKK1), TRAF6 puede activar a ERK 1/2. Sin embargo, ERK 1/2 también puede activarse por un mecanismo independiente de TRAF6, que involucra a la forma atípica de PKC la PKC ζ que esta asociada a la acumulación de ácido fosfatídico lo que conlleva a la activación de ERK 1/2. Finalmente, se ha demostrado también la activación de fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3K) de una manera dependiente de PKB lo que conduce a la activación de NF- κ B (70).

5.4. LOS FLAVONOIDES Y LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

La inflamación es un proceso biológico orquestado, inducido por una infección microbiana y lesión de tejido. El principal objetivo de la inflamación es el reconocimiento de microbios por receptores específicos del sistema inmune innato, que juega un papel crucial en la inducción de señales tempranas de iniciación y estableciendo la colocación inflamatoria (71). Una función principal de la inflamación es resolver la inflamación y reparar el daño en orden de alcanzar el equilibrio homeostático. Así, la respuesta inflamatoria ideal es rápida y destructiva, aunque específica y auto-limitante (72). La importancia de este balance es demostrado por descubrimientos en ciertas infecciones crónicas y desórdenes inflamatorios, que la respuesta inflamatoria causa más daño al huésped que al microorganismo (73).

La inflamación y el sistema inmune se encuentran íntimamente relacionados. De hecho, una sobre-activación de la respuesta inmune innata puede causar infección crónica o inflamación crónica debido a una regulación o resolución ineficiente de la respuesta inflamatoria (74).

También los medicamentos anti-inflamatorios esteroideos y los AINEs son actualmente usados para tratar la inflamación aguda, estos medicamentos no han podido ser completamente exitosos en la curación de desordenes crónicos inflamatorios mientras que tales compuestos son acompañados por efectos secundarios inesperados. Por lo tanto, hay una necesidad urgente para encontrar compuestos anti-inflamatorios seguros (75). La medicina tradicional ha usado extractos de diferentes plantas para el tratamiento de una gran variedad de desordenes incluyendo inflamación aguda y crónica. Entre los constituyentes activos de estos extractos, los flavonoides son una familia de sustancias que sus miembros tiene varias propiedades biológicas interesantes incluyendo actividad anticancerígena, antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatoria, inmunomoduladora y

antitrombótica (76-78).

Entre estas actividades biológicas, la capacidad anti-inflamatoria de los flavonoides ha sido utilizada durante mucho tiempo en la medicina china aplicando extractos crudos de plantas. Varias investigaciones han demostrado que una variedad de moléculas de los flavonoides presentan actividad anti-inflamatoria tanto *in vitro* e *in vivo* (79, 80).

Además, la inflamación se ha encontrado cada vez más que esta involucrada en el desarrollo de varias enfermedades crónicas como la aterosclerosis, obesidad, diabetes, enfermedades de neurodegeneración e incluso cáncer. Además de esto, las enfermedades cardiovasculares y el cáncer son principales causas de mortalidad en varios países. Numerosos estudios epidemiológicos indican que un aumento en el consumo de frutas ricas en flavonoides y vegetales esta asociado con una disminución en la incidencia de enfermedades cardiovasculares y de diferentes tipos de cáncer (81-86). Este efecto protector se ha atribuido en parte a propiedades anti-inflamatorias de los flavonoides (87). Así, puede ser de valor estudiar la actividad anti-inflamatoria de los flavonoides, no sólo con el propósito de establecer mecanismos anti-inflamatorios, sino también para desarrollar una nueva clase de agentes anti-inflamatorios más seguros, que pueden ser útiles en el tratamiento de este tipo de enfermedades (88).

5.4.1. LOS FLAVONOIDES Y LA INFLAMACIÓN

Los flavonoides son una subclase polifenólica que están ampliamente distribuidos en el reino de las plantas, y son caracterizados por dos o más anillos aromáticos, cada uno porta por lo menos un hidroxilo aromático y se conecta con un anillo heterocíclico (89). Los flavonoides esta catalogados en diferentes subtipos basados en la conexión de un anillo aromático al anillo heterocíclico así

como el estado oxidativo y los grupos funcionales del anillo heterocíclico. Los flavonoides se encuentran en frutas, vegetales, legumbres, hierbas, flores, así como en té y en el vino tinto. Son componentes prominentes de las frutas cítricas y de otras fuentes de alimentos y son en varios países regularmente consumidos en una dieta saludable. La tabla 4 muestra las subclases de flavonoides y los flavonoides más prominentes en alimentos y los alimentos más típicos que los contienen (73, 89).

Tabla 4. SUBCLASES Y LOS FLAVONOIDES MÁS PROMINENTES EN ALIMENTOS Y LOS ALIMENTOS MÁS TÍPICOS QUE LOS CONTIENEN		
SUBCLASE DE FLAVONOIDES	FLAVONOIDE DEL ALIMENTO	ALIMENTO QUE LO CONTIENE
Flavanoles	Catequina, galocatequina, epicatequina	Tés, uvas rojas y vinos tintos
Flavanones	Naringenina, hesperetina, erodictiol	Alimentos cítricos
Flavones	Apigenina, luteolina	Espicias de hojas verdes
Isoflavones	Daidzeína, genisteína, gliciteína, biocanina A	Alimentos de soya y legumbres
Flavonoles	Kampferol, miricetina, quercetina, isoramnetina	Casi ubicuo en alimentos
Antocianidinas	Cianidina, delfinidina, pelargonidina	Cerezas, bayas y arándanos

Varias investigaciones han probado en repetidas veces que diferentes moléculas de flavonoides exhiben funciones anti-inflamatorias. Así, las actividades anti-inflamatorias de los flavanoles (quercetina, rutina y morina) y flavanones (hesperetina y hesperidina) fueron investigadas en inflamación aguda y crónica en modelos animales (79). La rutina solo fue efectiva en los procesos crónicos, principalmente en la artritis adyuvante. En la inflamación neurogénica inducida por xileno sólo los flavanones fueron efectivos. Además de esto, estos compuestos fueron los más efectivos en el proceso inflamatorio subcrónico (79). Paradker et al.

(90) demostraron que una dieta que contenga isoflavones con daidzina, glicitina, genisteína y sus glucósidos, pueden modular la reacción inflamatoria en el intestino e hígado de ratones tras la inyección de LPS. Estos hallazgos *in vivo* fueron consistentes con el efecto anti-inflamatorio de la genisteína encontrado en estudios con células usando células de intestino humano CACO-2 (73).

Entre una gran variedad de flavonoides naturales, uno de los más estudiados en diferentes modelos de inflamación ha sido la genisteína (un isoflavonoide). El efecto de este compuesto ha sido evaluado en un modelo de asma del conejillo de las indas (91). En este modelo de enfermedad de vías respiratorias, la genisteína atenúa marcadamente la broncoconstricción inducida por la ovoalbúmina, la eosinofilia pulmonar y en la falta de hiperrespuesta en las vías aéreas. Este efecto anti-inflamatorio puede estar mediado por la inhibición de la cascada de señalización de la tirosin cinasa (91). La genisteína inyectada intraperitonealmente demostró que protege a las ratas de una falla de órganos inducida por endotoxina (92), y un tratamiento posterior con genisteína reduce el nivel de inflamación y la destrucción del colágeno de articulaciones en artritis inducida en ratones. Este efecto terapéutico fue mediado por la modulación de los granulocitos, monocitos y linfocitos (93). Otros flavonoides han demostrado que son efectivos en prevenir la artritis adyuvante en la rata. La administración diaria intraperitonealmente de rutina, quercetina y hesperidina, inhiben tanto las fases aguda como crónica en estos modelos de inflamación, siendo la rutina el compuesto más activo en la fase crónica (94).

La actividad anti-inflamatoria de los flavonoides ha sido también investigada en modelos *in vitro*, donde un número de estudios se han conducido a hacer alusión a los mecanismos de acción (73).

5.4.2. MECANISMOS ANTI-INFLAMATORIOS DE LOS FLAVONOIDES

Varios mecanismos que explican la actividad anti-inflamatoria de los flavonoides se ha descrito, incluyendo (a) actividad antioxidante, (b) la regulación de actividades celulares de células relacionadas con la inflamación, (c) modulación de las actividades de metabolismo de enzimas del ácido araquidónico (fosfolipasa A2, ciclooxigenasa, lipoxigenasa) y el óxido nítrico sintaza, (d) modulación de la producción de otras moléculas proinflamatorias, y (e) modulación de la expresión de genes proinflamatorios (73).

5.4.3. LOS FLAVONOIDES, LA INFLAMACIÓN Y LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

La inflamación excesiva esta considerada ser un factor crítico en muchas enfermedades humanas, incluyendo cáncer, enfermedades cardiovasculares, obesidad, diabetes tipo II, o enfermedad de inflamación del intestino (95). Las propiedades anti-inflamatorias reportadas de productos naturales como los flavonoides pueden ser un factor crucial en el uso de estas sustancias para el tratamiento de dichas enfermedades (73).

La enfermedad cardiovascular es actualmente la principal causa de muerte y enfermedad en muchos países. Los procesos inflamatorios son comúnmente características en varias condiciones cardiovasculares, como la aterosclerosis, síndrome agudo coronario, daño miocárdico por reperfusión isquémica y estenosis arterial (87).

La aterosclerosis es una enfermedad progresiva caracterizada por la acumulación de lípidos y elementos fibrosos a los largo de las arterias, contribuye de manera importante para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (96). Avances recientes en la ciencia básica han establecido un papel importante de la inflamación como mediador en los estados de comienzo de la progresión de una enfermedad, y posiblemente, la complicación trombótica de la aterosclerosis (97).

Uno de los eventos más tempranos en la pared arterial en el comienzo de la aterosclerosis es la adhesión de células mononucleares al endotelio, que es provocado por un número de moléculas de adhesión como la P-selectina, la E-selectina (98), la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1) y la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1) (99). Estas moléculas son expresadas por células endoteliales y/o células de músculo liso sobre el estímulo proatrogénico como la oxidación de LDL ó radicales libres de oxidación (100, 101). Después de la unión de los monocitos y los linfocitos T a la superficie de la pared arterial, migran dentro del espacio subendotelial, donde se diferencian y son transformados en macrófagos y células esponjosas. La migración transendotelial de los leucocitos durante el proceso inflamatorio es provocado por proteínas quimiotácticas como la proteína monocito quimioatrayente 1 (MCP-1) (102), así como por citocinas proinflamatorias secretadas por los macrófagos y células T, como TNF- α , IL-1 e IL-6 (103, 104) y factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento básico de fibroblasto (bFGF), el factor de crecimiento tipo insulina (IGF) y el factor transformador de crecimiento β (TGF- β) (105). Estas moléculas contribuyen a la aterogénesis manteniendo la inflamación de la lesión y promoviendo la proliferación y migración de células de músculo liso residentes y la construcción de una densa matriz extracelular alrededor de ellas. El lípido de macrófago, los linfocitos T, las células de músculo liso y la matriz extracelular entran a un ciclo de migración, proliferación celular y la sobreproducción de tejido fibroso, llevando a lesiones intermedias y la restructuración del ateroma. Las tres clases de células activadas liberan mediadores proinflamatorios que inducen la expresión de moléculas de adhesión, y gradualmente, se forma la placa del ateroma (106). La figura 9 muestra el papel de la inflamación en el comienzo y progresión de la aterosclerosis (73).

La inflamación también esta involucrada en la ruptura de plaquetas, que ocurre usualmente en áreas de inflamación sostenida, y acumulación de macrófagos. La activación de células T puede estimular la producción de una

matriz de metaloproteinasas por macrófagos en la lesión. Estas enzimas proteolíticas degradan el colágeno de la capa protectora de fibrina, dejando a la placa susceptible a la ruptura (107). Varias citocinas pueden también estar involucradas en la regulación de la secreción de TNF- α , IL-1 y MG-CSF, contribuyendo a la inestabilidad de la placa (108).

