



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO



**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

EFFECTO DE LOS FLAVONOIDES EN LA  
INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE  
*Enterococcus faecalis*.

**T E S I N A**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**C I R U J A N A   D E N T I S T A**

P R E S E N T A:

AIZU VILLANUEVA LOZANO

TUTORA: Dra. GLORIA GUTIÉRREZ VENEGAS

MÉXICO, Cd. Mx.

2016



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.

## DEDICATORIA

A Dios, mi padre, maestro y guía a lo largo de mi vida.

A mi madre, pilar de mi vida, por su amor incondicional, el esfuerzo a lo largo de muchos años e ilusiones compartidas.

A mi hermano, por su paciencia, ternura y abrazos en todo momento.

A Urbano, que me ha regalado su tiempo para escuchar mis inquietudes y proporcionarme consejos desinteresados.

A mi abuelito, por creer en mí.

A mis amigos y amigas, por su apoyo, entusiasmo y sinceridad.

A Juan Arturo Gómez Mora, por su asesoría en las técnicas de microbiología que se manejan en el laboratorio de Bioquímica y por hacerme el tiempo muy ameno.

A Martín Mizaél Cruz Aranda por su asesoría en el área de Bioquímica y contagiarme su entusiasmo por la investigación.

A mis compañeros y nuevos amigos del Laboratorio de Bioquímica: Therese Aubry, Alejandra, Mónica, Mariana, Ricardo, Stépane, Berenice y Marisol, por compartirme sus conocimientos y experiencia.

A la señora Lourdes Palma (Lulu) y al señor José Antonio González (Toño), por su apoyo en el laboratorio.

A mis familiares y amigos todo mi agradecimiento por apoyarme y ser parte del desarrollo de mi carrera profesional.



## AGRADECIMIENTOS

Mi gratitud a la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme abierto las puertas para poder desarrollarme profesionalmente y brindarme todos los recursos humanos y materiales para enamorarme de mi futura profesión.

Agradezco al laboratorio de Bioquímica de Posgrado de la Facultad de Odontología el haberme brindado todos los recursos materiales para poder desarrollar nuevo conocimiento científico y transformar las ideas en hechos.

Mi más extenso agradecimiento va dirigido principalmente a la Dra. Gloria Gutiérrez Venegas, por su colaboración en el desarrollo de esta tesina, quien con su experiencia y conocimientos me ha orientado en la vinculación de las disciplinas básicas con el área odontológica. Sin su apoyo no habría sido posible realizar este trabajo.



## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	3
2.1 <i>Enterococcus faecalis</i> .....	3
2.2 Morfología e identificación .....	3
2.3 Estructura antigénica .....	4
2.4 Hábitat.....	4
2.5 Factores de virulencia .....	5
2.5.1 Sustancia de agregación.....	5
2.5.2 Adhesinas o proteínas de superficie .....	6
2.5.3 Ácido lipoteicoico.....	7
2.5.4 Superóxido extracelular .....	8
2.6 Formación de biofilm .....	8
2.6.1 Biofilm oral.....	9
2.6.2 Biofilm en dispositivos médicos.....	11
2.7 Epidemiología.....	11
2.8 Infecciones asociadas.....	11
2.8.1 Endocarditis .....	12
2.8.2 Bacteremia .....	12
2.8.3 Infección del tracto urinario .....	13
2.8.4 Infecciones neonatales y pediátricas .....	13
2.9 Medios de cultivo para <i>Enterococcus</i> .....	13
2.10 Resistencia a antibióticos.....	14
2.10.1 Resistencia a $\beta$ -lactámicos .....	14
2.10.2 Resistencia a aminoglucósidos.....	15
2.10.3 Resistencia a glucopéptidos.....	15
2.10.4 Resistencia a macrólidos, lincosamidas .....	16
2.11 Flavonoides .....	17
2.11.1 Estructura.....	17
2.11.2 Clasificación.....	18
2.11.3 Actividad bactericida.....	20



2.12 Efecto de flavonoides y <i>Enterococcus faecalis</i> .....	21
2.12.1 Quercetina .....	21
2.12.2 Morina.....	22
2.12.3 Naringina.....	22
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>23</b>
<b>4. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>24</b>
<b>5. OBJETIVOS .....</b>	<b>24</b>
5.1 General.....	24
5.2 Específicos.....	24
<b>6. MATERIAL Y MÉTODO .....</b>	<b>25</b>
6.1 Medios de cultivo.....	25
6.1.1 Agar BHI .....	25
6.1.2 Caldo BHI.....	25
6.1.3 Agar sangre + Hemina y Vitamina K.....	26
6.1.4 TSB.....	26
6.2 Preparación de flavonoides .....	27
6.2.1 Quercetina .....	27
6.2.2 Morina.....	27
6.2.3 Naringina.....	27
6.2.4 Quercetina + Morina (Q+M) .....	27
6.2.5 Quercetina + Naringina (Q+N) .....	27
6.3 Preparación de cultivo puro o aislamiento primario .....	28
6.4 Preparación de la solución stock.....	28
6.5 Método de Kirby-Bauer.....	29
6.5.1 Siembra de la muestra .....	29
6.6 Macrodilución y conteo bacteriano .....	30
6.7 Curso temporal para la formación de biofilm.....	30
6.8 Ensayo de viabilidad celular.....	31
6.9 Tipo de estudio .....	32
6.10 Población de estudio y muestra.....	32
6.11 Criterios de inclusión.....	33
6.12 Criterios de exclusión.....	33



6.13 Variables de estudio.....	34
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>
7.1 Efecto de los flavonoides en el crecimiento de <i>E. faecalis</i> . ....	35
7.2 Curso temporal para la formación de biofilm sin sacarosa. ....	36
7.3 Curso temporal para la formación de biofilm con sacarosa. ....	37
7.4 Efecto de safranina y cristal violeta sobre la formación del biofilm de <i>E. faecalis</i> . .....	39
7.5 Curso temporal para la formación de biofilm de acuerdo al pH. ....	40
7.6 Acción de flavonoides sobre el biofilm de <i>E. faecalis</i> . ....	40
7.7 Viabilidad celular (Ensayo MTT).....	41
<b>8. DISCUSIÓN .....</b>	<b>44</b>
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>47</b>
<b>10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>48</b>



## ABREVIATURAS

Ácido desoxirribonucleico	ADN
Agar Man, Rogosa y Sharpe	Agar M.R.S.
Ácido ribonucleico	ARN
Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil) -2,5-difeniltetrazólico	MTTT
Buffer fosfato salino	PBS
Caldo Cerebro – Corazón	Caldo BHI
Caldo Glicerol Glicose Azida Tampondo	BAGG
Caldo tripticasa soya	TSB
Cloruro de sodio	NaCl
Dimetil sulfóxido	DMSO
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
<i>Enterococcus resistentes a glucopeptidos</i>	ERG
<i>Enterococcus resistentes a vancomicina</i>	VRE
<i>Eritromicina Ribosomal Metilasa</i>	ERM
Infección del tracto urinario	ITU
L-pirrolidonil-b-naftilamida	PYR
Proteína Asociada a la Superficie	BAP
Proteína de la superficie extracelular	ESP
Peróxido de hidrógeno	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Proteína de Unión al Colágeno	ACE
Proteína de Unión a Penicilina	PBP-5
Sistema de conductos radiculares	SCR
Tracto gastrointestinal	TGI
Tracto genitourinario	TGU





## RESUMEN

La creciente resistencia adquirida a los antimicrobianos son características que complican el manejo adecuado de las infecciones producidas por diferentes grupos de bacterias. Esto ha propiciado la búsqueda de nuevos antimicrobianos que puedan ser eficaces ante determinados patógenos. Los flavonoides, son compuestos fenólicos que se encuentran en vegetales, semillas, frutas y bebidas como vino o cerveza, los cuales han comprobado tener efectos antivirales, antibacterianos, antiinflamatorios, entre otros. El presente trabajo tiene como objetivo determinar la efectividad antimicrobiana de los flavonoides (Quercetina, Morina y Naringina y la mezcla de Quercetina con Morina y Quercetina con Naringina) en la inhibición del crecimiento de *Enterococcus faecalis*. Se realizó un estudio *in vitro* mediante la prueba de Kirby Bauer y formación de biopelículas (“biofilm”). Nuestros resultados mostraron halos de inhibición de entre 10mm y 0.8 mm. La combinación de quercetina con naringina (50 y 50 µg/mL) disminuyó la formación de biofilm. Se comprobó que los flavonoides inhibieron adecuadamente el crecimiento bacteriano y su acción bactericida. En conclusión, quercetina, morina y naringina, así como la combinación de estos flavonoides, presentan actividad antimicrobiana sobre *Enterococcus faecalis*. Por este motivo, pueden ser una alternativa en el tratamiento contra infecciones ocasionadas por el microorganismo antes mencionado.

**Palabras clave:** *Enterococcus faecalis*, Flavonoides, Prueba de Kirby-Bauer.

## 1. INTRODUCCIÓN

En los últimos cien años, el avance en el conocimiento y el desarrollo de técnicas bioquímicas y moleculares han progresado de forma exponencial y más que en el resto de la historia de la humanidad. Los avances científicos nos han permitido hacer uso del conocimiento generado para paliar diversas problemáticas que se presentan en las distintas áreas de las que participa el ser humano.

Sin embargo, uno de los problemas que actualmente se presenta con una alta prevalencia, es la diseminación cada vez mayor de la resistencia al tratamiento con antibióticos entre bacterias de importancia clínica. Debido a la complejidad de los diversos mecanismos de resistencia en las bacterias, se ve limitado el tratamiento idóneo ante determinadas infecciones.

Así el amplio espectro de resistencia a los fármacos representa un reto terapéutico que deja pocas posibilidades para el tratamiento de diversas infecciones.<sup>1</sup> Se entiende por resistencia, el mecanismo mediante el cual la bacteria puede disminuir la acción de los agentes antimicrobianos<sup>2</sup>.

La patogenicidad de los *Enterococcus faecalis* ha adquirido mayor trascendencia en los años más recientes debido a que ha evidenciado que hay una plena tolerancia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos y quinolónicos. En respuesta a ello, los equipos de salud se han visto obligados a darle un continuo empleo terapéutico a la vancomicina o glucopéptido al cual sólo se recurre para combatir los casos especiales de resistencia.<sup>3</sup>

Consecuentemente, hoy en día existen reportes sobre los VRE (*Vancomycin Resistant Enterococcus*).<sup>4</sup> Esta mayor resistencia bacteriana ha promovido la aplicación de recursos naturales como los *flavonoides*, que son sustancias



de bajo peso molecular producidas por casi todas las plantas vasculares. Esta gran familia de compuestos ha estado presente en la naturaleza durante más de mil millones de años, de manera que han actuado recíprocamente con el desarrollo de muchos organismos debido a que actúan como promotores de mecanismos de polinización y en la protección de las plantas a los rayos ultravioleta.

Intervienen en la asociación entre las plantas productoras de flavonoides y las diversas especies animales, ya que por la amplia gama de actividades bioquímicas y farmacológicas que poseen estos productos ejercen en el hombre y/o mamíferos beneficios los que se dan como resultado de la coexistencia o co-evolución de ambos reinos.