Además, estudios clínicos han demostrado marcadores sistémicos de la inflamación para que sean fuertes predictores de eventos clínicos, y tratamientos específicos de la aterosclerosis y su factor de riesgo a sido asociado con reducción en los marcadores inflamatorios (109). Este enlace entre la inflamación y la aterosclerosis proveen un nuevo blanco para agentes farmacológicos futuros que puedan disminuir la progresión de la aterosclerosis inhibiendo la inflamación (110). En este contexto, una dieta de flavonoides, como factores anti-inflamatorios naturales, pueden producir efectos cardiovasculares benéficos en la población humana.

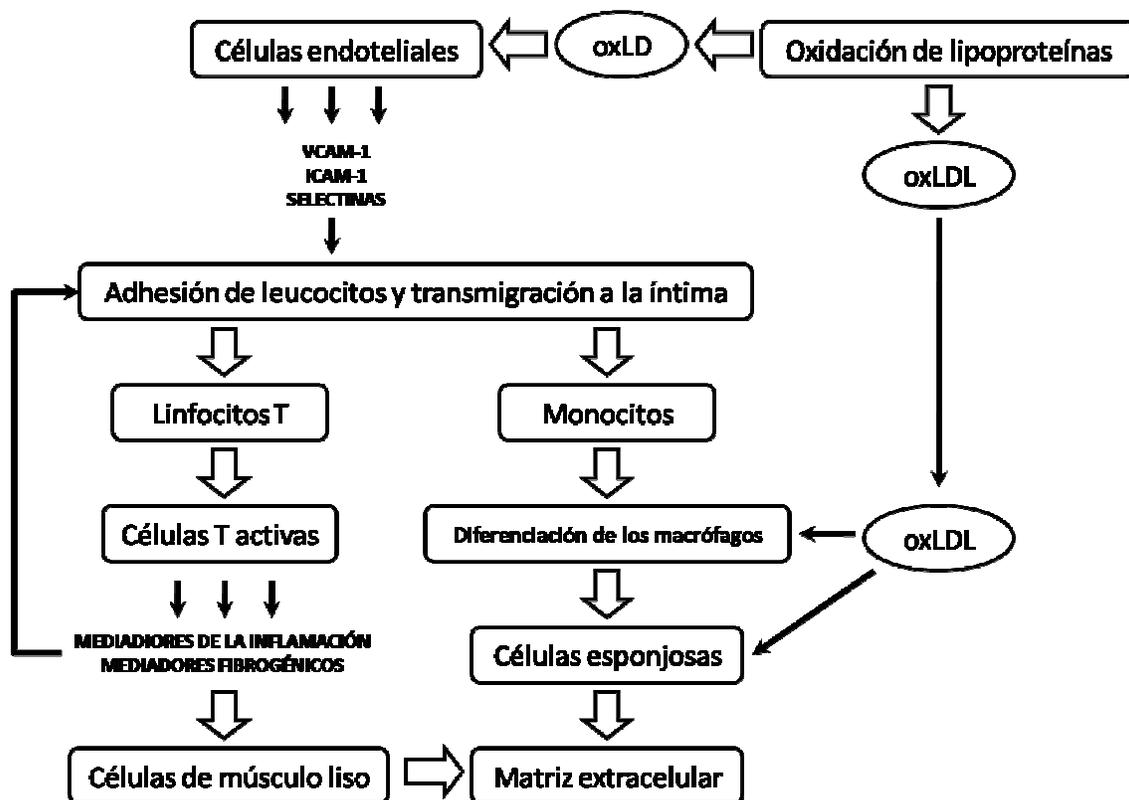


Figura 9. La inflamación en el comienzo y progresión de la aterosclerosis.

Varios estudios han reportado asociaciones inversas entre el consumo de flavonoides y la incidencia de enfermedades cardiovasculares o mortalidad (111-114), mientras que otros estudios no (115,116). Recientemente, un estudio prospectivo de mujeres postmenopáusicas mostró que la dieta con consumo de flavanones, antocianidinas, y ciertos alimentos ricos en flavonoides están asociados con un riesgo reducido de muerte debido a enfermedades coronarias y cardiovasculares (117). En un trabajo reciente, Hooper et al. realizó una revisión sistemática de la falta de efectividad de diferentes subclases de flavonoides y fuentes alimenticias ricas en flavonoides en ECV y factores de riesgo. Concluyeron que también algunos alimentos ricos en flavonoides pueden tener algunos efectos de relevancia clínica en factores de riesgo de ECV, hay datos limitados de ensayos de intervención para otra subclase de flavonoides consumidos como parte de una dieta normal (118). Además de beneficios aparentes del consumo de flavonoides en la prevención primaria, un estudio sugiere que el consumo de flavonoides en forma de té puede tener beneficio entre los individuos con una enfermedad cardiovascular establecida (119).

Existen varios mecanismos por los cuales los flavonoides pueden ser protectores contra las enfermedades cardiovasculares, incluyendo efectos antioxidante, antiplaquetario, anti-inflamatorio así como el aumento de HDL, y mejorando la función endotelial. Un aspecto central de la patogénesis de la aterosclerosis es la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL), los flavonoides tienen efectos antioxidantes y, además, algunos estudios han mostrado que los flavonoides disminuyen la peroxidación lipídica de membranas biológicas (120). Por otra parte, algunos mecanismos implicados en el efecto anti-inflamatorio de los flavonoides pueden contribuir a la protección cardiovascular, como la regulación de la producción de mediadores inflamatorios. En un modelo animal, Droke et al. (121) demostraron que la administración del isoflavonoide de soya reduce el riesgo de la enfermedad cardiovascular asociada con la

inflamación crónica, por mediadores inflamatorios por debajo de la regulación como TNF- α en un nivel endotelial. Además, estudios *in vivo* han revelado que una dieta de flavonoides como la apigenina, crisina, kampferol, o quercetina, atenúa la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales aórticas de humano (122). Los isoflavones también pueden proteger contra la enfermedad inflamatoria vascular por la inhibición de la adhesión de células monocito al endotelio (123). Los flavonoides también pueden contribuir a la estabilización de la placa ateromatsa, la quercetina ha mostrado estar inversamente asociada con la mortalidad por enfermedad coronaria por la inhibición de la expresión de la metaloproteinasa 1 (MMP1), y el debilitamiento de las placas ateroscleróticas (124).

6. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el efecto del ácido lipoteicoico sobre la activación de ERK 1/2, JNK, p38, AKT y la inducción de COX-2 e IL-1 y determinar si los flavonoides regulan esta activación.

6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar la fosforilación de ERK 1/2, JNK, p38, AKT inducida por ácido lipoteicoico.
- Identificar la inducción de COX-2 e IL-1 por ácido lipoteicoico.
- Determinar si los flavonoides, quercetina, luteolina, genisteina y quercetagina regulan esta activación.

7. HIPÓTESIS

7.1. Hipótesis Verdadera

Si el LTA se asocia al receptor TLR-2 en el H9c2 entonces se desencadenarán cascadas de señalización intracelulares asociadas a la producción de mediadores inflamatorios.

7.2. Hipótesis Falsa

Si el LTA se une a su respectivo receptor y no es capaz de activar la vía de transducción.

8. TIPO DE ESTUDIO Y TAMAÑO DE MUESTRA

Tipo de estudio: experimental, comparativo y prospectivo.

Tamaño de la Muestra: 1×10^6 células, cardiomiocitos de ratón neonatal (línea celular H9c2)

Análisis de Datos y Métodos estadísticos.

Los experimentos se realizaron por 2 ocasiones por separado. Los resultados de PCR y de Western blot 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. Se muestra en la figura 3 los resultados de un experimento representativo y el análisis gráfico. Se representa como la media \pm Error Standard.

9. MATERIAL Y MÉTODOS

Población en estudio: Línea celular derivada de cardiomiocitos de ratón H9c2 (ATTCC CRT-1446)

Selección de Variables:

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

Tamaño de la Muestra: 1×10^6 células

Método de recolección de datos: Tabulación y Matriz.

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

Criterios de Exclusión: cultivo confluyente, medio ácido.

Criterios de Eliminación: medio de cultivo turbio.

Método de Procesamiento de los datos: Programas de Cómputo Digilt Doc, Labs Work y Excel.

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 (Hoeffler).
- Campana de flujo laminar (Nuair).
- Centrifuga (Sorvall).
- Espectrofotómetro (Perkin Elmer).
- Gendarme (Costar).
- Gradillas (Nalgene).
- Incubadora (Nuair).
- Megatiscopio.
- Microscopio de objetos invertidos C22 (Olympus).
- Orbit Shaker (Labline).
- Pipetas de 10ml y 5 ml (Finnpipette).
- 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).

Reactivos:

- Acrilamida (Sigma)
- Antibiótico-Antimicótico 1% penicilina G sódica, estreptomina, anfotericina B (GIBCO BRL).
- Anticuerpos primarios: p-ERK, ERK, p-p38, p38, p-JNK, JNK, COX-2, γ -tubulina y AKT.
- Glicina (Baker)

- Kit de quimioluminiscencia (Santa cruz Biotechnology)
- Marcador de peso molecular (Bio-rad)
- Medio de cultivo Eagle modificado por Dubblecco (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

MÉTODOS

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

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

obtuvieron de Sigma Chemical Co. La muestra se sonicó (1s x 30) en un baño con hielo. Para el ensayo de Western se utilizaron 50 µg de proteína que se mezcló 1:1 con buffer de muestra 2x (20% glicerol, 4% SDS, 10% 2-mercaptoetanol, 0.05% azul de bromofenol y 1.25 M Tris-HCl pH 6.8; (todos los reactivos se obtuvieron de Sigma Chemical Co.), la muestra se cargó en un gel al 10% SDS-PAGE y se corrió a 40V por 2 h. Las proteínas celulares se transfirieron a una membrana de PVDF (Amersham) 1 hr. a 0.3 amperes-y 5 V. Para verificar que se colocó igual concentración de proteína, las membranas se tiñeron con Rojo de Ponceau (Sigma Chemicals Co.). Posteriormente la membrana se bloqueó con 150 mM NaCl, 100 mM Tris- HCl pH 7.8 (TBST) y 5% de suero albúmina de bovino por 1 hr., se lavó y se incubó con el anticuerpo primario se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti ratón-monoclonal Ing. fofo-ERK (tirosina-204) (1:5000) ó anti-conejo policlonal ERK 1/2 (1:1000); ó anti-ratón monoclonal pp38 (Tyr182) (1: 5000) ó anti-p38 (1:1000) ó anti- mouse monoclonal fosfo-AKT (Ser 403) (1:1000) ó anti-cabra policlonal COX-2 (1:1000) ó anti-cabra policlonal p65 (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology) . Las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C y posteriormente se lavaron durante 3 ocasiones con TBST y se incubaron durante 2 hr con el anticuerpo secundario, HPR-conjugado anti-ratón IgG (1:1000) ó anti- conejo IgG (1:1000) ó anti-cabra IgG (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology). Las bandas inmunoreactivas se revelaron utilizando el sustrato de quimio-luminiscencia (Santa Cruz Biotechnology) y la autoradiografía se obtuvo después de exponer la película durante 2 min. Los experimentos se realizaron en 5 ocasiones por separado. Las muestras se analizaron con el sistema digital Lab-Works.

Immunocitoquímica: Las células se crecieron en cubreobjetos. Posteriormente se trataron con el LTA o flavonoide a los tiempos y dosis indicados en los pies de figura y se fijaron por 30 minutos con 2% de formaldehído en PBS a 4°C y se lavaron durante 3 ocasiones con PBS. Posteriormente se permeabilizaron durante 5 minutos con Triton 0.1% en PBS y se lavaron durante 3 ocasiones con PBS. Para la visualización de fosfo-ERK ½, fosfo-p38, fosfoAKT, COX-2, y NF-κB las

células se trataron durante 1 hr con anticuerpo anti-ratón fosfo-ERK 1/2 (Tyr 204); anti-ratón pp38 (Tyr 182); anti-ratón p-AKT (Ser 403), anti-cabra p65; anti-cabra COX-2 diluidos 1:100 en PBS, posteriormente se lavaron en cinco ocasiones con PBS. Las células se incubaron durante 45 minutos con anti-ratón IgG acoplado a rodamina ó anti-conejo IgG acoplado a fluoresceína ó anti-cabra acoplado a rodamina (Santa Cruz Biotechnology) se utilizaron en dilución 1:100 en PBS. Las muestras se montaron en resina y se observaron por microscopia confocal. Los experimentos se repitieron en tres ocasiones por separado.