Estos compuestos fueron descubiertos por el premio Nobel Szent-György, quien en 1930 aisló de la cáscara del limón una sustancia, la que denominó citrina, que regulaba la permeabilidad de los capilares. Los flavonoides se denominaron en un principio vitamina P (por permeabilidad) y también vitamina C2 (porque se comprobó que algunos flavonoides tenían propiedades similares a la vitamina C2). Sin embargo, el hecho de que los flavonoides fueran vitaminas no pudo ser confirmado, y ambas denominaciones se abandonaron alrededor de 1950.<sup>5</sup>

Así mismo, se ha encontrado que en las plantas algunos compuestos entre los que se encuentran los flavonoides confieren resistencia contra la fotooxidación de la luz ultravioleta del sol, intervienen en el transporte de hormonas y algunos funcionan como defensa ante los depredadores. Desde el siglo pasado es bien conocida la relación que existe entre la presencia de flavonoides en las plantas y su resistencia a las infecciones fúngicas y virales. Otra de sus importantes funciones en muchas plantas es la atracción de los insectos polinizadores por medio del color o del olor que les confieren a éstas o a sus flores asegurando así su reproducción y conservación.<sup>6</sup>



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 *Enterococcus faecalis*

El término “*Enterococcus*” fue utilizado por Thiercelin en 1899 para referirse a unos diplococos Gram positivos, catalasa negativos y anaerobios facultativos, el nombre se propuso para destacar su origen intestinal.<sup>7</sup>

A partir de 1933 los *Enterococcus* se incluían dentro de los *Streptococcus* grupo D, según el sistema de Lancefield. Esta clasificación de Lancefield y la sugerida por Sherman en 1937 separaron a los estreptococos en cuatro categorías: piogénicos, viridans, lácticos y enterococcus, lo cual fue válido hasta que a través de métodos moleculares de hibridación DNA-DNA y DNA-rRNA se propuso la transferencia de los *Enterococcus* a otro género.<sup>8</sup>

### 2.2 Morfología e identificación

*Enterococcus* son células esféricas u ovoides que miden de 0,6 a 2,0 x 0,6 a 2,5  $\mu\text{m}$ ; son cocos Gram positivos que aparecen en par o en cadenas cortas en medio líquido; son no capsulados, no forman endosporas; son anaerobios facultativos; poseen requerimientos nutricionales complejos; son catalasa negativa, aunque algunas cepas de *E. faecalis* pueden ser positivas debido a la producción de una pseudocatalasa cuando crecen en medios que contienen sangre. Raras cepas son móviles por la presencia de flagelos. Fermentan una amplia variedad de carbohidratos con elaboración de ácido láctico sin producción de gas; la temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C.<sup>9</sup>

Dentro de la familia *Streptococcaceae* constituyen los agentes más resistentes a la desecación y a los desinfectantes. Toleran altas condiciones de pH: 9,6; crecen en NaCl al 6.5%, y en temperaturas de 10 a 45°C, e incluso algunos pueden vivir 30 minutos a temperaturas de 60°C. Los *Enterococos* hidrolizan esculina en la bilis, así como la L-pirrolidonil- $\beta$ -naftilamida (PYR).<sup>9</sup>



Usualmente fermentan la lactosa; rara vez reducen nitratos. El contenido de G + C del ADN es de 37 a 45 mol%. Producen, por lo general,  $\alpha$  o  $\gamma$  hemólisis, excepto algunas especies que pueden mostrar  $\beta$ -hemólisis, como: *E. faecalis*, *E. durans* y *E. gallinarum*.<sup>9</sup>

El nuevo género *Enterococcus* incorpora a las especies: *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. malodoratus*, *E. gallinarum*, *E. hirae*, *E. mundtii*, *E. raffinosus*, *E. solitarius* y *E. pseudoavium*.<sup>8</sup>

### 2.3 Estructura antigénica

A diferencia de otros estreptococos, el antígeno grupo D no es un carbohidrato de pared celular. Está formado por ácido lipoteicoico asociado a la membrana citoplásmica; es un poliglicerol fosfato que contiene D-alanina y glucosa. Existen variaciones en la estructura del peptidoglucano entre las diferentes especies del grupo; *E. faecalis* contiene solamente ácido glutámico, lisina y alanina, mientras que *E. faecium* y *E. durans* también contienen ácido aspártico.<sup>9</sup>

Se han reportado tres proteínas de superficies de diferentes pesos moleculares como antígenos prominentes de *E. faecalis*, las cuales parecen ser específicas de éste. Anticuerpos frente a estos antígenos han sido encontrados en pacientes con endocarditis por *E. faecalis*, pero no en aquellas causadas por otros estreptococos o en distintas infecciones producidas por el mismo.<sup>9</sup>

### 2.4 Hábitat

Los *Enterococcus* son comensales, se encuentran aproximadamente en todos los animales. En el humano, son flora normal del tracto gastrointestinal (TGI), tracto genitourinario (TGU), vías respiratorias superiores, cavidad oral,



piel, vagina y uretra femenina. También se hallan en las superficies del entorno ambiental, en el agua, en la vegetación, resultado de la contaminación por excrementos de animales y en aguas albañales no tratadas. En el humano, la concentración del enterococo en las heces es de  $10^8$  UFC/g. Los factores microbiológicos y ecológicos que favorecen la colonización intestinal permanecen aún oscuros.<sup>9</sup>

No causan enfermedades en el hábitat intestinal; sin embargo, en algunas ocasiones la relación de comensalismo establecida con el hospedero se rompe y provocan enfermedades.<sup>10</sup>

## 2.5 Factores de virulencia

### 2.5.1 Sustancia de agregación

La sustancia de agregación es una adhesina bacteriana plásmido-codificada receptiva a las feromonas que media el contacto eficiente entre el donador y la bacteria receptora; ésta sustancia convierte la superficie de la bacteria donadora en una superficie adherente potencial para las células receptoras, causando agregación o agrupación y a su vez facilitando el intercambio de plásmidos.<sup>11, 10</sup>

La sustancia de agregación puede servir como determinante de virulencia a *E. faecalis* en, al menos, cuatro formas:

1. Juega un papel importante en la diseminación de los factores de virulencia codificados por plásmidos, como la citolisina enterocócica y determinadas resistencias antibióticas, entre las especies.
2. Esta sustancia de agregación facilita la adherencia de *E. faecalis* a las células epiteliales renales e intestinales, y a la colonización de estas superficies.
3. Protege al microorganismo contra los leucocitos polimorfonucleares y de la lisis mediada por macrófagos. El mecanismo para esta



protección puede deberse a una modificación de la maduración fagosomal.

4. La sustancia de agregación y las citolisinas tienen acciones sinérgicas, lo cual aumenta la virulencia; esto resulta en daño tisular e invasión tisular profunda.<sup>12</sup>

#### 2.5.2 Adhesinas o proteínas de superficie

*E. faecalis* presenta en su pared celular numerosas proteínas de superficie. Las más importantes son la proteína de superficie (ESP) y la ACE, ambas relacionadas con la formación de biopelículas y con la adherencia del microorganismo a las proteínas de la matriz extracelular y al colágeno tipo I y IV.

En el 2001, Toledo-Arana et al<sup>13</sup>, realizaron un estudio donde evaluaron la acción de la proteína de superficie Esp en diferentes cepas aisladas de *E. faecalis* y analizaron los efectos producidos en los diferentes pasos de formación de la biopelícula a niveles microscópicos y macroscópicos. A su vez, compararon la proteína asociada a la superficie (BAP), cuyo nombre proviene de Biofilm Associated Protein, que se encuentra en la pared celular de *S. aureus* con la Esp de *E. faecalis*, en cuanto a su influencia en la formación de biopelículas. Esta proteína Bap, en un estudio previo de los mismos investigadores, demostró ser una pieza fundamental en la formación de biopelículas por parte de este microorganismo.

En una investigación realizada por Nallapareddy et al<sup>14</sup>, se evaluó la capacidad de mediar la adhesión de la proteína de superficie Ace de *E. faecalis* a las proteínas de la matriz extracelular como el colágeno tipo IV y la Laminina.

Ellos utilizaron cepas de *E. faecalis* mutadas y evidenciaron que la proteína de superficie Ace si interviene en la adhesión de la cepa OG1RF de *E.*



*faecalis* al colágeno tipo IV y a la Laminina, así como también al colágeno tipo I. <sup>14</sup>

Igualmente, Hubble et al<sup>15</sup>, realizaron un estudio donde evaluaron la pérdida de adhesión de las cepas de *E. faecalis* a la dentina radicular cuando era mutada la proteína de superficie Ace. Ellos señalan que la dentina de los conductos radiculares está constituida por colágeno y por otras proteínas, por lo tanto, debe existir una participación importante de esta proteína de superficie en la adhesión bacteriana, y a su vez, en la colonización del SCR. Sus resultados sugieren que la adherencia de la cepa de *E. faecalis* no mutada (OG1RF) fue significativamente mayor que la adhesión de las otras tres cepas de *E. faecalis* mutadas, por lo que se confirma la participación importante de la proteína de superficie Ace en la adhesión de *E. faecalis* en la dentina.

### 2.5.3 Ácido lipoteicoico

Los ácidos lipoteicoicos son un grupo de moléculas o polímeros anfipáticos íntimamente relacionados y asociados con la pared celular, que están constituidos por una columna central de poliglicerolfosfato unida covalentemente a una porción glicolipídica hidrofóbica. <sup>10, 11</sup>

Ehrenfeld et al<sup>16</sup>, señalan que los ácidos lipoteicoicos han sido considerados como un componente de la sustancia vinculante de *E. faecalis*, los cuales actúan como un receptor en la célula receptora para la sustancia de agregación producida por la célula donadora. Esta conclusión proviene de experimentos donde ácidos lipoteicoicos libres aislados de *E. faecalis* inhiben grupos celulares inducidos por feromonas actuando como un inhibidor competitivo de la sustancia vinculante celular.





#### 2.5.4 Superóxido extracelular

Los aniones superóxidos son radicales de oxígeno altamente reactivos relacionados con el daño tisular y celular en una gran variedad de desórdenes, incluyendo las enfermedades inflamatorias. <sup>11</sup>

Huycke et al <sup>17</sup>, señalan que *E. faecalis* produce superóxido extracelular sustancial y especies derivadas del oxígeno reactivo como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y radicales hidroxilos. Ellos evaluaron el daño producido por *E. faecalis* sobre el ADN de las células eucariotas, y observaron que las cepas de microorganismo donde hubo presencia de superóxido extracelular produjeron mayor daño sobre el ADN que aquellas cepas mutadas. Estos hallazgos sugieren que la producción de radicales libres extracelulares por parte de *E. faecalis* promueve la inestabilidad cromosomal y el daño causado en el ADN.

Las adhesinas enterocócicas, que corresponden a proteínas, ácidos lipoteicoicos de la pared celular y uno o más carbohidratos superficiales, facilitan la adhesión a las mucosas del huésped así el microorganismo puede invadir otras regiones anatómicas cercanas e ingresar al sistema linfático o a la circulación sanguínea, lo que provoca diversas alteraciones patológicas.

Los *Enterococcus* más virulentos colonizan inicialmente las células entéricas y, algunos días más tarde, suelen translocarse desde el lumen del intestino delgado hasta los nódulos linfáticos, el hígado y el bazo, después de haber sido englobados por las células del íleon y colon, o bien, por macrófagos intestinales, lo que en cualquier caso favorece que atraviesen la pared intestinal y alcancen las vías linfáticas.

#### 2.6 Formación de biofilm

Un biofilm se define como “una comunidad microbiana sésil, caracterizada por células adheridas irreversiblemente a un sustrato o interfase, o unas con



otras, encerradas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares que ellas mismas han producido, exhibiendo un fenotipo alterado en relación con la tasa de crecimiento y transcripción genética".<sup>18</sup>

#### 2.6.1 Biofilm oral

George et. al.<sup>19</sup>, evaluaron la influencia de distintas condiciones ambientales y nutricionales en las características de las biopelículas formadas por *E. faecalis* en el Sistema de Conductos Radiculares y su penetración dentro de los túbulos dentinarios. Las condiciones ambientales estudiadas fueron medios ambientes aerobios y anaerobios ricos y pobres en nutrientes.

Bajo el microscopio electrónico de barrido se pudo evidenciar la formación de distintos tipos de biopelículas dependiendo del tipo de medio ambiente y nutrición. Cuando *E. faecalis* creció en un medio ambiente aeróbico y rico en nutrientes, se pudo observar formación de biopelículas y penetración profunda de los microorganismos dentro de los túbulos dentinarios. Cuando creció bajo condiciones anaeróbicas y ricas en nutrientes, se pudo observar la formación de una biopelícula con forma característica de "hongo", con canales de fluidos a su alrededor.<sup>19</sup>

Por el contrario, cuando las condiciones fueron aeróbicas, pero con bajo nivel de nutrientes, no hubo formación de biopelícula en forma de hongos, sino que se pudieron evidenciar crecimientos discontinuos de grupos celulares adheridos. En este grupo experimental no se observó ninguna bacteria dentro de los túbulos dentinarios, lo que resultaba en una morfología dentinaria superficial irregular. En el grupo donde las condiciones eran anaeróbicas, sí se pudo observar la formación de biopelículas con células bacterianas adheridas a la superficie de la pared dentinaria del conducto radicular.<sup>19</sup>

*Enterococcus faecalis* es el más común y a veces, la única bacteria aislada de los conductos radiculares en periodontitis apicales persistentes. Su



inherente resistencia antimicrobiana, su habilidad para adaptarse a los cambios en el entorno y su crecimiento dentro de los conductos radiculares como biofilm, lo hacen responsable de la mayoría de los fracasos endodónticos.<sup>20</sup>

Algunas investigaciones han reportado la presencia de biopelículas (biofilms) de *E. faecalis* en el sistema de conductos de dientes monorradiculares extraídos y que habían sido obturados con cemento a base de hidróxido de calcio<sup>21</sup>. La formación de la biopelícula constituye una evidencia contundente de que *E. faecalis* puede colonizar los conductos radiculares medicados.<sup>22, 23, 24</sup>

Cuando esta especie crece en las biopelículas, puede ser hasta mil veces más resistente a la acción de los antimicrobianos que cuando se halla como bacteria planctónica (suspendida en un medio líquido y no adherida a ninguna superficie<sup>25</sup>. Si la formación de biopelículas que contienen *E. faecalis* ocurre in vivo, ello pudiera considerarse como un mecanismo que permite a este microorganismo resistir al tratamiento antimicrobiano<sup>21</sup>.