Ensayo RT-PCR. El RNA total se aisló de los cardiomiocitos usando el método de Chomczynski y Sacchi. El RNA total (1µg) fue transcrito en forma inversa (RT) usando el equipo One Step RT-PCR (In vitrogen). La reacción de la polimerasa en cadena (PCR) se realizó utilizando los oligonucléotidos 5´CATGCAAGGAAGGGAAGTCTTC3´ (sentido codificante) y 5´ACAGGGAAGTCTGAAGCACTAG3´ (Sentido anticodificante) derivado de COX-2 (27) y 5´-TCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3´ (Sentido codificante) y 5´-AGATCCACAACGGATACATT-3´ (Sentido anticodificante) derivado del gene de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GADPH). Las condiciones de la amplificación fueron las siguientes: desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento a 55°C por 1 min y extensión a 72°C por 1.5 min. El PCR se efectuó por 35 ciclos y como resultado del RT-PCR se obtuvo una banda sencilla de 1033 pares de bases para COX-2, una banda sencilla de 287 pares de bases para IL-1 y una banda sencilla de 309 pares de bases para GADPH. La identidad del fragmento se caracterizó por su tamaño aparente en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Se realizaron tres experimentos por separado de cada tratamiento.

Cuantificación de Proteínas.

Se cuantificaron las 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 hr 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. RESULTADOS

Efecto del LTA sobre la fosforilación de las MAPKs en cardiomiocitos.

La activación de las MAPKs ocurre después del tratamiento con el LTA. Las MAPKs constituyen una familia conformada por ERK 1/2 (que se activa en respuesta mitogénica), p38 (cinasa que se activa por estrés como por acción de luz ultravioleta, choque térmico o citocinas pro-inflamatorias) y JNK. La exposición con LTA en los cultivos de cardiomiocitos promueve un incremento en el patrón de fosforilación de las MAPKs de manera dependiente del tiempo. El máximo efecto del LTA sobre la activación de las MAPKs se observa después de los 15 minutos de tratamiento. El análisis densitométrico mostró que p-ERK se activó cinco veces sobre el basal; p-JNK mostró un aumento de 4.7 sobre el basal; p-p38 de 4.4 veces sobre el basal (Figura 1-A). En otra serie de resultados encontramos que LTA promueve un aumento en la actividad de las MAPK de manera dependiente de la dosis (Figura 1-B) encontramos que la máxima actividad se produce a la concentración de LTA de 15 µg/ml.

Efecto del LTA sobre la activación de Akt.

Akt (proteína cinasa B), es fosforilada y activada por PDK-1. Esta cinasa, es un importante efector del mecanismo de transducción de PI3K. La activación de Akt resulta en la fosforilación de un gran número de sustratos que son importantes en la señalización intracelular. La activación de Akt está relacionada con el sostén de la viabilidad celular durante la liberación de mediadores inflamatorios. Por este motivo decidimos estudiar los efectos de LTA sobre la activación de Akt en cardiomiocitos. Encontramos que esta cinasa se activa con el tratamiento con LTA (15 µg/ml). La máxima activación se produjo después de los 30 minutos de tratamiento (Fig. 1-A) produciéndose una activación de 6 veces sobre la actividad

basal. En otra serie de resultados encontramos que Akt se activó de manera dependiente de la dosis (Fig. 1-B)

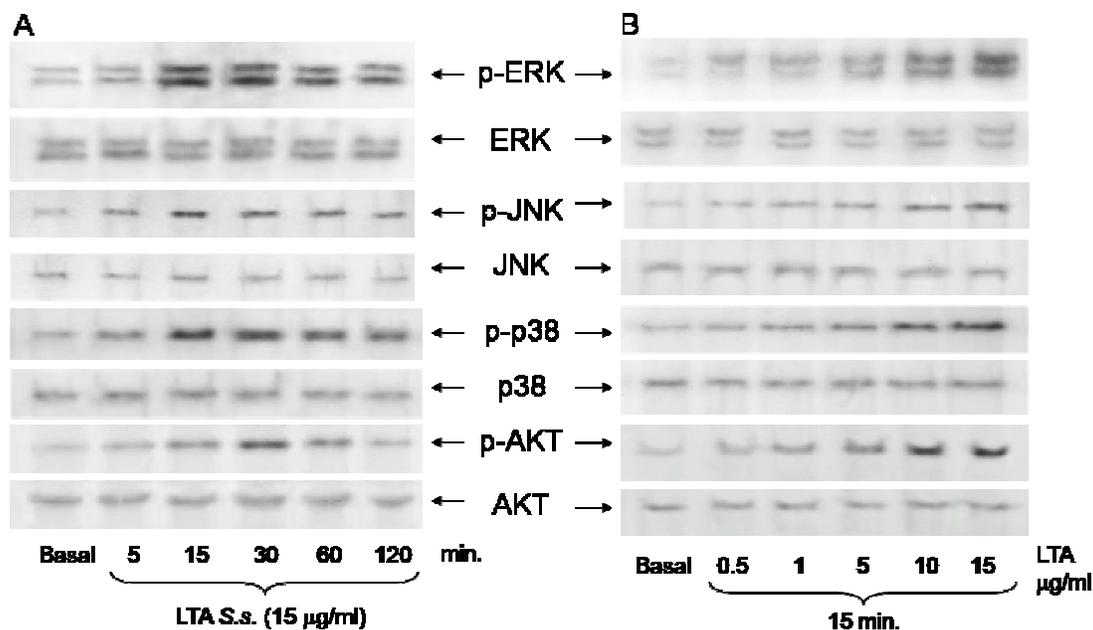


Figura 1. Curso temporal y dosis respuesta del efecto del ácido lipoteicoico obtenido de *Streptococcus sanguis* en cardiomiocitos.

A) Las células H9c2 (1×10^6) se sembraron en cajas de 6 pozos. Cuando alcanzaron la subconfluencia se ayunaron en DMEM + 2% SBF por 16 horas al término se trataron por diferentes periodos con LTA (15 µg/ml). B) Las células H9c2 se sembraron en cajas de 6 pozos. Cuando alcanzaron la subconfluencia se ayunaron por 16 hrs. en DMEM + 2% SBF se trataron con diferentes dosis de LTA por 15 minutos para la detección de las MAPKs y por 30 minutos para AKT. Al término la reacción se detuvo en buffer de fosfatos salino frío y se utilizaron 50 µg de proteína que se separaron en un gel de poliacrilamida (10%) con dodecilsulfato de sodio y se transfirieron a una membrana de PVDF. La actividad de las cinasas se evaluó utilizando anticuerpos que detectan la forma fosforilada. Anticuerpos contra la cinasa no fosforilada se utilizaron como control. Se utilizó la técnica de quimioluminiscencia. Las imágenes se obtuvieron por el sistema Digi-Doct y se analizaron por el sistema Labs Work.

Efecto de LTA sobre la fosforilación de I κ B y la translocación de NF- κ B.

La activación de NF- κ B se produce cuando el factor inhibidor de NF- κ B (I κ B) es fosforilado y de esta forma libera a NF- κ B que es un factor clave en la liberación de mediadores de moléculas promotoras de respuestas inflamatorias como TNF α , IL-6 y óxido nítrico. Este factor de transcripción se activa cuando se transloca del citoplasma al núcleo de las células por este motivo nos propusimos estudiar el efecto del LTA sobre la fosforilación de I κ B y la translocación de NF- κ B en cardiomiocitos. En los extractos totales encontramos que el LTA (15 μ g/ml) promueve un aumento en la fosforilación de I κ B de manera dependiente del tiempo (Fig. 2-A) y de la dosis (Fig. 2-B). La máxima fosforilación se detecta después de cinco minutos de tratamiento. Nuestros resultados sugieren que el LTA participa en la activación de NF- κ B (Fig. 2-A, B), debido a que promueve la fosforilación de I κ B.

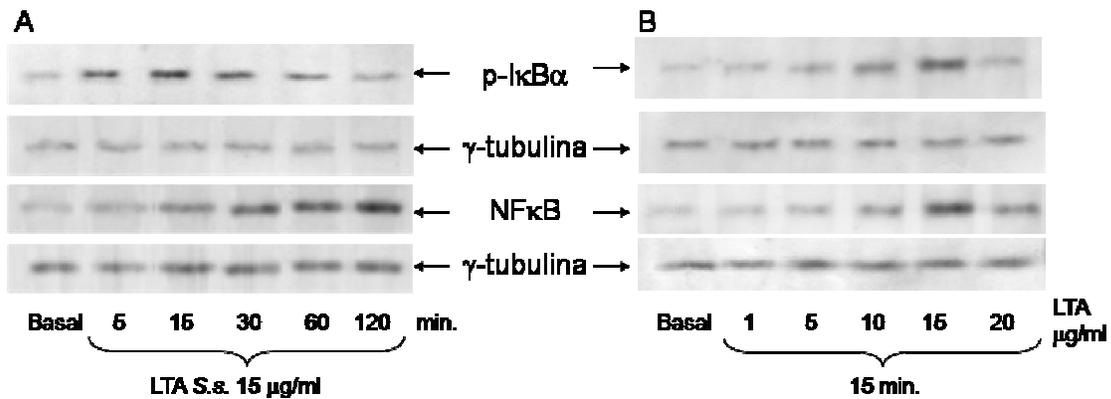


Figura 2. Curso temporal y dosis respuesta del efecto del ácido lipoteicoico obtenido de *Streptococcus sanguis* en cardiomiocitos.

A) Las células H9c2 (1×10^6) se sembraron en cajas de 6 pozos. Cuando alcanzaron la subconfluencia se ayunaron en DMEM + 2% SBF por 16 horas al término se trataron por diferentes periodos con LTA (15 $\mu\text{g/ml}$). B) Las células H9c2 se sembraron en cajas de 6 pozos. Cuando alcanzaron la subconfluencia se ayunaron por 16 hrs. en DMEM + 2% SBF se trataron con diferentes dosis de LTA por 15 minutos para la detección de I κ B y para el ensayo de Nf κ B se obtuvieron los extractos nucleares como se describe en la sección de materiales y métodos. Para el ensayo de western blot se utilizaron 50 μg de proteína que se separaron en un gel de poliacrilamida (10%) con dodecilsulfato de sodio y se transfirieron a membrana de PVDF. La actividad de las cinasas se evaluó utilizando anticuerpos que detectan la forma fosforilada. Anticuerpos contra tubulina se utilizaron como control, las muestra se revelaron por la técnica de quimioluminiscencia. Las imágenes se obtuvieron por el sistema Digi-Doct y se analizaron por el sistema Labs Work.

Efecto del LTA sobre la expresión de ciclooxigenasa-2

Las prostaglandinas juegan un importante papel en la regulación de diversas funciones tanto en condiciones fisiológicas y como patológicas. Se ha demostrado que PGE2 es un potente estimulador de la resorción ósea y está asociado con la pérdida de la adherencia. Por este motivo decidimos estudiar los efectos del LTA sobre la inducción de COX-2 en cardiomiocitos. Nuestros resultados mostraron que el tratamiento con LTA induce la expresión de COX-2 de una manera dependiente del tiempo (Fig. 3-A). La inducción de COX-2 fue detectable a partir de las 3 horas de tratamiento con el LTA (15 µg/ml) (Fig 3-B) y la máxima expresión se produjo después de las 6 hrs. de incubación. Finalmente con el propósito de determinar el mecanismo de transducción involucrado en la expresión de COX2, las células se preincubaron durante 30 minutos con PD98059 (20 µM) inhibidor específico de MEK, SB203580 (5 µM), inhibidor de p38, SP60009 (10 µM), inhibidor de JNK y con calfoestina C (1 µM) inhibidor de la proteína cinasa C. Encontramos que PD98059, SP60009 y calfoestina C inhiben aproximadamente en un 80% la expresión de COX2, lo que nos sugiere que la vía de ERK 1/2, JNK y proteína cinasa C están involucradas en la expresión de COX-2 (Fig. 3-C).