También se han realizado otras investigaciones dirigidas a aclarar el papel que juegan los factores de virulencia de *E. faecalis* en la colonización por parte de esta bacteria en un medio tan pobre en nutrientes como el conducto radicular medicado. La adhesión a la superficie de la dentina constituye un paso esencial que determina el potencial patógeno de este microorganismo en el conducto radicular medicado<sup>15, 26</sup>.

Puesto que la dentina contiene colágeno y otras proteínas, se sugiere que las proteasas sintetizadas por *E. faecalis*, así como la proteína de unión al colágeno (Ace) pudieran participar o por lo menos influir en la adhesión bacteriana, y por lo tanto permitir que la bacteria colonice el conducto radicular<sup>15</sup>.



### 2.6.2 Biofilm en dispositivos médicos

*E. faecalis* asociados como biopelículas se adhieren irreversiblemente a superficies sumergidas y producen polímeros extracelulares que pueden desarrollarse en dispositivos médicos: lentes de contacto, catéteres venosos, conectores, tubos endotraqueales, dispositivos intrauterinos, válvulas cardíacas, marcapasos, catéteres de diálisis, prótesis de cadera, prótesis de voz, etcétera. Este hecho puede causar infecciones y enfermedades nosocomiales con costo elevado para la salud pública.<sup>27</sup>

### 2.7 Epidemiología

El National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) reporta el género *enterococcus*, como la tercera causa de infecciones nosocomiales<sup>28, 29</sup>; mientras América Latina (SENTRY) reporta la infección por enterococo en el octavo lugar como causa de bacteriemia y, en el cuarto, como causa de infección urinaria y heridas quirúrgicas.<sup>30</sup>

Se plantea que es responsable de infecciones nosocomiales<sup>29, 8</sup>:

- 16 % de las infecciones urinarias intrahospitalarias.
- 12 % de las infecciones de heridas quirúrgicas.
- 9 % de las bacteriemias nosocomiales.
- 15 % de los aislamientos sanguíneos de enterococos en EE.UU. son resistentes a vancomicina, siendo más común en *E.faecium* (50%) que en *E.faecalis* (5%).

### 2.8 Infecciones asociadas

Los enterococos provocan una variedad de síndromes infecciosos graves y de difícil tratamiento en el ser humano entre los que se incluyen endocarditis,



bacteremia, infecciones urinarias, infecciones neonatales, infecciones del sistema nervioso central e infecciones nosocomiales.

### 2.8.1 Endocarditis

La endocarditis infecciosa corresponde a la infección de una o más válvulas cardíacas, lo cual en dos terceras partes de los casos es posterior a ciertas patologías cardiovasculares preexistentes. Además, durante la edad pediátrica, la localización inicial del cuadro implica a alguna válvula anormal o a otros defectos congénitos del endocardio en tanto que, en los adultos –en quienes el padecimiento es aún más frecuente–, la patología afecta a las válvulas que manifiestan fibrosis, o bien, a las pertenecientes a individuos con antecedentes de fiebre reumática.<sup>31</sup>

Los enterococos también ocupan el tercer lugar como agentes etiológicos de endocarditis, afección que predomina en el sexo masculino; de hecho, su frecuencia hombre/mujer es de 2:1 y la edad promedio rebasa los 60 años.<sup>31</sup>

La secuencia patogénica inicia con un episodio bacterémico, al ingresar el microorganismo a la sangre debido a afecciones cutáneas, manipulaciones dentales, intervenciones quirúrgicas en la rinofaringe, exploraciones endoscópicas de las vías genitourinarias o abscesos pulmonares.<sup>31</sup>

### 2.8.2 Bacteremia

Es fundamentalmente una infección nosocomial que afecta a pacientes con graves enfermedades subyacentes sometidos a procedimientos invasivos y tratamientos antibióticos previos de amplio espectro.

Las bacterias del género *Enterococcus* han adquirido un papel relevante en las dos últimas décadas, principalmente debido al aumento del número de casos intrahospitalarios<sup>32</sup>, representando en la actualidad la tercera causa de infección nosocomial<sup>8</sup>. La incidencia anual aproximada de bacteriemia por *Enterococcus faecalis* es de uno a dos episodios por cada 1.000 pacientes hospitalizados. Su prevalencia como patógeno nosocomial ha aumentado



debido a la selección de estos microorganismos en relación con el uso de antibióticos de amplio espectro sin actividad frente a *enterococcus*, al incremento de procedimientos terapéuticos y de monitorización invasivos en pacientes graves y al aumento del número de pacientes inmunocomprometidos, fundamentalmente neutropénicos.<sup>33</sup>

### 2.8.3 Infección del tracto urinario

Los enterococos son causa frecuente de ITU, especialmente, en los pacientes hospitalizados; las manifestaciones clínicas son indistinguibles de las provocadas por otros microorganismos<sup>28, 34</sup>.

La incidencia de ITU por *enterococcus* aumenta en: pacientes hombres mayores que han sido sometidos a cateterización urinaria o algún tipo de instrumentación de las vías urinarias, que tienen enfermedades del tracto urinario, o que recibieron antibióticos.

### 2.8.4 Infecciones neonatales y pediátricas

Los *enterococcus* son responsables de más de 10% de sepsis neonatal y meningitis séptica en niños. Estas infecciones han sido asociadas con:

- Bajo peso al nacer.
- Dispositivos intravenosos centrales.
- Resección intestinal.

Múltiples reportes publicados en relación con brotes epidémicos por ERV tienen como fuente, áreas de neonatología y oncología pediátrica<sup>35</sup>.

## 2.9 Medios de cultivo para *Enterococcus*

Existe una diversidad de medios para el examen de *Enterococcus* en los que el crecimiento de estos microorganismos se ve favorecido por la presencia de peptonas, hidrolizados y extractos.<sup>36</sup>



La selección del tipo de medio a utilizar depende de la experiencia, así como también del tipo de muestra, el método de cultivo y del grado de contaminación de la muestra con otros organismos<sup>37</sup>. Entre los medios no selectivos para *Enterococcus* se pueden señalar el agar y el caldo cerebro corazón que son ampliamente utilizados para el cultivo y mantenimiento de *Enterococcus*, el caldo cerebro corazón con 6,5 % de cloruro de sodio, el agar triptona glucosa extracto, el agar y el caldo triptona soya, el agar MRS, el agar Rogosa, el agar M17, el caldo Elliker y el caldo Tood-Hewitt <sup>11, 36</sup>.

Medios como el agar sangre azida, el agar sangre azida con cristal violeta, el caldo azida de Rothey y el caldo citrato azida se emplean para la detección de *Enterococcus* en aguas y productos de desecho<sup>37</sup>. Se han desarrollado otros medios como son el caldo BAGG, el caldo azida púrpura de bromocresol, el agar y caldo confirmatorio para *Enterococcus* y el caldo presuntivo para *Enterococcus* que se utilizan en las pruebas presuntivas y confirmativas de calidad para *Enterococcus*<sup>11, 37</sup>.

## 2.10 Resistencia a antibióticos

La resistencia adquirida a los betalactámicos está causada por la modificación de las proteínas fijadoras de penicilina (especialmente la PBP-5) y por la producción de betalactamasas, siendo el primer mecanismo excepcional en *E. faecalis* <sup>38</sup>. La resistencia intrínseca a los aminoglucósidos es de bajo grado, mientras que la adquirida se debe a la producción de enzimas modificadoras de aminoglucósidos. Pero la mayor preocupación desde el año 1986 es la cada vez más frecuente aparición de cepas resistentes a los glucopéptidos (vancomicina), relacionada con el uso en Europa de avoparcina a dosis subterapéuticas en alimentos.<sup>39</sup>

### 2.10.1 Resistencia a $\beta$ -lactámicos

*Enterococcus* posee cierta resistencia natural intrínseca a los betalactámicos, que se debe a la baja afinidad de sus proteínas de unión a



penicilinas (PBP o *penicillin-binding proteins*) por estos antibióticos. La resistencia intrínseca a todas las cefalosporinas es de tal nivel que no se pueden utilizar para el tratamiento de pacientes con infecciones por enterococo<sup>40, 41</sup>.

De hecho, el uso de cefalosporinas puede conducir a sobreinfecciones por este microorganismo. Sin embargo, existe un efecto sinérgico de la ampicilina con algunas cefalosporinas (como la ceftriaxona) tanto in vitro como in vivo en cepas de *E.faecalis*<sup>42</sup>.

La resistencia de alto nivel a penicilinas se debe principalmente a la hiperproducción de la PBP5, que tiene una baja afinidad natural por las penicilinas y, además, capacidad para sustituir las funciones de las PBP sensibles a los beta-lactámicos, pero también a mutaciones en el gen *pbp5* que implican una todavía menor afinidad por las penicilinas<sup>43</sup>.

#### 2.10.2 Resistencia a aminoglucósidos

Así también, *Enterococcus* posee intrínsecamente una resistencia de bajo nivel a los aminoglucósidos por un transporte deficiente del aminoglucósido al interior de la bacteria, que se caracteriza por presentar valores de CMI que oscilan entre 4 y 64 mg/l de gentamicina y entre 16 y 256 mg/l de estreptomina, lo que hace que los aminoglucósidos no sean eficaces en monoterapia frente a los enterococos. Sin embargo, cuando se asocia un aminoglucósido con otro antibiótico que actúe en la pared celular, como un beta-lactámico o un glucopéptido, se produce un gran aumento de la captación del aminoglucósido, resultando en un efecto sinérgico bactericida necesario para el tratamiento de infecciones graves (bacteriemia, endocarditis y meningitis)<sup>8, 40</sup>.

#### 2.10.3 Resistencia a glucopéptidos

En Europa es frecuente la presencia de *enterococcus resistentes a glucopéptidos* (ERG) en animales de granja, alimentos y aguas residuales, y





como colonizadores en humanos sanos, pero es mucho menos frecuente en pacientes hospitalizados, aunque variable según los países <sup>44, 45</sup>.

Lo que probablemente haya sido debido al amplio uso que se hizo del glucopéptido avoparcina como promotor del crecimiento en animales de granja, hoy en día prohibido en Europa<sup>46, 47</sup>.

Los glucopéptidos actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular uniéndose a los precursores pentapeptídicos del peptidoglicano, impidiendo el entrecruzamiento de estos precursores, lo que conduce a la pérdida de integridad estructural de la pared bacteriana y a la muerte celular. El mecanismo bioquímico de resistencia a los glucopéptidos se basa en la modificación de la diana: el pentapéptido de la pared celular terminado en D-Ala-D-Ala cambia un aminoácido por otro diferente. El pentapéptido modificado puede contener D-Ala-D-lactato (D-Lac) o bien D-Ala-D-serina (D-Ser). Los residuos que contienen D-Ala-D-Lac tienen menor afinidad (1.000 veces menor) por la vancomicina que los que contienen D-Ala-D-Ala. Los residuos que contienen D-Ala-D-Ser tienen una afinidad 7 veces menor por la vancomicina que los residuos terminados en D-Ala-D-Ala. En las cepas de ERG esta capacidad para sintetizar y utilizar estos precursores alternativos puede ser constitutiva o inducible por los glucopéptidos. La expresión de estos fenotipos está codificada por múltiples y diferentes mecanismos genéticos<sup>48</sup>.

#### 2.10.4 Resistencia a macrólidos, lincosamidas

En los enterococos, el mecanismo de resistencia a los macrólidos más frecuente es la producción de una enzima que metila un residuo adenina en la subunidad 23S del ARN ribosómico, lo que se traduce en una reducción de la unión al ribosoma no solamente de la eritromicina y otros macrólidos (azitromicina y claritromicina), sino también de las lincosamidas. Este mecanismo está mediado generalmente por el gen *erm B* (*Erythromycin Ribosome Methylase*). <sup>40</sup>

## 2.11 Flavonoides

### 2.11.1 Estructura

Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis o el cáncer <sup>49</sup>.

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6'(fig. 1). Los flavonoides más activos son aquellos que tienen menos grupos hidroxilo libres. La actividad de los flavonoides como antioxidantes depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química<sup>50</sup>.

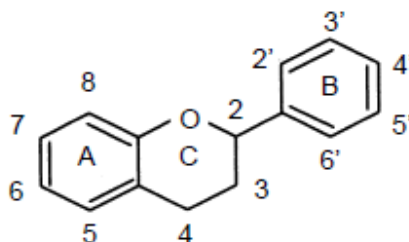
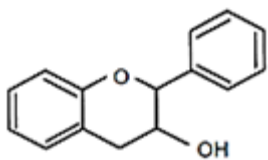
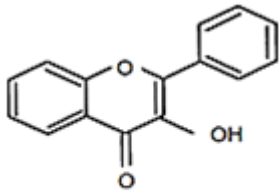
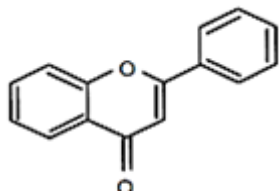
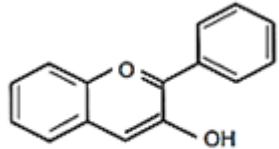


Figura 1. Estructura de Flavonoides. <sup>50</sup>

### 2.11.2 Clasificación

En función de sus características estructurales se pueden clasificar en (Tabla1):

**Tabla 1. Clasificación de acuerdo a la estructura de los flavonoides**

FLAVONOIDE	ESTRUCTURA QUÍMICA	
Flavanos	Como la catequina, con un grupo -OH en posición 3 del anillo C.	 Flavanol
Flavonoles	Representados por la quercetina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo-OH en posición 3 del anillo C.	 Flavonol
Flavonas	Como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3.	 Flavona
Antocianidinas	Tienen unido el grupo -OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.	 Antocianidina



Los flavonoides se encuentran en frutas, verduras, semillas y flores, así como en cerveza, vino, té verde, té negro y soja, los cuales son consumidos en la dieta humana de forma habitual y también pueden utilizarse en forma de suplementos nutricionales, junto con ciertas vitaminas y minerales. Los flavonoides se encuentran también en extractos de plantas como arándano, ginkgo biloba, cardo, mariano o crataegus. Desempeñan un papel importante en la biología vegetal; así, responden a la luz y controlan los niveles de las auxinas reguladoras del crecimiento y diferenciación de las plantas. Otras funciones incluyen un papel antifúngico y bactericida, confieren coloración, lo que puede contribuir a los fenómenos de polinización y tienen una importante capacidad para fijar metales como el hierro y el cobre<sup>51</sup>.

Se han identificado más de 5.000 flavonoides<sup>52</sup>, entre los que se pueden destacar:

- **Citroflavonoides:** quercitina, hesperidina, rutina, naranjina y limoneno. La quercitina es un flavonoide amarillo-verdoso presente en cebollas, manzanas, brócoles, cerezas, uvas o repollo rojo. La hesperidina se encuentra en los hollejos de las naranjas y limones. La naranjina da el sabor amargo a frutas como la naranja, limón y toronja, y el limoneno se ha aislado del limón y la lima.
- **Flavonoides de la soja o isoflavonoides:** están presentes en los alimentos con soja tales como porotos, tofu, leche, proteína vegetal texturizada, harina, miso. Los dos más conocidos son la *genisteína* y la *daidzeína*.
- **Proantocianidinas:** se localizan en las semillas de uva, vino tinto y extracto de corteza del pino marino.
- **Antocianidinas:** son pigmentos vegetales responsables de los colores rojo y rojo-azulado de las cerezas.



- **Ácido elágico:** es un flavonoide que se encuentra en frutas como la uva y en verduras.
- **Catequina:** el té verde y negro son buenas fuentes.
- **Kaemferol:** aparece en puerros, brócoles, rábano, endibias y remolacha roja.

### 2.11.3 Actividad bactericida

La actividad antimicrobiana de distintas especies de plantas ha sido relacionada con la presencia de flavonoides, terpenoides y taninos.

Los flavonoides tienen actividad antibacteriana, como crisina que ha demostrado actividad bacteriostática contra diferentes bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Otros flavonoides como luteolina y apigenina han mostrado efectividad contra bacterias Gram negativas como *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumonia*, *Proteus mirabilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, y *Proteus vulgaris*<sup>53</sup>. Además, los flavonoides poseen un comportamiento potencializador y sinérgico al combinarse con agentes antimicrobianos<sup>54</sup>. También, los flavonoides como miricetina o quercetina han demostrado su capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina y con miricetina se ha encontrado efectividad contra *Enterococcus resistentes a vancomicina*<sup>55</sup>.

Actúan como compuestos antimicrobianos de pequeño peso molecular o como metabolitos de estrés biológico. Inhiben la germinación de esporas de hongos y causan daño a los sistemas de membrana<sup>54</sup>.

## 2.12 Efecto de flavonoides y *Enterococcus faecalis*.

Diferentes estudios científicos realizados con extractos de *Combretum erythrophyllum* demostraron actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y se aislaron los compuestos activos por fraccionamiento bioguiado, que fueron los flavonoides: apigenina; genkwanina; 5-hidroxi-7, 4'-dimetoxiflavona, ramnocitrina, canferol; quercetina-5, 3'-dimetileter y ramnazina. Todos los flavonoides aislados demostraron tener buena actividad contra *Vibrio cholerae* y *Enterococcus faecalis*, con valores en el rango de 25-50  $\mu\text{g/ml}$ <sup>56</sup>.

### 2.12.1 Quercetina

Es un flavonol (Fig. 2), que se ha encontrado en las cebollas, tomates y miel<sup>57</sup>, ha demostrado tener una potente actividad antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Enterococcus faecalis*<sup>58</sup>.

Así mismo, Mirzoeva et al.<sup>59</sup>, demostraron que quercetina y naringenina incrementan la permeabilidad y disipan el potencial de la membrana bacteriana (fuerza motriz de protones), disminuyendo la resistencia bacteriana a los antibióticos. Estos flavonoides también inhibieron la motilidad bacteriana.

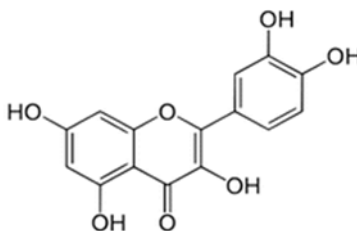


Figura 2. Estructura química de Quercetina.<sup>57</sup>

### 2.12.2 Morina

Es un flavonol (Fig.3) que se ha podido aislar de las hojas de la guayaba (*Psidium guajava*) y de la almendra, de color amarillo<sup>60</sup>. Se ha documentado su potencial antibacterial sobre diferentes bacterias Gram-positivas y Gram-negativas<sup>61, 62, 63</sup>.

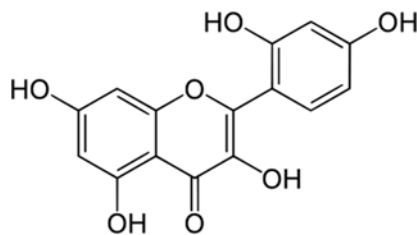


Figura 3. Estructura química de Morina (2',3,4,5,7-Pentahydroxyflavone).<sup>60</sup>

### 2.12.3 Naringina

Es una de los más comunes flavononas glicosiladas (Fig.4), encontradas en la cáscara de algunas frutas cítricas y se puede obtener de residuos de cítricos industrializados<sup>64</sup>. Aunque existen muchos artículos que reportan las propiedades benéficas de este componente en la salud humana, existen pocos artículos en los que específicamente se estudia las propiedades antibacterianas de naringina<sup>65</sup>. A pesar de esto se ha demostrado que naringina tiene actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas<sup>66</sup>.

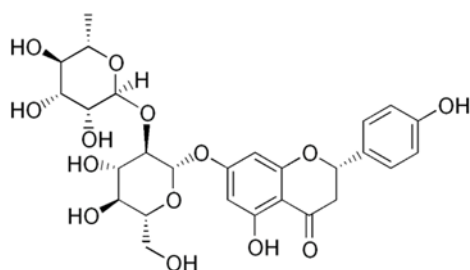


Figura 4. Estructura química de Naringina.<sup>64</sup>



### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

*Enterococcus faecalis* constituye un patógeno oportunista en pacientes ancianos e inmunocomprometidos, además los factores de virulencia que posee incrementan la patogenicidad de este microorganismo, por lo que constituye un serio peligro para la salud pues se ha convertido según la National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS), en la tercera causa más frecuente de infecciones nosocomiales.

Además, la ciencia de la microbiología bucal ha identificado numerosas especies de microorganismos que promueven el desarrollo de las infecciones endodónticas, bien sea primarias o persistentes, como *Enterococcus faecalis*, el cual es un microorganismo predominante en las infecciones endodónticas persistentes, capaz de sobrevivir en ambientes con poca cantidad de oxígeno y nutrientes, de formar biopelículas entre microorganismos de su misma especie o con otros microorganismos y de sobrevivir frente a distintos protocolos de medicación intraconducto.

Aunado a esto, los actuales *enterococcus* son resistentes a una gran cantidad de antibióticos:  $\beta$ -lactámicos, aminoglucosidos, macrólidos, quinolonas, tetraciclinas y vancomicina, éste último es un antibiótico que ha sido usado para tratar las infecciones causadas por cocos grampositivos, lo que ha generado crecientes tasas de mortalidad en pacientes hospitalizados.

Dicha resistencia a los antimicrobianos limita las opciones terapéuticas de las que puede hacer uso el odontólogo en pacientes inmunocomprometidos o ciertos casos donde una vez que el clínico ha terminado el tratamiento de conductos, la infección persiste y con el fin de evitar exacerbaciones o agudizaciones sistémicas a partir de infecciones en boca, hace uso de antimicrobianos poco efectivos.





Por este motivo ¿Los flavonoides pueden ser una alternativa terapéutica en las infecciones intrarradiculares? ¿Los flavonoides son capaces de inhibir el crecimiento de *Enterococcus faecalis*? ¿Qué tipo de flavonoides inhiben en mayor o menor proporción a *Enterococcus faecalis*?

#### 4. JUSTIFICACIÓN

El hecho de que el clínico no puede determinar la presencia de biofilms en un caso en particular, hace necesario encontrar nuevas sustancias antimicrobianas para el área Odontológica, que propicien un tratamiento eficaz ante infecciones generadas por *Enterococcus faecalis*, con el fin de que le permita al Cirujano Dentista resolver las afecciones de ésta índole que se le presenten en el ejercicio profesional, así como reestablecer la salud oral en el individuo que presenta la afección.

La evaluación in vitro de la acción de los flavonoides permitirá obtener un mayor conocimiento de éstos, sobre la formación de biofilm generado por *Enterococcus faecalis*.

#### 5. OBJETIVOS

##### 5.1 General

Determinar el efecto de los flavonoides en la inhibición del crecimiento de *Enterococcus faecalis*.

##### 5.2 Específicos

- Determinar el perfil de sensibilidad que presenta *Enterococcus faecalis* ante los flavonoides quecertina, morina, naringina, Q + M y Q + N mediante la prueba de Kirby-Bauer.
- Caracterizar condiciones de crecimiento de biofilm.
- Determinar tiempo de crecimiento de biofilm.



- Determinar dosis efectivas de acción de flavonoides sobre el crecimiento del biofilm de *E.faecalis*.