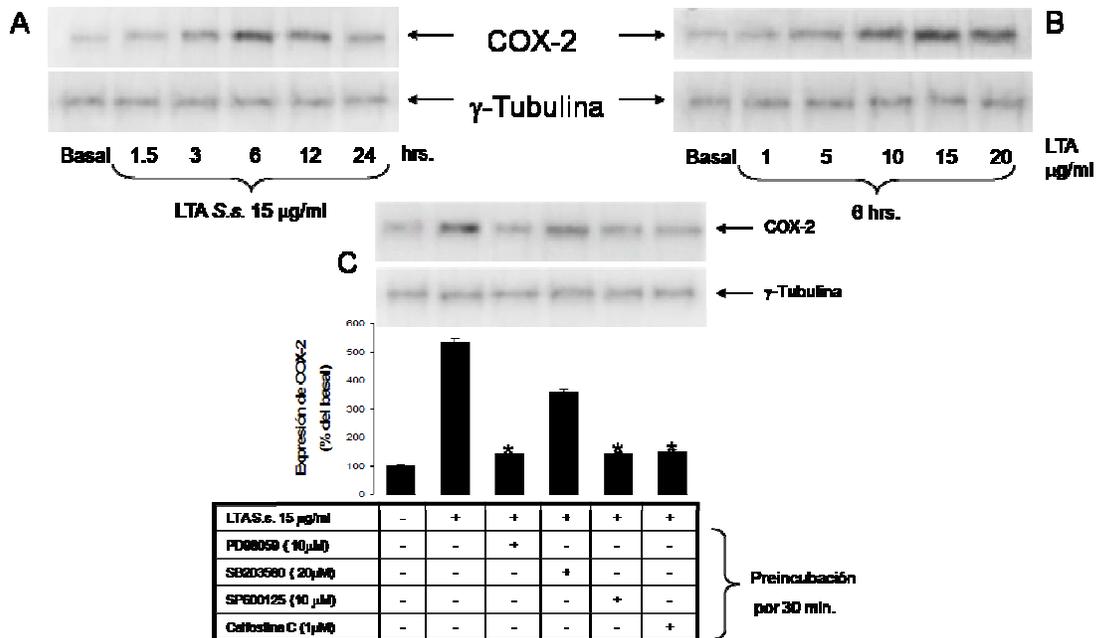


Figura 3. Curso temporal, dosis respuesta y efecto de los inhibidores del efecto del ácido lipoteicoico obtenido de *Streptococcus sanguis* sobre la expresión de COX-2 en cardiomiocitos.

A) Las células H9c2 (1×10^6) se sembraron en cajas de 6 pozos. Cuando alcanzaron la subconfluencia se ayunaron en DMEM + 2% SBF por 16 horas al término se trataron por diferentes periodos con LTA (15 µg/ml). B) Las células H9c2 se sembraron en cajas de 6 pozos. Cuando alcanzaron la subconfluencia se ayunaron por 16 hrs. en DMEM + 2% SBF se trataron con diferentes dosis de LTA por 6 horas. C) Las células se preincubaron durante 30 minutos con los inhibidores posteriormente se trataron con LTA por 6 hr. Al término la reacción se detuvo en buffer de fosfatos salino frío y se utilizaron 50 µg de proteína que se separaron en un gel de poliacrilamida (10%) con dodecilsulfato de sodio y se transfirieron a membrana de PVDF. La actividad de las cinasas se evaluó utilizando anticuerpos que detectan la forma fosforilada. Anticuerpos contra la cinasa no fosforilada se utilizaron como control. Se utilizó la técnica de quimioluminiscencia. Las imágenes se obtuvieron por el sistema Digi-Doct y se analizaron por el sistema Labs Work. * $p < 0.05$.

Efecto del LTA sobre la transcripción de COX-2.

Una molécula que se libera en respuesta a los procesos inflamatorios es la ciclooxigenasa-2, ésta enzima que se expresa de forma constitutiva, utiliza como sustrato el ácido araquidónico para la síntesis de prostaglandinas. Por este motivo nos decidimos a evaluar el efecto del ácido lipoteicoico sobre la expresión de COX-2. Con el propósito de evaluar la transcripción del gene se realizaron ensayos RT-PCR. Nuestros resultados mostraron que el tratamiento con ácido lipoteicoico promovió un incremento en la expresión del COX-2 de manera dependiente del tiempo y dosis (Fig. 4-A, B). La expresión se observó desde los treinta minutos y la máxima expresión a las 4 horas de tratamiento. Por otra parte, el tratamiento con ácido lipoteicoico a una dosis de 15 µg/ml produjo la máxima expresión de COX-2. En otra serie de experimentos, tratamos con diferentes inhibidores y encontramos que el tratamiento con PD 98059 (10 µM), SP600125 (10 µM) y calfofina C inhibidores de ERK 1/ 2, JNK y PKC respectivamente, bloquearon la expresión de COX2 (Fig. 4-C). Lo que nos sugiere que las cinasas involucradas en la expresión de COX2 son ERK 1/2, JNK y PKC.

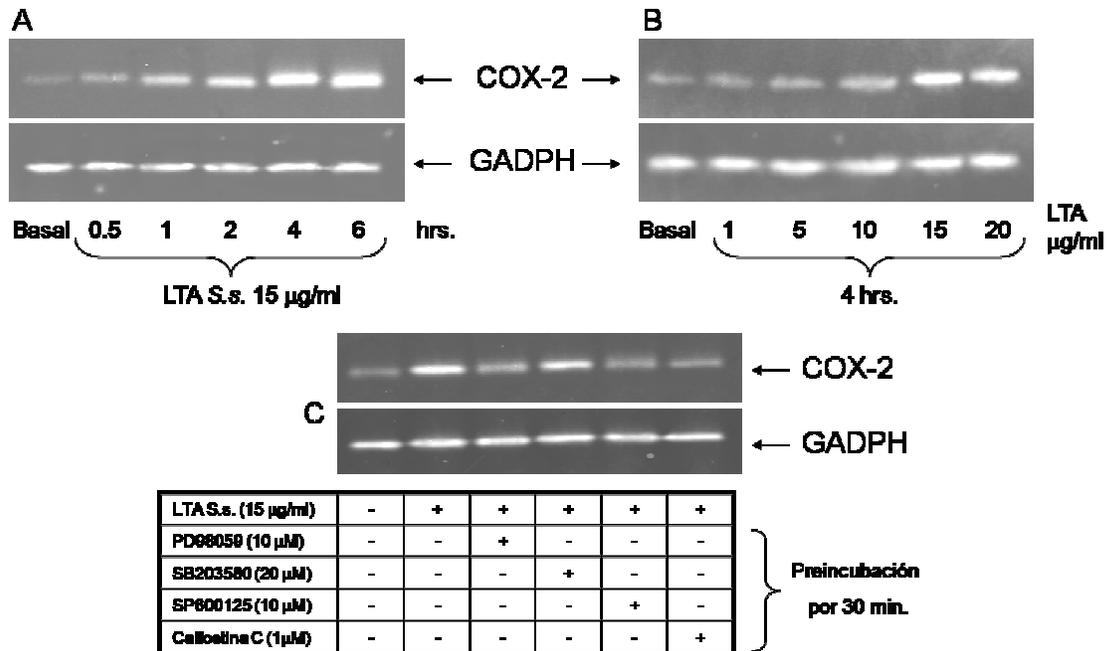
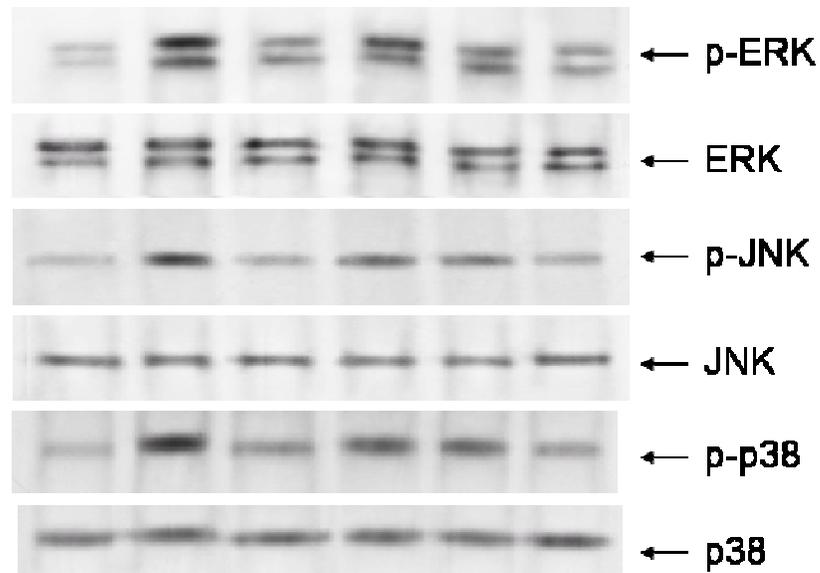


Figura 4. Curso temporal, dosis respuesta y efecto de los inhibidores del efecto del ácido lipoteicoico obtenido de *Streptococcus sanguis* sobre la transcripción de COX-2 en cardiomiocitos.

A) Las células H9c2 (1×10^6) se sembraron en cajas de 6 pozos. Cuando alcanzaron la subconfluencia se ayunaron en DMEM + 2% SBF por 16 horas al término se trataron por diferentes periodos con LTA (15 µg/ml). B) Las células H9c2 se sembraron en cajas de 6 pozos. Cuando alcanzaron la subconfluencia se ayunaron por 16 hrs. en DMEM + 2% SBF se trataron con diferentes dosis de LTA por 4 horas. C) Las células se preincubaron durante 30 minutos con los inhibidores posteriormente se trataron con LTA por 4 hr. Al término la reacción se aisló el RNA y se utilizó 1µg de RNA para el ensayo de RT-PCR, los geles se tiñeron con bromuro de etidio y las imágenes se obtuvieron por el sistema Digi-Doct y se analizaron por el sistema Labs Work.

Efecto de los flavonoides sobre la fosforilación de las MAPKs

Para determinar las acciones de los flavonoides sobre la fosforilación de ERK1/2 inducida por el LTA, las células se preincubaron con genisteína, luteolina, quercetina y quercetagetina, todos en dosis de 10 μ M durante 30 minutos y posteriormente se trataron con LTA. Nuestros resultados mostraron que el tratamiento con LTA (15 μ g/ml) durante 10 minutos promovió la fosforilación de ERK 1/2 (p44 y p42). El tratamiento con los flavonoides bloqueó completamente la fosforilación de p44 y p42 inducida por el LTA (15 μ g/ml) (Fig. 5). Posteriormente, se probó la capacidad de los flavonoides en inhibir la fosforilación de p38 (Fig. 5). La exposición de los cardiomiocitos con LTA (15 μ g/ml) durante 15 minutos produjo un incremento en la fosforilación de p38 en 3 veces sobre la actividad basal. El tratamiento con luteolina y quercetagetina (10 μ M) atenuó completamente la fosforilación de p38. Sin embargo genisteína y quercetina mostraron menor efecto inhibitorio (Fig. 5). De igual forma, estudiamos el efecto de los flavonoides sobre la fosforilación de JNK (Fig. 5). La exposición de los cardiomiocitos con LTA (15 μ g/ml) durante 15 minutos produjo un incremento en la fosforilación de JNK 2.5 veces sobre la actividad basal. El tratamiento con quercetina (10 μ M) y quercetagetina (10 μ M) atenuaron completamente la fosforilación de JNK. Sin embargo, luteolina y genisteína no mostró efecto inhibitorio (Fig. 5). Finalmente evaluamos el efecto de los flavonoides sobre la fosforilación de Akt, nuevamente encontramos que el tratamiento con luteolina y quercetagetina bloquean completamente la activación de Akt. Lo siguiente que evaluamos fue observar la localización de las MAPK y Akt mediante ensayos de inmunocitoquímica. Observamos que el tratamiento con el flavonoide promueve la localización de las MAPK y Akt en la fracción nuclear de las células (Fig. 6). Lo que nos sugiere que el flavonoide inhibe la activación de las MAPK y de Akt pero no evita la translocación de las cinasas al núcleo celular.