## 6. MATERIAL Y MÉTODO

- **Equipo:** Mechero Bunsen, estufa de cultivo a 35°C, baño termo regulado a 35°C, refrigerador de 2-8°C, congelador a -14°C o menor, vortex.
- **Material:** Asa de inoculación, tubos de ensayo estériles, hisopos estériles, pinzas estériles, regla graduada en mm, discos.
- **Reactivos:** Caldo BHI en tubos con 5 mL, agar BHI en placas Petri con 25 mL.

### 6.1 Medios de cultivo

#### 6.1.1 Agar BHI

Se utilizó agar BHI como medio, el cual se preparó de acuerdo con las instrucciones de la casa manufacturadora (BD Bioxon) con pH 7.4 +/- 0.2. Después se esterilizó en autoclave a una temperatura de 121 °C por 25 minutos. Luego se mantuvo en baño maría hasta que la temperatura fuera de 48-50°C. Posteriormente se distribuyó el medio en cantidad aproximada de 25 mL. en cada caja de Petri de 15 x 100 mL, estériles. Se dejó solidificar y se mantuvo a temperatura ambiente por un tiempo prudencial hasta que el exceso de humedad se evaporó, luego se refrigeró.

#### 6.1.2 Caldo BHI

Se utilizó BHI, el cual se preparó de acuerdo con las instrucciones de la casa manufacturadora (BD Bioxon) ajustado a pH 7.4 +/- 0.2. Se colocaron 4.5 y 5 mL de medio en cada tubo de ensaye. Después se esterilizaron en autoclave a una temperatura de 121 °C por 25 minutos. Luego se mantuvo a temperatura ambiente por un tiempo prudencial y se refrigeró.



#### 6.1.3 Agar sangre + Hemina y Vitamina K

Se preparó de acuerdo con las instrucciones de la casa manufacturadora (BD Bioxon) ajustado a pH 7.3 +/- 0.2. y se añadió 5 ml de Hemina. Después se esterilizó en autoclave a una temperatura de 121 °C por 25 minutos. Luego se mantuvo en baño maría durante 30 minutos hasta que la temperatura fuera de 48-50°C. Posteriormente se añadieron 5 mL de vitamina K y 25 mL de sangre de carnero desfibrinada los cuales se mezclaron sobre una parrilla agitadora y finalmente se distribuyó el medio en cantidad aproximada de 25 mL, en cada caja de Petrí de 15 x 100 mL, estériles. Se dejó solidificar y se mantuvo a temperatura ambiente por un tiempo prudencial hasta que el exceso de humedad se evaporó, luego se refrigeró.

#### 6.1.4 TSB

Se preparó de acuerdo a las instrucciones de la casa manufacturadora (DIFCO) con pH 7.3 +/- 0.2. Después se esterilizó en autoclave a una temperatura de 121 °C por 25 minutos. Luego se mantuvo en baño maría durante 30 minutos. Posteriormente se mantuvo a temperatura ambiente por un tiempo prudencial hasta que el exceso de humedad se evaporó, luego se refrigeró.



## 6.2 Preparación de flavonoides

### 6.2.1 Quercetina

Se pesó 1 mg de Quercetina disuelto en 700  $\mu$ L de DMSO y aforado con agua destilada a 1 mL. *NOTA:* para el experimento de 24 pozos se tomó un volumen de 10 $\mu$ L del stock de quercetina para llegar a una concentración final de 10  $\mu$ g/mL en cada pozo.

### 6.2.2 Morina

Se pesó 1 mg de Morina disuelta en 500  $\mu$ L de DMSO y aforado con agua destilada a 1 mL.

Se tomaron 500  $\mu$ L de Morina 1 mg/mL disuelta en 250  $\mu$ L de DMSO y aforado con agua destilada a 1 mL. *NOTA:* para el experimento de 24 pozos se tomó un volumen de 10 $\mu$ L de la primera dilución de morina (500  $\mu$ g/mL) para obtener una concentración final de 5  $\mu$ g/mL en cada pozo.

### 6.2.3 Naringina

Se pesó 30 mg de Naringina disuelta en 500  $\mu$ L de DMSO y aforado con agua destilada a 1 mL. *NOTA:* para el experimento de 24 pozos se tomó un volumen de 10 $\mu$ L del stock de naringina para llegar a una concentración final de 300  $\mu$ g/mL en cada pozo.

### 6.2.4 Quercetina + Morina (Q+M)

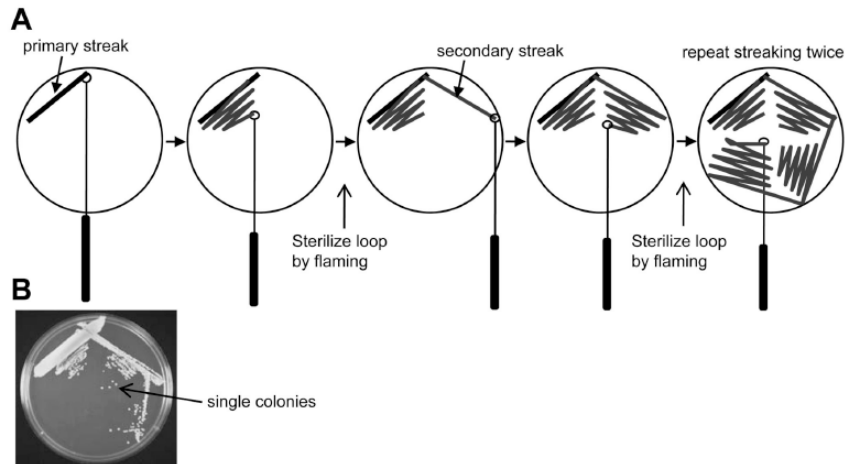
Se tomaron 500  $\mu$ L de Quercetina (1 mg/mL) disuelto en 500  $\mu$ L de Morina (1 mg/ml). *NOTA:* para el experimento de 24 pozos se tomó un volumen de 10  $\mu$ L de la mezcla Q+M para llegar a una concentración de 10  $\mu$ g/mL en cada pozo.

### 6.2.5 Quercetina + Naringina (Q+N)

Se tomaron 500  $\mu$ L de Quercetina (10 mg/ml) disuelto en 500  $\mu$ L de Morina (10 mg/mL). *NOTA:* para el experimento de 24 pozos se tomó un volumen de 10  $\mu$ L de la mezcla Q+N para llegar a una concentración de 100  $\mu$ g/mL en cada pozo.

### 6.3 Preparación de cultivo puro o aislamiento primario

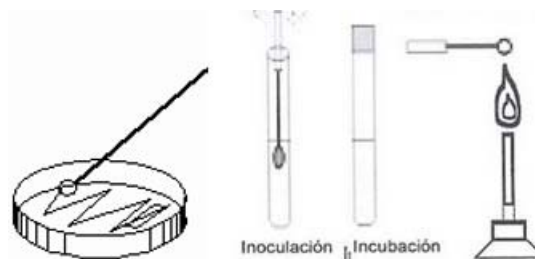
En una placa de agar sangre se sembró *E. faecalis*, mediante el método de estriado (Fig 5) y se incubó durante 24 horas a 37 °C.



**Figura 5. Siembra de la bacteria para obtener colonias aisladas de *Enterococcus faecalis*.** A) La placa de agar fue rayada usando un asa de alambre esterilizada en una flama y fue enfriada al tocar la superficie del agar antes y después de hacer contacto con la bacteria. Las colonias pueden ser aisladas mediante repetidas rayas. B) Colonias aisladas después de 24 hrs.

### 6.4 Preparación de la solución stock

Se seleccionó 1 a 2 colonias del microorganismo en estudio, a partir del cultivo puro. Se transfirieron estas colonias, simplemente tocando la parte superior de cada una con asa bacteriológica a un tubo con 5 mL de caldo estéril de BHI. Posteriormente se incubó este cultivo a 35°C, por un tiempo de 24 horas hasta que se produjo un crecimiento moderado (Fig.6).

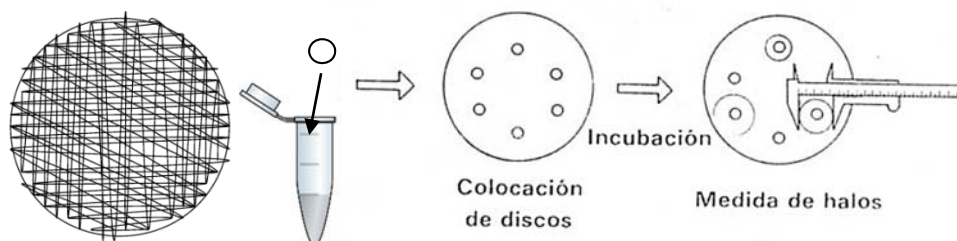


**Figura 6. Selección de colonia aislada y transferencia de ésta a caldo BHI estéril.**

## 6.5 Método de Kirby-Bauer

### 6.5.1 Siembra de la muestra

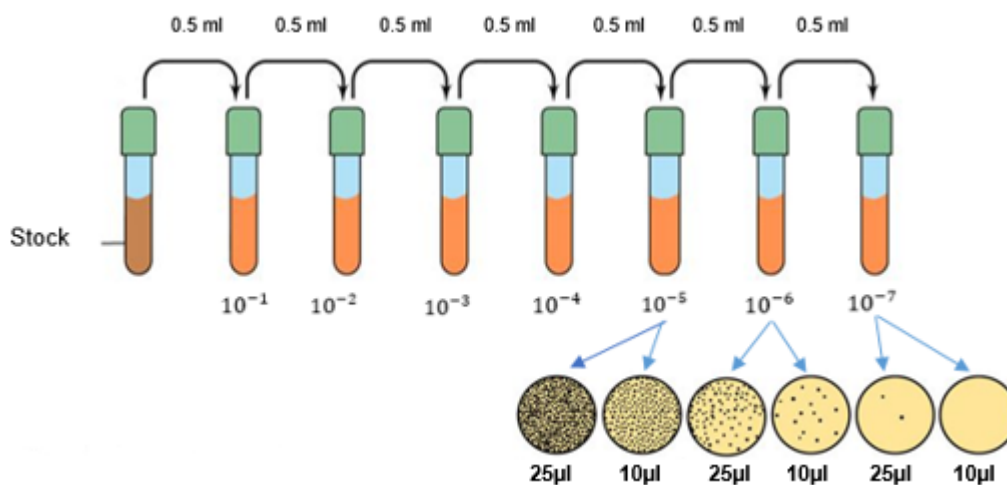
El microorganismo se inoculó mediante técnica de siembra masiva en la superficie de una placa de agar, al tomar 5  $\mu$ l del inóculo mediante la ayuda de una micropipeta, y depositarse sobre el agar. Así se sembró el inóculo uniformemente sobre la superficie del medio con un aplicador distribuyéndolo en 6 direcciones distintas. Luego de permitir que la superficie del medio sembrado se secase durante 5-20 minutos, manteniendo la caja con la tapa cerrada. Después se colocaron discos sobre la superficie del agar previamente impregnados con flavonoides: Quercetina (1 mg/mL), Morina (500  $\mu$ g/mL), Naringina (30 mg/mL), Quercetina con Morina (1 mg/mL), Quercetina con Naringina (10 mg/mL), con pinzas estériles; con éstas, se presionaron los discos ligeramente sobre el agar para asegurar un contacto uniforme. Se colocaron 6 discos en la periferia, dejando entre disco y disco un espacio uniforme (aproximadamente de 2 cm.); para evitar que las zonas de inhibición quedaran imbricadas. Las placas se incubaron por 24 horas a 35- 37°C. Posterior al tiempo de incubación se mide los halos de inhibición con un vernier (Fig.7).



**Figura 7. Método Kirby-Bauer.** Se realiza una siembra masiva de la bacteria sobre agar BHI, a continuación, se colocaron discos de papel filtro, impregnados con las concentraciones específicas de los flavonoides. Se incubó la placa durante 24 horas a 37 °C y posteriormente se observan resultados de inhibición, con la ayuda de una regla-Vernier se mide el diámetro de la inhibición.

## 6.6 Macrodilución y conteo bacteriano

A partir de la preparación del stock se realizaron 7 diluciones, para lo cual se tomó 0.5 mL de la solución stock, se transfirió a otro tubo con 4.5 ml de BHI estéril, se agito y se tomaron 0.5 mL de esta última mezcla y se transfirió a otro tubo, así sucesivamente hasta completar 7 tubos, a partir de las últimas 3 diluciones se tomaron 10 y 25  $\mu$ L y se depositaron sobre agar BHI para realizar una siembra masiva, los tubos y las placas se guardaron durante 24 horas a 37°C en jarra de anaerobiosis. (Fig.8).