LTA S.s. (15 µg/ml)	-	+	+	+	+	+	} Preincubación por 30 min.
Luteolina (10 µM)	-	-	+	-	-	-	
Quercetina (10 µM)	-	-	-	+	-	-	
Genisteína (10 µM)	-	-	-	-	+	-	
Quercetagetina (10 µM)	-	-	-	-	-	+	

Figura 5. Efecto de genisteína, quercetina, luteolina y quercetagetina sobre la fosforilación de ERK 1/2, p38 y JNK inducida por el ácido lipoteicoico de *Streptococcus sanguis* en cardiomiocitos.

Las células (5×10^6 células/ml) se pretrataron con los diferentes flavonoides (10 µM) por 30 minutos y después con LTA (15 µg/ml) durante 15 minutos. Las células se procesaron para su análisis por Western Blot usando anti-fosfo ERK 1/2, anti-fosfo p38 y anti-fosfo JNK las membranas se desnudaron y se utilizaron los anticuerpos dirigidos contra las formas no fosforiladas de ERK 1/2, p38 y JNK como controles para mostrar que se cargó igual concentración de proteína. Se obtuvieron resultados similares de tres experimentos por separado.

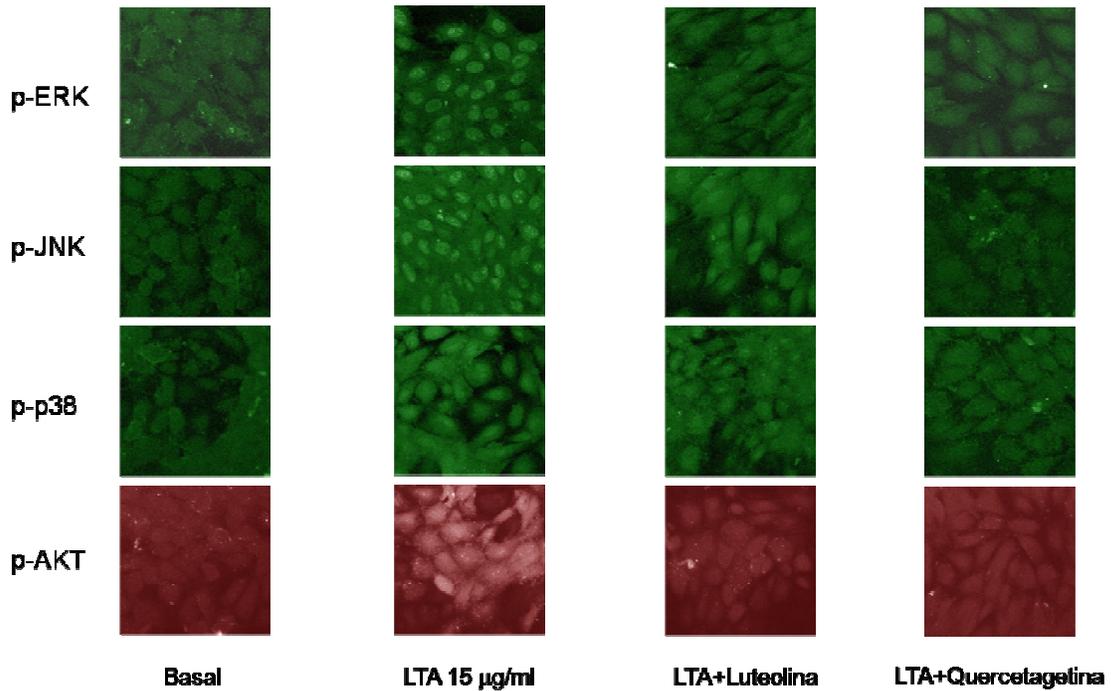


Figura 6. Efecto de los flavonoides sobre la localización subcelular de las formas fosforiladas de ERK 1/2, p38, JNK y AKT inducida por el ácido lipoteicoico obtenido de *Streptococcus sanguis* en cardiomiocitos.

Las células se sembraron en cubreobjetos de 0.17mm a una densidad de 1×10^6 células/ml. Se trataron con flavonoide (10 μ M) por 30 minutos y posteriormente se incubaron con el LTA (15 μ g/ml) para ERK 1/2 (10 min.) para p38 y JNK (15 min.) y para AKT (30 min.). Al término las células se fijaron y se trataron con los respectivos anticuerpos por 2 hr. a una dilución 1:50, se lavaron y se incubaron con los anticuerpos secundarios a una dilución de 1:100. La asociación del anticuerpo secundario se observó en microscopia confocal. Los resultados son los representativos de cinco observaciones independientes.

Efecto de los flavonoides sobre la fosforilación de IκB estimulada por LTA.

La activación de NF-κB es un factor clave en la liberación de TNFα, IL-6 y óxido nítrico. Este factor de transcripción se activa cuando se transloca del citoplasma al núcleo de las células cuando el inhibidor de NF-κB (IκB) se fosforila. Por este motivo y para determinar el papel de los flavonoides sobre la fosforilación de IκB inducida por LTA en cardiomiocitos se realizaron ensayos de Western blot de las fracciones totales de los cardiomiocitos. Nuestros resultados mostraron que los flavonoides inhiben la fosforilación de IκB inducida por LTA en cardiomiocitos (Fig 7-A). Por otra parte, en los ensayos de inmunohistoquímica, encontramos que el tratamiento con LTA promueve un aumento en la intensidad de la fluorescencia, debido a la fosforilación de IκB. El tratamiento con los flavonoides promueve una disminución en la detección de IκB (Fig. 7-B).

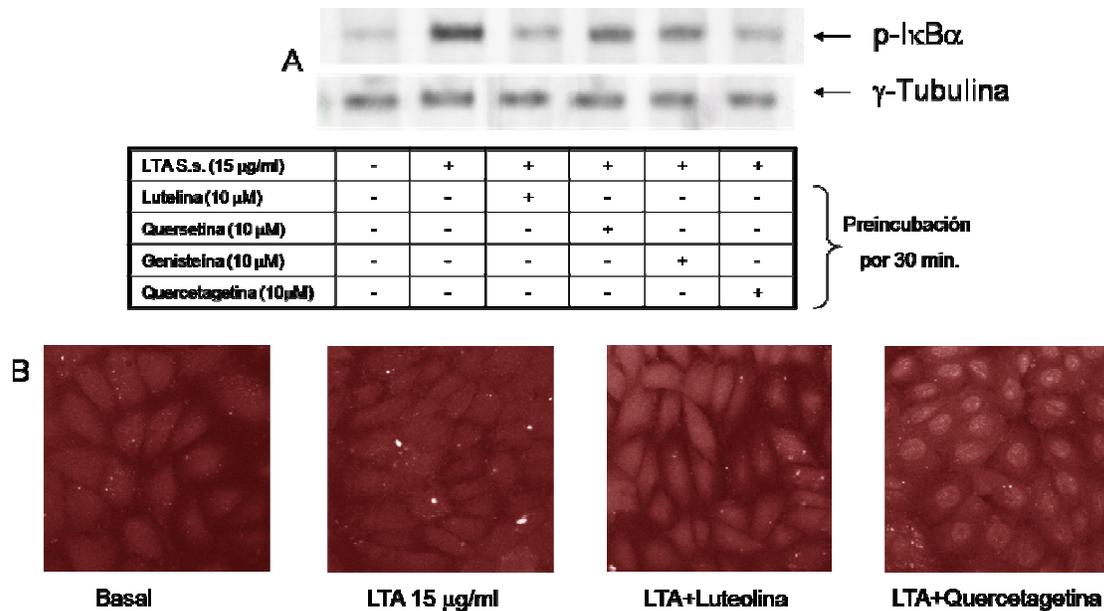


Figura 7. Efecto de genisteina, quercetina, luteolina y quercetagetina sobre la fosforilación de Iκ-Ba inducida por el ácido lipoteicoico obtenido de *Streptococcus sanguis* en cardiomiocitos.

A) Las células (5×10^6 células/ml) se pretrataron con los diferentes flavonoides (10 µM) por 30 minutos y después con LTA (15 µg /ml) por 15 minutos. Las células se procesaron para su análisis por Western Blot usando anti-fosfo Iκ-Ba las membranas se desnudaron y se utilizó anticuerpo dirigido contra γ-Tubulina como control para mostrar que se cargó igual concentración de proteína. Se obtuvieron resultados similares de tres experimentos por separado que se procesaron por densitometría se obtuvo la media \pm S.E.M. B) Efecto de los flavonoides sobre la localización de Iκ-Ba inducida por LTA. Las células se sembraron en cubreobjetos de 0.17mm a una densidad de 1×10^6 células /ml. Se trataron con flavonoide (10 µM) por 30 minutos y posteriormente se incubaron con el LTA (15 µg/ml) para Iκ-Ba (15min) al término las células se fijaron y se trataron con su respectivo anticuerpo por 2 hr con el anticuerpo a una dilución 1:50, se lavaron y se incubó con el anticuerpo secundario a una dilución de 1:100. La asociación del anticuerpo secundario se observó en microscopia confocal. Los resultados son los representativos de cinco observaciones independientes.

Efecto de los flavonoides sobre la inducción de ciclooxigenasa-2 (COX-2) e IL-1 β en cardiomiocitos tratados con LTA.

Las prostaglandinas juegan un importante papel en regular diversas funciones tanto en condiciones fisiológicas y como patológicas. Se ha demostrado que PGE2 es un potente estimulador de la resorción ósea y está asociado con la pérdida de la adherencia. Por este motivo decidimos estudiar los efectos de los flavonoides sobre la inducción de COX-2 y IL-1 β en cardiomiocitos tratados con LTA. Encontramos que tratamiento con el flavonoide bloqueó la expresión de COX-2, siendo los más activos luteolina, quercetina y quercetagetina (Fig. 8-A). Por otra parte encontramos que el LTA induce la expresión de IL-1 β después de 4 hrs. de tratamiento a una dosis de 10 μ g/ml (Fig.8-B). Finalmente encontramos que el tratamiento con los flavonoides bloqueó la inducción de IL-1 β inducida por el LTA en cardiomiocitos (Fig. 8-C).

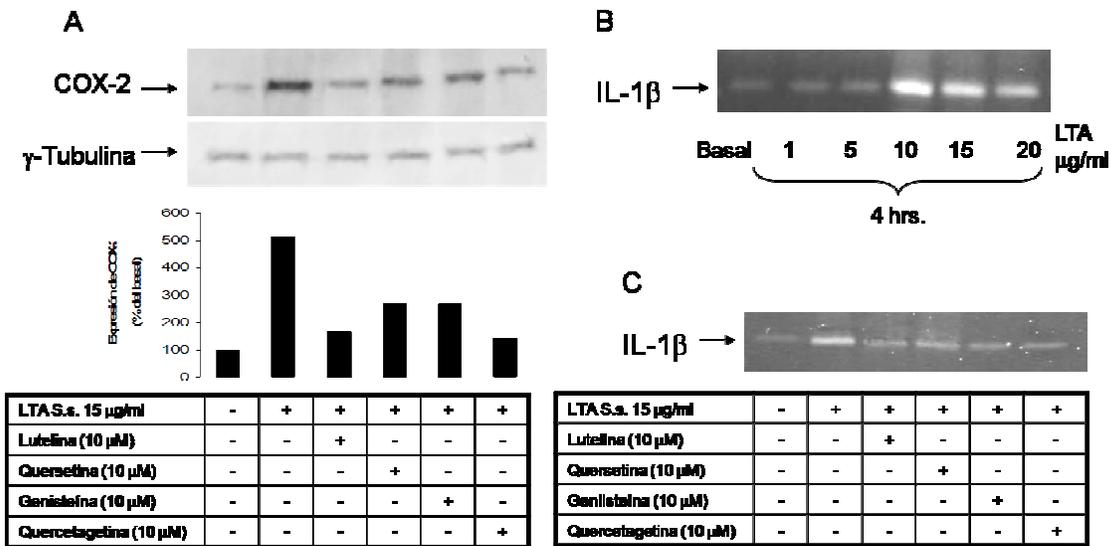


Figura 8. Efecto de los flavonoides sobre la expresión de COX-2 e IL-1 tratados con ácido lipoteicoico obtenido de *Streptococcus sanguis* en cardiomiocitos.