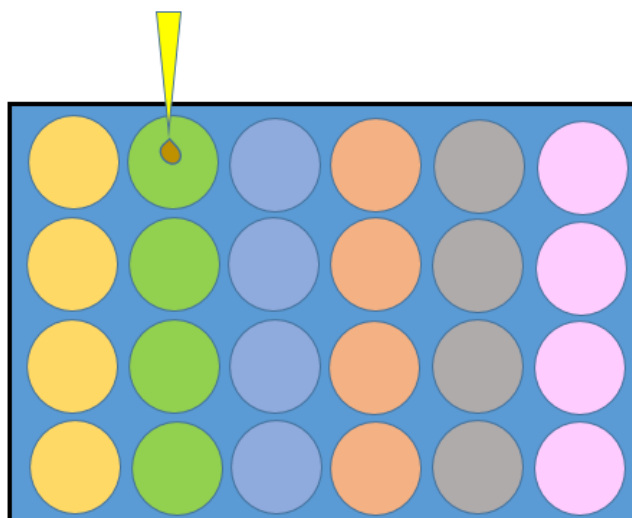
**Figura 8. Macrodilución a partir de la solución stock de *E. faecalis*.**

Se tomaron 500  $\mu$ l del stock de *E. faecalis* y se diluyeron en un tubo con 4.5 ml de medio BHI y se agito con vortex, esto se repitió hasta completar 7 diluciones, posteriormente se realizaron las siembras correspondientes a las tres últimas diluciones.

## 6.7 Curso temporal para la formación de biofilm

En una placa de 24 pozos estéril, se colocaron 1000  $\mu$ L de TSB en cada pozo, y 150, 000, 000 de bacterias de *E. faecalis* a la hora determinada para cada columna hasta completar 24 horas, se colocó al inicio un T0 como control. Después de 24 horas se succiono el medio de la caja y se realizaron de 1-3 lavados con PBS. Luego se colocó en cada pozo 500  $\mu$ l de formalina

al 10% durante 10 min. Luego se succionó la formalina y se tiñó con 500  $\mu$ l de cristal violeta al 0.1% durante 30 min. Posteriormente se succionó el cristal violeta y se colocó ácido acético al 33%. Finalmente se leyeron las densidades colorimétricas de cada pozo, mediante el método de turbidez, a una densidad óptica de 600 nm (Fig.9).



**Figura 9. Placas de 24 pozos para la formación de biofilm.**

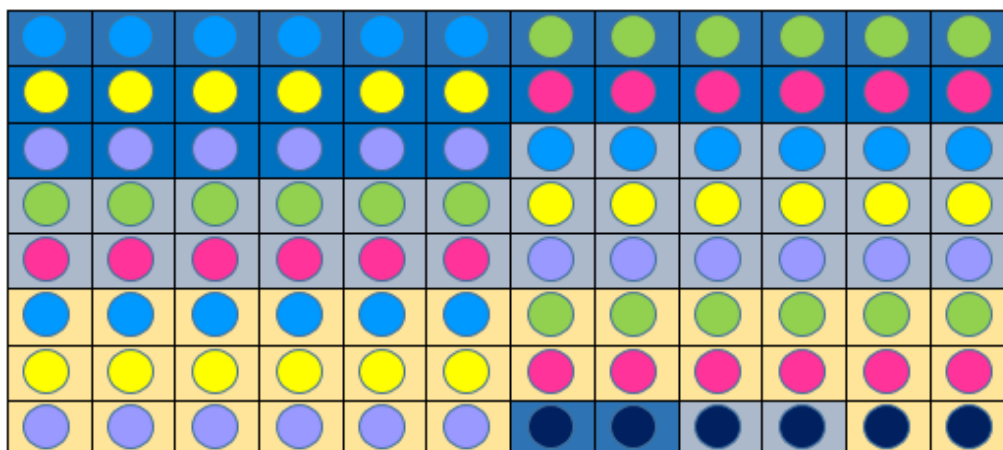
Se agrega 150, 000,000 de bacterias en 1 mL de medio TSB durante el tiempo determinado para cada columna. Después se procesa la placa para teñir y poder medir la densidad óptica.

#### 6.8 Ensayo de viabilidad celular

En una placa de 96 pozos estéril, se mezclaron 9600  $\mu$ L de medio TSB a pH 7 y 150, 000, 000 de bacterias de *E. faecalis*, de ésta mezcla se colocaron 100  $\mu$ l en cada pozo y también se colocó en la placa un control con DMSO (20 $\mu$ L) correspondiente a cada hora de tratamiento. Se trataron a 24, 48 y 72 horas. Con los flavonoides correspondientes. Después de completadas las 72 horas., se succionó el medio de la caja y se realizaron de 1-3 lavados con PBS, el cual previamente se preparó con 0.0025 gramos de MTT (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico) disueltos en 1 mL de PBS en



un eppendorf estéril y después se colocó en cada pozo 50  $\mu$ L de la mezcla de MTT (1 mL) con medio TSB a pH 7 (4.8 mL). Posteriormente se dejaron pasar 4 horas y pasado éste tiempo se eliminó el medio, finalmente se colocaron 100  $\mu$ l de isopropanol ácido disolviéndolo correctamente en cada pozo y se leyó a una densidad óptica de 550 nm (Fig. 10).



**Figura 10. Placas de 96 pozos para la viabilidad celular.**

De la mezcla de bacteria y medio TSB se toman 100  $\mu$ L para cada pozo. Después de 24, 48 y 72 horas se trata cada pozo con el flavonoide correspondiente. Se colocan 2 controles de DMSO correspondientes a 24, 48 y 72 hrs. Cumplido el tiempo se procesa la placa para teñir y poder medir la densidad óptica.

## 6.9 Tipo de estudio

Experimental

## 6.10 Población de estudio y muestra

Cepas de *Enterococcus faecalis* cultivadas en el Cepario de Bioquímica, UNAM.



#### 6.11 Criterios de inclusión

- Cultivo puro y un inóculo estandarizado
- Medio de crecimiento: Brain Heart Infusion (BHI) Agar
- Morfología microscópica: cocos gram-positivos pigmentados de color morado
- pH proporcionado por el agar: 7.2-7.4
- Atmosfera de incubación: jarra con vela que genere una concentración de CO<sub>2</sub> de alrededor del 3%
- Temperatura de incubación: 35 °C en estufa de incubación humidificada
- Duración de la incubación: 24 hrs.
- Concentraciones de flavonoides para biofilm de *E.faecalis*: quecertina (10 µg/mL), morina (5 µg/mL), naringina (300 µg/mL), Q + M (5 y 5 µg/mL) y Q + N (50 y 50 µg/mL).

#### 6.12 Criterios de exclusión

- Inóculo mixto
- Agar demasiado grueso o demasiado delgado



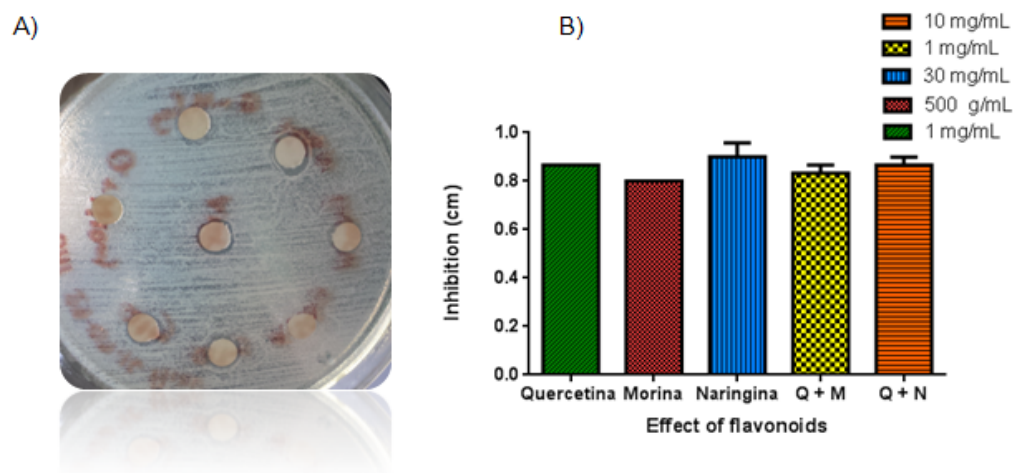
### 6.13 Variables de estudio

Variable	Conceptualización	Operacionalización
Flavonoide (independiente)	Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico).	Se determinará el porcentaje de actividad antimicrobiana que logra cada flavonoide sobre <i>E.faecalis</i> .
<i>Enterococcus faecalis</i> (dependiente)	Son bacterias Gram positivas, anaerobias facultativas, que habitan en el interior del tracto gastrointestinal de gran variedad de organismos, incluyendo al hombre. Pueden encontrarse también en el tracto genitourinario y en la saliva. Han sido identificados como patógenos oportunistas para los humanos, pudiendo causar diferentes enfermedades	Se determinará como cepa bacteriana resistente o no resistente.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Efecto de los flavonoides en el crecimiento de *E. faecalis*.

Después de incubar 150, 000, 000 de bacterias por 24 horas encontramos que se observó crecimiento bacteriano adecuado. Inhibición: 0.9 y 0.8 mm con Quercetina (1mg/mL), 0.8 mm con Morina (500 µg/mL), 0.9 mm con Naringina (30mg/mL), 0.8 mm con Quercetina y Morina (1mg/mL), 0.8 mm con Quercetina y Naringina (10 mg/mL) y 0.8 mm con Amp 4 mg/ml. Quercetina inhibió en mayor proporción el crecimiento de *Enterococcus faecalis*. (Fig.11).



**Figura 11. Efecto de Quercetina, Naringina, Morina y su combinación.**

A) Siembra masiva con hisopo de la cepa *E. faecalis* en agar BHI. Se colocaron discos impregnados con el flavonoide correspondiente a cada concentración. El control negativo fue DMSO al 50%. El control positivo fue Ampicilina con 4 mg/ml. Se trataron con quercetina, morina, naringina y quercetina + morina (Q+M) y con quercetina + naringina (Q+N). La incubación en jarra de anaerobiosis a 37°C por 24 hrs B) Análisis gráfico de la inhibición de crecimiento. El experimento se realizó en tres diferentes ocasiones.

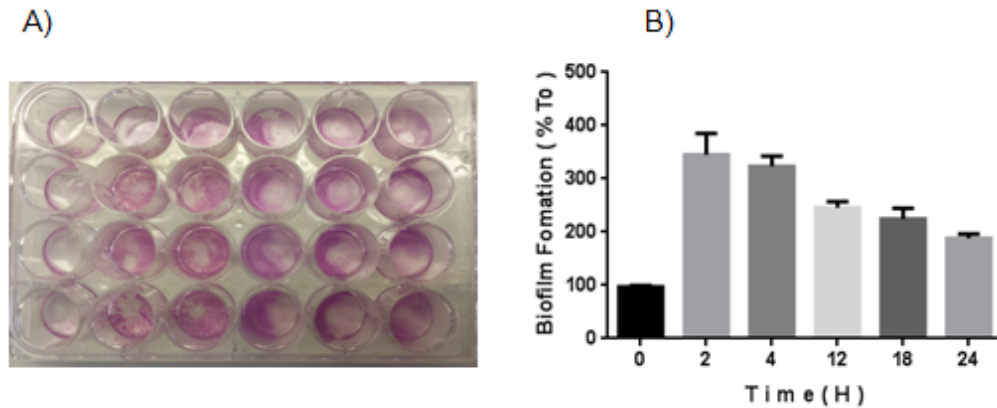


**Tabla 2. Inhibición de flavonoides (mm)**

Flavonoides	Inhibición (mm)	M	SEM
Quer 1 mg/mL	0.9	0.86	0.033
	0.9		
	0.8		
Mor 500 µl/mL	0.8	0.8	0
	0.8		
	0.8		
Nar 30 mg/mL	1	0.9	0.058
	0.9		
	0.8		
Q+M 1 mg/mL	0.9	0.83	0.033
	0.8		
	0.8		
Q+N 10mg/mL	0.9	0.86	0.03
	0.8		
	0.9		

### 7.2 Curso temporal para la formación de biofilm sin sacarosa.

Después de 24 horas de incubación de 150, 000, 000 de bacterias de *E.faecalis*, por medio de un método colorimétrico se observó un mayor crecimiento de biofilm a las 2 horas, siendo mayor a 300%, lo que permitió identificar el tiempo óptimo de crecimiento para la formación de biofilm de *E.faecalis*. (Fig.12).