A) Las células H9c2 (1×10^6) se sembraron en cajas de 6 pozos. Cuando alcanzaron la subconfluencia se ayunaron en DMEM + 2% SBF por 16 horas al término se trataron por 30 minutos con los diferentes flavonoides (10 μ M) y posteriormente con LTA (15 μ g/ml). Las muestras se procesaron para el ensayo de Western-blot. B) Las células H9c2 se sembraron en cajas de 6 pozos. Cuando alcanzaron la subconfluencia se ayunaron por 16 hrs. en DMEM + 2% SBF se trataron con diferentes dosis de LTA por 4 horas. C) Las células se preincubaron durante 30 minutos con los flavonoides posteriormente se trataron con LTA por 4 hr. Al término la reacción se aisló el RNA y se utilizó 1 μ g de RNA para el ensayo de RT-PCR, los geles se tiñieron con bromuro de etidio y las imágenes se obtuvieron por el sistema Digi-Doct y se analizaron por el sistema Labs Work.

11. DISCUSIÓN

Hemos establecido que el ácido lipoteicoico obtenido de *Streptococcus sanguis*, activa vías de señalización intracelular en cardiomiocitos. Nuestros resultados muestran que el tratamiento con LTA induce la activación de los miembros de las proteínas activadas por mitógeno, así como de Akt y promueven la expresión de COX-2 y de IL-1 β . De igual manera, nosotros encontramos que los flavonoides inhiben la fosforilación de ERK 1/2, p38, JNK y Akt inducida por el LTA e inhiben la síntesis de COX2 y de IL-1 β . Los resultados obtenidos de esta investigación se resumen en la figura 10.

Durante las bacteriemias subclínicas, los estreptococos orales presentes en la sangre quedan expuestos a las superficies endocárdicas y endovasculares. Estas superficies coinciden con la cubierta conformada por células endoteliales, las cuales contienen una membrana anti-coagulante lo que evita eventos tromboticos patológicos (125,126). Cuando se producen los eventos tromboticos la sangre fluye con mínima cantidad de turbulencia, señal para que las plaquetas formen trombos, oclusión arterial y finalmente infarto al miocardio (127-129). Diferentes especies de *Streptococcus* están asociadas con la patogénesis de la arterosclerosis, porque se han identificado en las placas arterioscleróticas, pero aún no se ha esclarecido con certeza su correlación con la patogénesis (130). Aproximadamente el 60% de las cepas de *S. sanguis* provocan agregación plaquetaria en estudios in vitro (131,32).

Durante las bacteriemias originadas a partir los tejidos bucales o de la placa dentobacteriana, el daño a los tejidos también induce la liberación de endotoxinas, las cuales también inducen la expresión de citocinas en monocitos (133). El lipopolisacárido ha sido ampliamente utilizado y se ha caracterizado que incrementa los niveles de proteína reactiva C, IL-1 e IL-6 (134,135) y es un potente

pro-coagulante que disemina la coagulación intravascular (135,136). De los microorganismos presentes en la placa dentobacteriana *Streptococcus sanguis*, tiene actividad promotora de la coagulación (137-139). Así mismo, *S. sanguis* es único en su género cuyo ácido lipoteicoico muestra actividad en la inducción de citocinas promotoras de la inflamación.

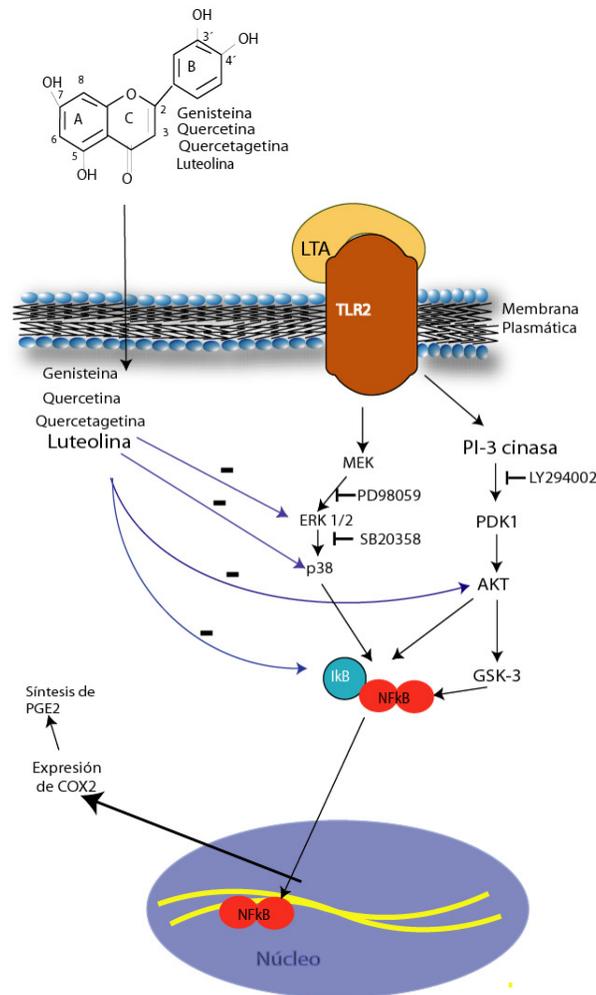


Figura 10. Modelo del mecanismo de acción del ácido lipoteicoico y flavonoides en cardiomiocitos.

En el esquema se muestra la estructura de los flavonoides que regulan los efectos de la asociación del LTA con su receptor TLR2, de esta asociación se produce la activación de ERK 1/2, JNK, p38 y AKT para la expresión de COX-2 y de IL-1. Por otra parte la activación de AKT vía PI-3K y PDK1 ocasiona la fosforilación de Iκ-B y la translocación de NFκB. Los flavonoides regulan negativamente a ERK 1/2, JNK, p38 y AKT lo que

conduce a la inhibición de NF κ B y disminuyendo la síntesis de PGE2 y de IL-1 β en cardiomiocitos tratados con LTA.

Nosotros hemos encontrado que el ácido lipoteicoico obtenido de ésta bacteria presenta actividad biológica y estimula a ERK 1/2, JNK y p38 de manera similar a lo reportado en macrófagos con el ácido lipoteicoico obtenido de *Staphylococcus aureus* (139).

Por otra parte, algunos flavonoides como el taxifolin glucósido inhiben los efectos del lipopolisacárido y del ácido lipoteicoico en células dendríticas y en macrófagos wogonina inhibe los efectos del lipopolisacárido y del ácido lipoteicoico sobre la producción de óxido nítrico en macrófagos (140,141). Nosotros hemos encontrado que los flavonoides genisteina, quercetina y quercetagina inhiben los efectos ocasionados por el ácido lipoteicoico en cardiomiocitos.

En resumen, el ácido lipoteicoico de *Streptococcus sanguis* posee actividad biológica en cardiomiocitos, promoviendo la activación de cinasas que intervienen en la señalización intracelular y expresión de moléculas promotoras de procesos inflamatorios. Con los datos obtenidos de esta investigación, podemos concluir que las medidas de prevención y de atención odontológica de manera oportuna son de gran importancia porque de los más de trescientos microorganismos que conforman la biopelícula y que colonizan superficies dentales de manera cotidiana pueden bajo ciertos procedimientos ocasionar su ingreso al torrente sanguíneo y pueden provocar la colonización de estos en otros órganos provocando complicaciones graves como el infarto cerebral y muerte. Sin duda alguna la salud bucodental es relevante en el mantenimiento y la resistencia de los individuos.

12. CONCLUSIONES

Los flavonoides tienen diferentes efectos en el sistema cardiovascular como la inducción de una progresiva y sostenida reducción de la presión sanguínea en ratones que presentan hipertensión. Sin embargo, no se ha esclarecido el papel de los flavonoides en la regulación de los efectos ocasionados por ácido lipoteicoico en cardiomiocitos. Consideramos que los resultados obtenidos de esta investigación aportan una información novedosa sobre la regulación de cinasas y moléculas que promueven procesos inflamatorios en el miocardio cuando se expone al ácido lipoteicoico. Por otra parte, por primera ocasión mostramos el efecto que tienen las toxinas de origen bucal en la afección de otros órganos que son vitales para los individuos. Sin embargo, se deberá realizar mayor investigación a fin de caracterizar si el control en la liberación de moléculas promotoras de la inflamación, permiten la cura en la afección cardíaca.

13. REFERENCIAS

1. De Soet J, et al. Strin related acid production by oral streptococci. *Caries Research*. 2000; 34.
2. Van Houte, et al. The final pH of bacteria comprising the predominant flora on sound and caries human root and enamel surfaces. *Journal Dental Research*. 1996.
3. Moron A, et al. Prevalencia de caries dental en escolares del municipio Maracaibo. *Acta Odontológica Venezolana*. 1998; 36; 3.
4. Camejo M. Sensibilidad in vitro de *Streptococcus mutans* a Sanguinaria, compuesto fenólico y clorhexidina. *Acta Odontológica Venezolana*. 1999; 37; 2.
5. Eguasa N, et al. Alteration of the coadherence of *Candida albicans* with oral bacteria by dietary sugars. *Oral Microbiology and Immunology*. 2001; 16.
6. Moalic E, et al. The Extent of Oral Fungal Flora in 353 Students and Possidible Relation ships with Dental caries. *Caries Research*. 2001; 35. www.db.od.mahSe/car/data/bufferst.html.
7. Whittaker CJ, Kier CM, Kolenbrander PE. Mechanisms of adhesión by oral bacteria. *Annu, Rev Microbiol*. 1996; 50:513-552.
8. Jenkinson HF, Lamont RJ. Streptococcal adhesion and colonization. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1997; 8: 175-200.
9. Meyer DH, Mintz KP, Fives-Taylor PM. Models of invasion of enteric and periodontal pathogens into epithelial cells: a comparative analisis. *Crit. Rev. Oral Biol*. 1997; 8:389-409.
10. Carranza FA, Newman MG, Takei HH. *Periodontología clínica*. 9a ed. México: McGraw-Hill Interamericana. 2004.
11. Meyer DH, Fives TP. Oral pathogens: form dental plaque to cardiac disease. *Current Opinion in microbiology*. 1998; 1:88-95.
12. Wang M, Muhamad AK, ShakhatreH, James D, Liang S, Nishiyama S, Yoshimura F, Donald R. Demuth, Hajishengallis G. Fimbrial Proteins of *Porphyromonas gingivalis* Mediate In Vivo Virulence and Exploit TLR2 and

- Complement Receptor 3 to Persist in Macrophages. *The Journal of Immunology*. 2007; 179:2349-2358.
13. Utto Vi, Pan YM, Leung WK, Larjava H, Ellen RP, Finlay BB, Mc Bride BC. Cytopathic effects of *Treponema denticola* chymotrypsin-like proteinase on migrating and stratified epithelial cells. *Infect. Immun.* 1995; 63: 3401-3410.
 14. Berbari EF, Cockerill FR, Steckelberg JM. Subspecialty clinics: infectious disease. Infective endocarditis due to unusual or fastidious microorganisms. *Mayo Clinic Proc.* 1997; 72:532–542.
 15. Burnette CD, Wells V, Viscount H, Munro C, Fenno J, Fives TP, Macrina F. FimA, a major virulence factor associated with *Streptococcus parasanguis*. *Infect Immun.* 1995; 63:4669–4674
 16. MC Herzberg, GD MacFarlane, K Gong, NN Armstrong, AR Witt, PR Erickson, MW Meyer. The platelet interactivity phenotype of *Streptococcus sanguis* influences the course of experimental endocarditis. *Infect Immun.* 1992; 60:4809–48188.
 17. DeStefano F, Anda RF, Kahn S, Williamson DF, Russell CM. Dental disease and risk of coronary heart disease and mortality. *BMJ.* 1993; 306:688–691.
 18. Beck J, Garcia R, Heiss G, Vokonas PS, Offenbacher S. Periodontal disease and cardiovascular disease of outstanding interest . *J Periodontol.* 1996; 67:1123–1137.
 19. 64. Abbas AH, Lichtman AH. Cellular and molecular immunology. Saunders, fifth edition. 2005; 276-296.
 20. Genco RJ, Sojar H, Lee JY, Sharma A, Bedi G, Cho MI, Dyer DW. *Porphyromonas gingivalis* fimbriae: structure, function, and insertional inactivation mutants. En: RJ Genco, S Hamada, T Lehner, J McGhee and S Mergenhagen, Editors, *Molecular pathogenesis of periodontal disease*, ASM Press, Washington, DC. 1994; 13–23.
 21. Njoroge T, Genco RJ, Sojar HT, Hamada N, Genco CT. A role for fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* invasion of oral epithelial cells of special interest. *Infect Immun.* 1997; 65:1980–1984.

22. N Hamada, Sojar HT, Cho MI, Genco RJ. Isolation and characterization of minor fimbriae from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*. 1996; 64:4788–4794.
23. Lamont RJ, Bevan CA, Gil S, Persson RE, Rosan B. Involvement of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae in adherence to *Streptococcus gordonii*. *Oral Microbiol Immunol*. 1998; 3:272–276.
24. Goulbourne PA, Ellen RP. Evidence that *Porphyromonas* (Bacteroides) *gingivalis* fimbriae function in adhesion to *Actinomyces viscosus*. *J Bacteriol*. 1991; 173:5266–5274.
25. Li J, Ellen RP, Hoover CI, Felton JR. Association of proteases of *Porphyromonas* (Bacteroides) *gingivalis* with its adhesion to *Actinomyces viscosus*. *J Dent Res*. 1991; 70:82–86.
26. Grenier D. Further evidence for a possible role of trypsin-like activity in the adherence of *Porphyromonas gingivalis*. *Can J Microbiol*. 1992; 38:1189–1192.
27. Kontani M, Ono H, Shibata H, Okamura Y, Tanaka T, Fujiwara T, Kimura S, Hamada S. Cysteine protease of *Porphyromonas gingivalis* 381 enhances binding of fimbriae to cultured fibroblasts and matrix proteins. *Infect Immun*. 1996; 64:756–762.
28. Gibbons RJ, Hay DI, Childs WC, Davis G. Role of cryptic receptors (cryptitopes) in bacterial adhesion to oral surfaces. *Arch Oral Biol*. 1990; 35:S107–S114.
29. Grenier D, Mayrand D. Functional characterization of extracellular vesicles produced by *Bacteroides gingivalis*. *Infect Immun*, 1987; 55:111–117.
30. Ellen RP, Grove DA. *Bacteroides gingivalis* vesicles bind to and aggregate *Actinomyces viscosus*. *Infect Immun*, 1989; 57:1618–1620.
31. Duncan MJ, Nakao S, Skobe Z, Xie E. Interactions of *Porphyromonas gingivalis* with epithelial cells. *Infect Immun*. 1993; 61:2260–2265.
32. Sandros J, Papapanou PN, Dahlen G. *Porphyromonas gingivalis* invades oral epithelial cells in vitro. *J Periodontal Res*. 1993; 28:219–226.
33. Sandros J, Papapanou PN, Nannmark U, Dahlen G. *Porphyromonas gingivalis* invades pocket epithelium in vitro. *J Periodontal Res*, 1994; 29:62–69.

34. Lamont RJ, Chan A, Belton CM, Izutsu KT, Vasel D, Weinberg A. Porphyromonas gingivalis invasion of epithelial cells. Infect Immun. 1995; 63:3878–3885.
35. Izutsu KT, Belton MC, Chan A, Fatherazi S, Kanter JP, Park Y, Lamont RJ. Involvement of calcium in interaction between gingival epithelial cells and Porphyromonas gingivalis of special interest. FEMS Microbiol Lett. 1996; 144:145–150.
36. Meyer DH, Fives PM. Characteristics of adherence of Actinobacillus actinomycetemcomitans to epithelial cells. Infect Immun. 1994; 62:928–935.
37. Preus HR, Namork E, Olsen I. Fimbriation of Actinobacillus actinomycetemcomitans. Immunology. 1988; 3:93–94.
38. Rosan B, Slots J, Lamont RJ, Listgarten M, Nelson GM. Actinobacillus actinomycetemcomitans fimbriae. Oral Microbiol Immunol. 1988; 3:58–63.
39. Fives TM, Meyer D, Mintz K. Characteristics of Actinobacillus actinomycetemcomitans invasion of and adhesion to cultured epithelial cells. Adv Dent Res. 1995; 9:55–62.
40. Njoroge, Genco RJ, Sojar HT, Hamada N, Genco CT. A role for fimbriae in Porphyromonas gingivalis invasion of oral epithelial cells of special interest. Infect Immun. 1997; 65:1980–1984.
41. Weinberg A, Belton CM, Park Y, Lamont RJ. Role of Porphyromonas gingivalis fimbriae in invasion of gingival epithelial cells of special interest. Infect Immun, 1997; 65:313–316.
42. Sandros, Papapanou PN, Dahlen G. Porphyromonas gingivalis invades oral epithelial cells in vitro. J Periodontal Res. 1993; 28:219–226
43. Sandros, Papapanou PN, Nannmark U, Dahlen G. Porphyromonas gingivalis invades pocket epithelium in vitro. J Periodontal Res. 1994; 29:62–69.
44. Lamont RJ, Chan A, Belton CM, Izutsu KT, Vasel D, Weinberg A. Porphyromonas gingivalis invasion of epithelial cells. Infect Immun. 1995; 63:3878–3885.
45. Izutsu KT, Belton CM, Chan A, Fatherazi S, Kanter JP, Park Y, Lamont RJ. Involvement of calcium in interaction between gingival epithelial cells and Porphyromonas gingivalis of special interest. FEMS Microbiol Lett. 1996; 144:145–150.

46. Madianos PN, Papapanou PN, Nannmark U, Dahlen G, Gunnar I, Sandros J. Porphyromonas gingivalis FDC381 multiplies and persists within human oral epithelial cells in vitro. *Infect Immun.* 1996; 64:660–664.
47. Papapanou PN, Sandros J, Lindberg K, Duncan MJ, Niederman R, Nannmark U. Porphyromonas gingivalis may multiply and advance within stratified functional epithelium in vitro. *J Periodontal Res.* 1994; 29:374–375.
48. Meyer DH, Sreenivasan PK, Fives TP. Evidence for invasion of a human oral cell line by Actinobacillus actinomycetemcomitans. *Infect Immun.* 1991; 59:2719–2726.
49. Fives TP, Meyer DH, Sreenivasan PK, Mintz KP. Invasion of cultured epithelial cells by periodontopathogens. In: RJ Genco, S Hamada, T Lehner, J McGhee and S Mergenhagen, Editors, *Molecular pathogenesis of periodontal disease.* ASM Press, Washington, DC. 1994; 57–68.
50. Meyer DH, Lippmann JL, Fives TP. Invasion of epithelial cells by Actinobacillus actinomycetemcomitans: a dynamic, multistep process of outstanding interest. *Infect Immun.* 1996; 64:2988–2997.
51. Brissette CA, Fives TP. Actin independent entry of epithelial cells by Actinobacillus actinomycetemcomitans. *J Dent Res.* 1997; 76:227.
52. Sreenivasan KP, Meyer DH, Fives TP. Requirements for invasion of epithelial cells by Actinobacillus actinomycetemcomitans. *Infect Immun.* 1993; 61:1239–1245.
53. Fives TP, Meyer DH, Mintz KP. Virulence factors of the periodontopathogen Actinobacillus actinomycetemcomitans. *J Periodontol.* 1996; 67:291–297.
54. Meyer DH, Mintz KP, Fives TP. Models of invasion of enteric and periodontal pathogens into epithelial cells: a comparative analysis of outstanding interest. *Crit Rev Oral Biol.* 1997; 8:389–409.
55. Lippmann JL, Meyer DH, Fives TP. Microtubules play a role in the A. actinomycetemcomitans invasion process. *J Dent Res.* 1997; 75:130.
56. Durack DT. Prevention of infective endocarditis. *N Engl J Med.* 1995; 332:38–44.

57. Munro CL, Macrina FL. Sucrose-derived exopolysaccharides of *Streptococcus* mutants V403 contribute to infectivity in endocarditis. *Molecular Microbiol.* 1993; 8:133–142
58. Crawford I, Russell C. Comparative adhesion of seven species of streptococci isolated from the blood of patients with subacute bacterial endocarditis to fibrin-platelet clots in vitro. *J App Bacteriol.* 1986; 60:127–133.
59. Meddens MJ, Thompson J, Leijh PC, Van Furth R. Role of granulocytes in the induction of an experimental endocarditis with a dextran-producing streptococcus sanguis and its dextran- negative mutant. *Br J Exp Pathol.* 1984; 65:257–265.
60. Herzberg MC, Brintzenhofe KL, Clawson CC. Aggregation of human platelets and adhesion of *Streptococcus sanguis*. *Infect Immun.* 1983; 39:1457–1469.
61. Herzberg M, MacFarlane GD, Delzer PR. *Streptococcus sanguis* interaction with human platelets. En: SE Mergenhagen and B Rosan, Editors, *Molecular Basis of Oral Microbial Adhesion*, ASM Press, Washington, DC. 1985; 53–60.
62. Beck, Garcia R, Heiss G, Vokonas PS, Offenbacher S. Periodontal disease and cardiovascular disease of outstanding interest. *J Periodontol.* 1996; 67:1123–1137.
63. Genco RJ, Goldman HM, Cohen W. *Periodoncia*. Nueva editorial Interamericana. Mc. Graw-Hill. 1993.
64. Bhakdi S, Klonisch T, Nuber P, Fischer W. Stimulation of monokine production by lipoteichoic acids. *Infect Immun.* 1991; 59:4614-4620.
65. Overland G, Morath S, Yndestad A, Hartung T, Thiermermann C, Foster SJ, Smerdsrod B, Mathisen O, Oukurst P, Aase AO, Wang JE. Lipoteichoic acid is a potent inducer of cytokine production in rat and human Kupffler cells in-vitro. *Surg Infect.* 2003; 4:181-191.
66. Cao Z, Henzel WJ, Gao X. IRAK: a kinase associated with the interleukin-1 receptor. *Science.* 1996; 271:1128-1131.
67. Kao SJ. Lipoteichoic acid induces nuclear factor.kB activation and nitric oxide synthase expresión via phosphatidylinositol 3-kinase AKT, and p38 MAPK in RAW 264.7 macrophages. *Immunology.* 2002; 115:366-374.