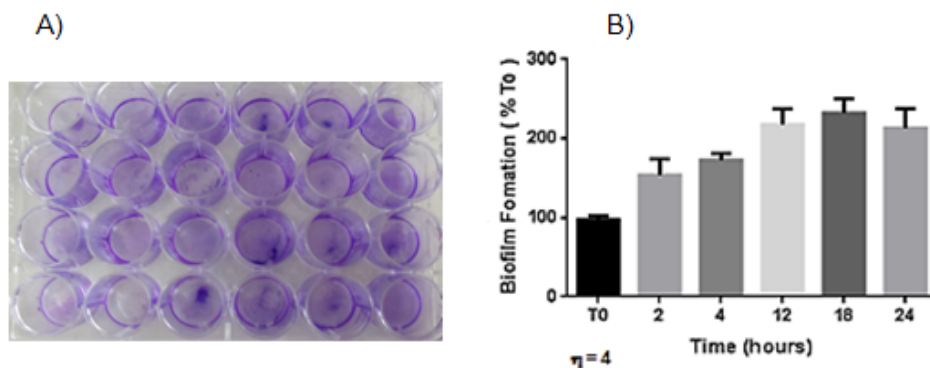


**Figura 12. Curso temporal para la formación de biofilm sin sacarosa.**

A) Se utilizó una caja de 24 pozos estéril con 24 ml de medio TSB con 0.05 mg de sacarosa. Se colocaron 1000  $\mu$ L de TSB en cada pozo, y 150, 000,000 de bacterias de *E. faecalis* a la hora determinada para cada columna. Se succiona el medio de la caja y se realizan de 1-3 lavados con PBS. Después se colocó en cada pozo 500  $\mu$ L de formalina al 10% durante 10 min. Luego se succionó la formalina y se tiñe con 500 $\mu$ L de safranina al 0.1% durante 30 min. Posteriormente se succionó la safranina y se coloca ácido acético al 33%. Finalmente se leyó a una densidad óptica de 492 nm. B) Curso temporal del crecimiento de *E. faecalis* sin sacarosa, la máxima formación se logra a las 2 horas.

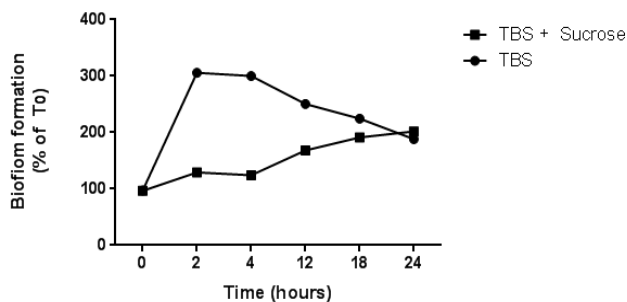
### 7.3 Curso temporal para la formación de biofilm con sacarosa.

Con base en los resultados mostrados en el curso temporal para la formación de biofilm sin sacarosa se adiciono 0.05 mg de sacarosa en el medio TSB. Esta condición mostro un incremento en el crecimiento de la bacteria *E. faecalis* a las 12, 18 y 24 horas y se mostró un inicio en la formación de biofilm a las 2 horas mayor a 100%. (Fig.13). Así se comparó la curva de crecimiento generada sin sacarosa y con sacarosa para la formación de biofilm (Fig. 14).



**Figura 13. Curso temporal para la formación de biofilm con sacarosa.**

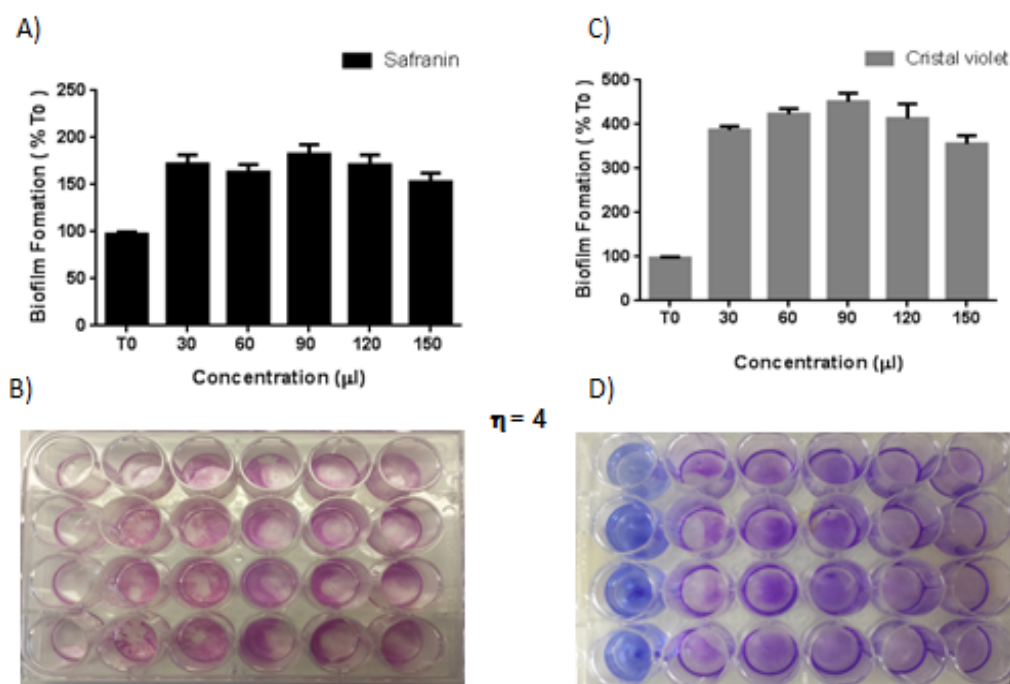
A) Se utilizó una caja de 24 pozos estéril con 24 mL de medio TSB con 0.05 mg de sacarosa. Se colocaron 1000  $\mu$ L de TSB en cada pozo, y 150, 000,000 de bacterias de *E. faecalis* a la hora determinada para cada columna. Se succiona el medio de la caja y se realizan de 1-3 lavados con PBS. Después se colocó en cada pozo 500  $\mu$ L de formalina al 10% durante 10 min. Luego se succionó la formalina y se tiñó con 500  $\mu$ L de cristal violeta al 0.06% durante 30 min. Posteriormente se succionó el cristal violeta y se coloca ácido acético al 33%. Finalmente se leyó a una densidad óptica de 600 nm. B) Curso temporal del efecto de la sacarosa en el crecimiento de *E. faecalis*, la formación de biofilm se logra formar a las 2 horas. El experimento fue realizado por triplicado.



**Figura 14. Curso temporal para la formación de biofilm de *E. faecalis* con y sin sacarosa.**

### 7.4 Efecto de safranina y cristal violeta sobre la formación del biofilm de *E. faecalis*.

Con base en los resultados mostrados en el curso temporal para la formación de biofilm con y sin sacarosa. Se tomó como referencia 2 horas para la formación de biofilm con diferentes concentraciones de bacteria y se comparó el efecto que tiene safranina y cristal violeta sobre la formación de biofilm (Fig. 15).



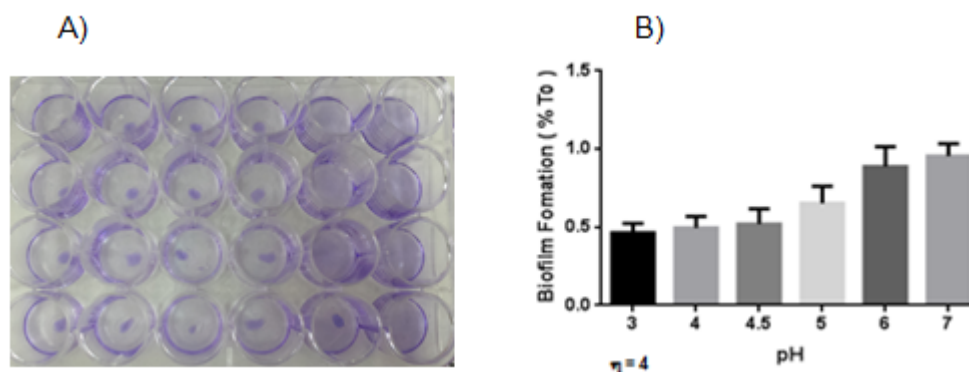
**Figura 15. Efecto de safranina y cristal violeta sobre la formación de biofilm.**

Se realizó el curso temporal para la formación de biofilm, se colocaron distintas concentraciones de *E. faecalis* expuestas al medio durante 2 horas y se tiñeron mediante A y B) safranina, C y D) cristal violeta.



### 7.5 Curso temporal para la formación de biofilm de acuerdo al pH.

Con base en los resultados mostrados en el curso temporal para la formación de biofilm con 0.05mg de sacarosa se adiciono ácido láctico en el medio TSB para obtener diferentes pH's. Esta condición mostro después de 2 horas un incremento en el crecimiento de la bacteria *E. faecalis* a pH 7 mayor a 300%. (Fig. 16).



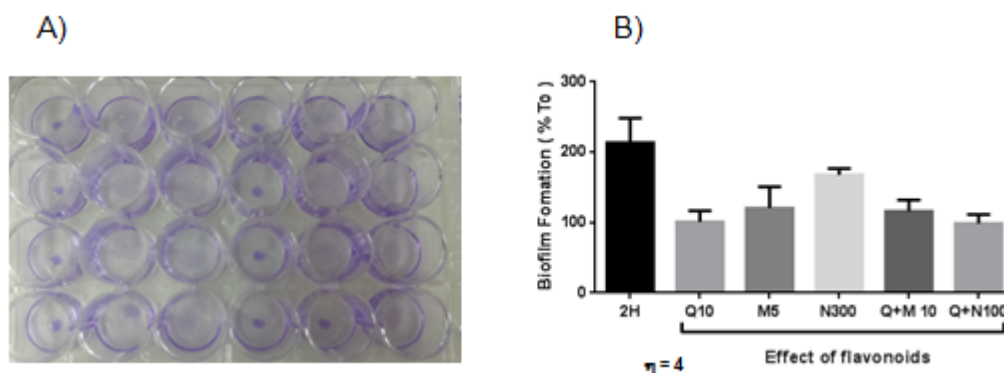
**Figura 16. Curso temporal para la formación de biofilm de acuerdo al pH.**

A) Se utiliza una caja de 24 pozos estéril y 24 mL de medio TSB con 0.05 mg de sacarosa y ácido láctico para obtener diferentes pH. Se colocaron 1000  $\mu$ L de TSB en cada pozo, y 150, 000,000 de bacterias de *E. faecalis* y se dejan pasar 2 horas. Se colocó al inicio un T0 como control Se succionó el medio de la caja y se realizaron de 1-3 lavados con PBS. Después se colocó en cada pozo 500  $\mu$ L de formalina al 10% durante 10 min. Luego se succionó la formalina y se tiñó con 500  $\mu$ L de cristal violeta al 0.06% durante 30 min. Posteriormente se succionó el cristal violeta y se colocó ácido acético al 33% Finalmente se leyó a una densidad óptica de 600 nm. B) Curso temporal para la formación de biofilm de acuerdo al pH, el mejor crecimiento se presentó a pH 7. El experimento fue realizado por triplicado.

### 7.6 Acción de flavonoides sobre el biofilm de *E. faecalis*.

Una vez identificadas las condiciones óptimas de crecimiento para *E. faecalis*, se expuso la formación de biofilms al tratamiento con flavonoides: quecertina (10  $\mu$ g/mL), morina (5  $\mu$ g/mL), naringina (300  $\mu$ g/mL), Q + M (5 y 5  $\mu$ g/mL) y Q + N (50 y 50  $\mu$ g/mL). Después de dos horas de incubación mediante espectrofotometría de flujo se mostraron reducciones significativas en el crecimiento del biofilm comparado con el biofilm no tratado. Las adiciones

disminuyeron mayormente el biofilm: quercetina con naringina (Q+N) a 100 mg/ml menos del 100% y quercetina con morina (Q+M) a 10 mg/ml hasta el 100%. (Fig. 17).