68. Takeda K, Kaisho, Akira S. Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 2003; 21:335.
69. Fischer W, Koch HU, Haas R. Improved preparation of lipoteichoic acid. *Eur. J. Biochem.* 1983; 133: 523-530.
70. Bhakdi S, Klonisch T, Nuber P, Fischer W. Stimulation of monokine production by lipoteichoic acids. *Infect. Immun.* 1991; 59:4614-4620.
71. Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature.* 2002; 420:846–52.
72. Barton GM. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *J Clin Invest.* 2008;118:413–20.
73. García LA, Guillamón E, Villares A, Rostagno M, Martínez J. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflamm. Res.* 2009:37-3.
74. Haddad PS, Azar GA, Groom S, Boivin M. Natural health products, modulation of immune function and prevention of chronic disease. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2005;2:513–20.
75. Yoon J-H, Baek SJ. Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. *Yonsei Med J.* 2005;46:585–96.
76. Robak J, Gryglewski RJ. Bioactivity of flavonoids. *Pol J Pharmacol.* 1996;48:555–64.
77. Russo A, Acquaviva R, Campisi A, Sorrenti V, Di Giacomo C, Virgata G, et al. Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. *Cell Biol Toxicol.* 2000;16:91–8.
78. Havsteen B. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther.* 2002;96:67–202.
79. Rotelli AE, Guardia T, Juárez AO, de la Rocha NE. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. *Pharmacol Res.* 2003;48:601–6.
80. Wang L, Tu YC, Lian TW, Hung JT, Yen JH, Wu MJ. Distinctive antioxidant and anti-inflammatory effects of flavonols. *J Agric Food Chem.* 2006;54:9798–804.
81. Bazzano LA, He J, Ogden LG, Loria CM, Vupputuri S, Myers L, et al. Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease in US adults: the first National Health and Nutrition Examination Survey Epidemiologic follow-up study. *Am J Clin Nutr.* 2002;76:93–9.

82. Joshipura KJ, Hu HB, Manson JE, Stampfer MJ, Rimm EB, Speizer FE, et al. The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease. *Ann Intern Med.* 2001;134:1106–14.
83. Liu S, Manson JE, Lee I-M, Cole SR, Hennekens CH, Willett WC, et al. Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease: the Women's Health Study. *Am J Clin Nutr.* 2000;72:922–8.
84. Gandini S, Merzenich H, Robertson C, Boyle P. Meta-analysis of studies on breast cancer risk and diet: the role of fruit and Flavonoids in cancer and cardiovascular disease vegetable consumption and the intake of associated micronutrients. *Eur J Cancer.* 2000;36:636–46.
85. Kolonel LN, Hankin J, Whittemore AS, Wu AH, Gallagher RP, Wilkens L, et al. Vegetables, fruits, legumes and prostate cancer: a multiethnic case-control study. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* 2000;9:795–804.
86. Feskanich D, Ziegler RG, Michaud DS, Giovannucci EL, Speizer FE, Willett WC, et al. Prospective study of fruit and vegetable consumption and risk of lung cancer among men and women. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92:1812–23.
87. Jiang F, Dusting GJ. Natural phenolic compounds as cardiovascular therapeutics: potential role of their anti-inflammatory effects. *Curr Vasc Pharmacol.* 2003;1:135–56.
88. Kim HP, Kun HS, Chang HW, Kang SS. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *J Pharmacol Sci.* 2004;96:229–45.
89. Beecher GR. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J Nutr.* 2003;133:3248S–54S.
90. Paradkar PN, Blum PS, Berhow MA, Bauman H, Kuo SM. Dietary isoflavones suppress endotoxin-induced inflammatory reaction in liver and intestine. *Cancer Lett.* 2004;215:21–8.
91. Duan W, Kuo C, Selvarajan S, Chua KY, Bay BH, Wong WS. Anti-inflammatory effects of genistein, a tyrosine kinase inhibitor, on a guinea pig model of asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167:185–92.
92. Ruetten HT. Effects of tyrphostins and genistein on the circulatory failure and organ dysfunction caused by endotoxin in the rat: a possible role for protein tyrosine kinase. *Br J Pharmacol.* 1997;122:59–70.

93. Verdrengh M, Jonsson IM, Holmdahl R, Tarkowski A. Genistein as an anti-inflammatory agent. *Inflamm Res*. 2003;52:341–6.
23. Guardia T, Rotelli AE, Juárez AO, Pelzer LE. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Farmacol*. 2001;56:683–7.
94. Guardia T, Rotelli AE, Juárez AO, Pelzer LE. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Farmacol*. 2001;56:683–7.
95. Santangelo C, Vari R, Scazzocchio B, Di Benedetto R, Filesi C, Masella R. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Ann Ist Super Sanita*. 2007;43:394–405.
96. Libby P. Inflammation and atherosclerosis. *Nature*. 2002; 420:868–74.
97. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105:1135–43.
98. Dong ZM, Chapman SM, Brown AA, Frenette PS, Hynes RO, Wagner DD. The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest*. 1998;102:145–52.
99. Libby P. Changing concepts of atherogenesis. *J Intern Med*. 2000;247:349–58.
100. Bonomini F, Tengattin IS, Fabiano A, Bianchi R, Rezzani R. Atherosclerosis and oxidative stress. *Histol Histopathol*. 2008;23:381–90.
101. Hofnagel O, Luechtenborg B, Weissen-Plenz G, Robenek H. Statins and foam cell formation: impact on LDL oxidation and uptake of oxidized lipoproteins via scavenger receptors. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1771:1117–24.
102. Charo IF, Taubman MB. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ Res*. 2004;95:858–66.
103. Szekanecz Z. Pro-inflammatory cytokines in atherosclerosis. *Isr Med Assoc J*. 2008;10:529–30.
104. Ohsuzu F. The roles of cytokines, inflammation and immunity in vascular diseases. *J Atheroscler Thromb*. 2004;11:313–21.
105. Mallat Z, Gojova A, Marchiol-Fournigault C, Esposito B, Kamaté C, Merval R, et al. Inhibition of transforming growth factor-beta signaling

- accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice. *Circ Res*. 2001;89:930–4.
106. Kaperonis EA, Liapis CD, Kakisis JD, Dimitroulis D, Papavassiliou VG. Inflammation and atherosclerosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2006;31.
107. Schonbeck U, Mach F, Sukhova GK, Murphy C, Bonnefoy JY, Fabunmi RP, et al. Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by T lymphocytes: a role for CD40 signaling in plaque rupture? *Circ Res*. 1997;81:448–54.
108. Wu L, Fan J, Matsumoto S, Watanabe T. Induction and regulation of matrix metalloproteinase-12 by cytokines and CD40 signaling in monocyte/macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;269:808–15.
109. Zebrack JS, Anderson JL. Role of inflammation in cardiovascular disease: how to use C-reactive protein in clinical practice. *Prog Cardiovasc Nurs*. 2002;17:174–85.
110. Shishehbor MH, Bhatt DL. Inflammation and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2004;6:131–9.
111. Hertog MGL, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F, et al. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med*. 1995;155:381–6.
112. Knekt P, Jarvinen R, Reunanen A, Maatela J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *BMJ*. 1996;312:478–81.
113. Knekt P, Kumpulainen J, Järvinen R, Rissanen H, Heliövaara M, Reunanen A, et al. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr*. 2002;76:560–8.
114. Yochum L, Kushi LH, Meyer K, Folsom AR. Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. *Am J Epidemiol*. 1999;149:943–9.
115. Rimm E, Katan M, Ascherio A, Stampfer MJ, Willett WC. Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals. *Ann Intern Med*. 1996;125:384–9.

116. Sesso HD, Gaziano JM, Liu S, Buring JE. Flavonoid intake and the risk of cardiovascular disease in women. *Am J Clin Nutr.* 2003;77:1400–8.
117. Mink PJ, Scrafford CG, Barraj LM, Harnack L, Hong CP, Nettleton JA, et al. Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality: a prospective study in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr.* 2007;85:895–909.
118. Hooper L, Kroon PA, Rimm EB, Cohn JS, Harvey I, Le Cornu KA, et al. Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr.* 2008;88:38–50.
119. Mukamal KJ, Maclure M, Muller JE, Sherwood JB, Mittleman MA. Tea consumption and mortality after acute myocardial infarction. *Circulation.* 2002;105:2476–81.
120. Wiswedel I, Hirsch D, Kropf S, Gruening M, Pfister E, Schewe T, et al. Flavanol-rich cocoa drink lowers plasma F(2)-isoprostane concentrations in humans. *Free Radic Biol Med.* 2004;37:411–21.
121. Droke EA, Hager KA, Lerner MR, Lightfoot SA, Stoecker BJ, Brackett DJ, et al. Soy isoflavone averts chronic inflammation-induced bone loss and vascular disease. *J Inflamm* 2007;4:17.
122. Lotito SB, Frei B. Dietary flavonoids attenuate tumor necrosis factor alpha-induced adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells. Structure–function relationships and activity after pass metabolism. *J Biol Chem.* 2006;281:37102–10.
123. Chacko BK, Chandler RT, D’Alessandro TL, Mundhekar A, Khoo NKH, Botting N, et al. Anti-inflammatory effects of isoflavones are dependent on flow and human endothelial cell PPAR-gamma. *J Nutr.* 2007;137:351–6.
124. Osiecki H. The role of chronic inflammation in cardiovascular disease and its regulation by nutrients. *Altern Med Rev.* 2004;9:32–53.
125. Chesterman CN. Vascular endothelium haemostasis and thrombosis. *Blood Rev* 1988; 2:88-94.
126. Esmon CT. Protein C pathway in sepsis. *Ann Med* 2002; 34: 598-605.

127. Conti R, Farkouh ME, Badimon JJ. The vulnerable plaque and acute coronary syndromes. *Am. J. Med.* 2002; 113: 668-680.
128. Ott I. Tissue factor in acute coronary syndromes. *Semin Vasc Med* 2003;3: 185-192.
129. Spronk HMH, van der Voort D, ten Cate H. Blood coagulation and the risk of atherothrombosis: A complex relationship. *Thromb J.* 2004; 2: 12-21.
130. Chiu B. Multiple infections in carotid atherosclerotic plaques. *Am Heart J.* 1999; 138 (Part 2): S534-S536.
131. Herzberg MC, Brintzenhofe KL, Clawson CC. Aggregation of human platelets and adhesion of *Streptococcus sanguis*. *Infect. Immun.* 1983, 39: 1457-1469.
132. Sullam PM, Jarvis GA, Valone FH. Role of immunoglobulin G in platelet aggregation by viridans group streptococci. *Infect. Immun.* 1988; 56: 2907-2911.
133. Paffen E, Vos HL, Bertina RM. C-reactive protein does not directly induce tissue factor in human monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 975-981.
134. Mao s, Maeno N, Yoshiie K, Matayoshi S, Fujimura T, Oda H. CD-14-mediated induction of interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 by a heat-resistant constituent of *Porphyromonas gingivalis* in endothelial cells. *Scand J Immunol* 2002; 56: 484-491.
135. Marsik C, Quehenberger P, Mackman N, Osterud B, Luther T, Jilma b. Validation of a novel tissue factor assay in experimental human endotoxemia. *Thromb Res* 2003; 111:311-315.
136. Levi M, Dorffler-Melly J, Reitsma R. Aggravation of endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation and cytokine activation in heterozygous protein-C-deficient mice. *Blood* 2003; 101:4823-4827.
137. Mirlashari MR, Hagberg IA, Lyberg T. Platelet-platelet and platelet-leukocyte interactions induced by outer membrane vesicles from *N. meningitidis*. *Platelets* 2002; 13: 91-99.
138. Montrucchio G, Bosco O, Del Sorbo L. Mechanisms of the priming effect of low doses of lipopolysaccharides on leukocyte-dependent platelet aggregation in whole blood. *Thromb Haemost* 2003; 90: 872-881.

139. Chang YC, Li PC, Chen BC, Chang MS, Wang JL, Chiu WT, Lin CH. Lipoteichoic acid-induced nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages is mediated by cyclooxygenase-2, prostaglandin E2, protein kinase A, p38 MAPK and nuclear factor-kappa. *Cell Signal* 2006; 18 (8): 1235-1243.
140. Kim YJ, Choi SE, Lee MW, Lee CS. Taxifolin glycoside inhibits dendritic cell responses stimulated by lipopolysaccharide and lipoteichoic acid. *J. Pharm. Pharmacol.* 2008; 60 (11): 1465-1472.
141. Huang GC, Chow JM, Shen SC, Yang LY, Lin CW, Chen YC. Wogonin but not nor-wogonin inhibits lipopolysaccharide and lipoteichoic acid-induced iNOS gene expression and NO production in macrophages. *Int. Immunopharmacol.* 2007; 7(8):1054-1063.