**Figura 17. Acción de Quercetina, Naringina, Morina y su combinación sobre biofilm**

A) Se utiliza una caja de 24 pozos estéril y 24 mL de medio TSB con 0.05 mg de sacarosa y ácido láctico a pH7. Se colocaron 960  $\mu$ L de TSB en cada pozo, y 150,000,000 de bacterias de *E. faecalis* y se dejan pasar 2 horas. Se colocó al inicio un T0 como control Se succionó el medio de la caja y se realizaron de 1-3 lavados con PBS. Después se colocó en cada pozo 500  $\mu$ L de formalina al 10% durante 10 min. Luego se succionó la formalina y se tiñó con 500  $\mu$ L de cristal violeta al 0.06% durante 30 min. Posteriormente se succiona el cristal violeta y se colocó ácido acético al 33% Finalmente se leyó a una densidad óptica de 600 nm. B) Formación de biofilm con tratamiento, La exposición con Q+N 100 mg/ml y Q+M 10 mg/ml redujo en mayor proporción el número de bacterias viables en comparación con los otros flavonoides y con el biofilm no tratado. El experimento fue realizado por triplicado.

### 7.7 Viabilidad celular (Ensayo MTT).

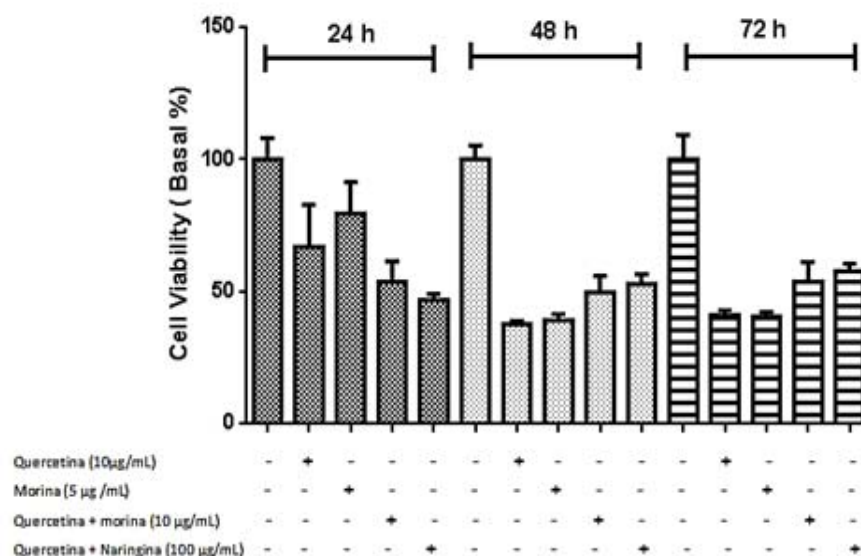
Una vez que se expusieron las bacterias a tratamiento con quecertina (10  $\mu$ g/mL), morina (5  $\mu$ g/mL), naringina (300  $\mu$ g/mL), Q + M (5 y 5  $\mu$ g/mL) y Q + N (50 y 50  $\mu$ g/mL), se midió la densidad óptica y se detectó el mayor efecto citotóxico con Q+M y Q+N a las 24 hrs. sobre *E.faecalis*, a las 48 y 72 horas disminuyo el efecto citotóxico respectivamente, sin embargo la viabilidad celular se mantuvo por debajo del basal. Por el contrario, quercetina, morina y naringina ejercen menor efecto a las 24 horas, pero a las 48 y 72 horas

muestran un mayor efecto de citotoxicidad en comparación con las combinaciones. (Fig. 18 y 19).

A)



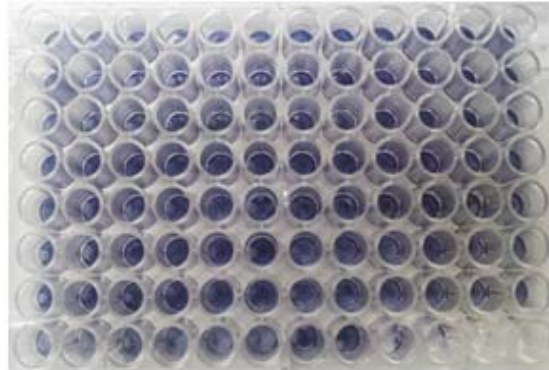
B)



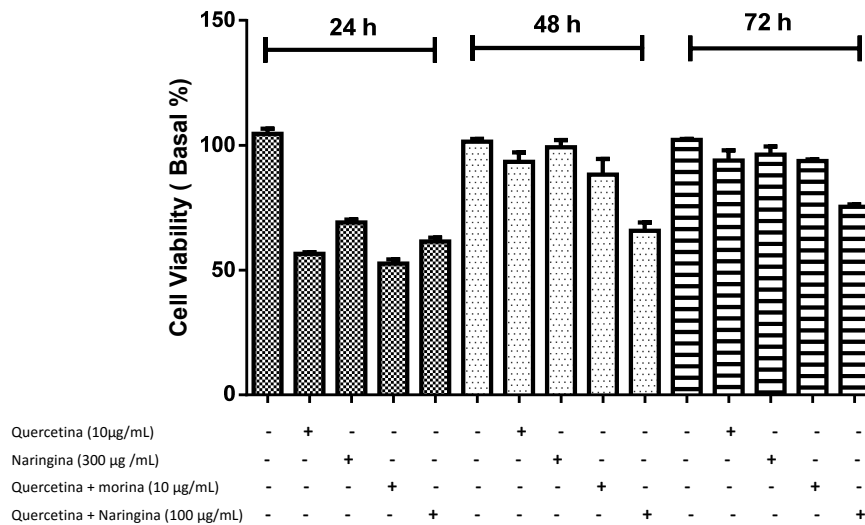
**Figura 18. Acción de Quercetina, Morina, Quercetina con Morina y Quercetina con Naringina sobre biofilm.**

A) En una placa de 96 se colocaron 100 µL de una mezcla de bacteria y medio TSB a pH7, se colocó un control con DMSO (20 µL) correspondiente a cada hora de tratamiento. Se trataron a 24, 48 y 72 hrs. con los flavonoides correspondientes y después de completado el tiempo se succiono el medio de la placa, se realizaron 3 lavados con PBS y se colocó MTT después de 4 horas se succiono el medio y se colocaron 100 µL de isopropanol disolviéndolo correctamente en cada pozo. B) A las 24 horas Q+N 100 µg/ml ejerció el mayor efecto inhibitorio sobre el biofilm de *E.faecalis* y a las 48 y 72 horas el efecto sobre la bacteria disminuyo aumentando la formación de biofilm sin que fuera mayor al control basal. En general todos los flavonoides evaluados mostraron un efecto a las 24 horas y disminución de dicho efecto a las 48 y 72 horas.

A)



B)



**Figura 19. Acción de Quercetina, Naringina, Quercetina con Morina y Quercetina con Naringina sobre biofilm.**

A) En una placa de 96 se colocaron 100 µL de una mezcla de bacteria y medio TSB a pH7, se colocó un control con DMSO (20 µL) correspondiente a cada hora de tratamiento. Se trataron a 24, 48 y 72 hrs. con los flavonoides correspondientes y después de completado el tiempo se succiono el medio de la placa, se realizaron 3 lavados con PBS y se colocó MTT después de 4 horas se succiono el medio y se colocaron 100 µL de isopropanol disolviéndolo correctamente en cada pozo. B) A las 24 horas Q+N 100 µg/ml ejerció el mayor efecto inhibitorio sobre el biofilm de *E.faecalis* y a las 48 y 72 horas el efecto sobre la bacteria disminuyo aumentando la formación de biofilm sin que fuera mayor al control basal. En general todos los flavonoides evaluados mostraron un efecto a las 24 horas y disminución de dicho efecto a las 48 y 72 horas.



## 8. DISCUSIÓN

Para evaluar el efecto inhibitorio de quercetina, morina y naringina, así como sus combinaciones, se desarrolló el método descrito por Kirby-Bauer y cols., los cuales evaluaron la actividad antibacteriana mediante discos de papel embebidos en el compuesto químico a evaluar, los colocaron sobre una superficie bacteriana y posteriormente midieron los halos de inhibición<sup>67, 68</sup>. Así los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que el mayor efecto inhibitorio se logra con Naringina a 30 mg/mL. Combinando Naringina con Quercetina a 10 mg/mL se observa un menor efecto inhibitorio, obteniendo así el menor efecto inhibitorio con Morina a 5 mg/mL.

También se evaluó el efecto de las condiciones ambientales sobre la formación de biofilm, exponiendo a las colonias de *E.faecalis* a un medio específico, durante determinados tiempos<sup>69</sup>. Se observó que la exposición de *E.faecalis* en un medio sin suplementos nutrimentales durante diferentes periodos, hace que decrezca el curso temporal de formación de biofilms de la bacteria, lo que supone un estrés nutrimental bacteriano que lleva a la muerte de la bacteria; por el contrario al exponer a la bacteria en un medio con sacarosa se observa un aumento significativo en la producción de biofilm.

En el conducto radicular la existencia de carbohidratos disponibles para los microorganismos, pueden ser provenientes de la dieta del hospedero, de las relaciones interbacterianas o provenientes de las reservas nutricionales de los microorganismos. Mediante el proceso de fermentación de glucosa, ocurre la degradación de la molécula de glucosa promoviendo el desarrollo de la bacteria, una vez que la cámara pulpar está expuesta a la cavidad oral<sup>70</sup>.



A pesar de que en distintos estudios se han teñido las colonias de biofilm con safranina, en bacterias Gram positivas, para realizar la contabilización de las bacterias mediante un método espectrofotométrico, existen trabajos en los que se ha empleado cristal violeta para teñir biofilms de *E. faecalis* ya que éste colorante se retiene con mayor facilidad en la capa de peptidoglicanos que poseen este tipo de bacterias<sup>71</sup>.

Comparando los resultados de los dos tipos de colorantes se puede observar que el uso de cristal violeta en las placas de 24 pozos permitió detectar un mayor margen de lectura, con lo que se puede determinar que safranina es un colorante de contraste, capaz de teñir a bacterias grampositivas y negativas, sin embargo, cristal violeta es un colorante específico para teñir bacterias Gram positivas debido a la capa de peptidoglicanos.

Otro factor a evaluar fue el pH por lo que se expuso a la bacteria a pH 3, 4, 4.5, 6 y 7, dado que con frecuencia la boca está expuesta a alimentos que tienen un pH mucho más bajo que el de la saliva, el cual oscila entre 6.7 y 7.5<sup>72</sup>, en los resultados se observó un incremento en la formación de biofilm al aumentar el pH del medio. Se obtuvo la mayor cantidad de biofilm a pH 7.

*E. faecalis* es una bacteria frecuentemente aislada y recuperada en cultivos de dientes que presentan fracasos endodónticos, esto ocurre debido a la resistencia a los efectos antibacterianos de múltiples irrigantes y a la medicación intraconducto con  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , ya que expresa una bomba de eflujo de protones, la cual se encarga de mantener a un pH óptimo el medio citoplasmático<sup>73</sup>. Lo que hace suponer que el pH extracelular de la bacteria sea menor a 9,6 y pueda desarrollarse óptimamente.

Una vez determinadas las condiciones óptimas de crecimiento del biofilm de *E. faecalis* se procedió a exponer a la bacteria con los flavonoides<sup>71,74</sup>.



Se obtuvo un mayor efecto bactericida de Quercetina con Naringina a una concentración de 100  $\mu\text{g/ml}$ , sin embargo, se esperaba que la combinación de quercetina con morina generara una mayor inhibición ya que la eliminación de los biofilms de quercetina y morina individualmente generaron un mayor efecto inhibitorio sobre *E. faecalis* en comparación con naringina.

Probablemente este sinergismo entre quercetina y naringina puede deberse a la unión de un enlace carbono-carbono en la posición 6 del núcleo del flavonoide con azúcares (glucosa y manopiranososa) presente en la estructura química de naringina. La presencia de azúcares que posee naringina le confiere una mayor solubilidad y polaridad, por lo que es moderadamente soluble en solventes polares como: etanol, metanol, butanol, acetona, DMSO, agua<sup>75</sup>. Dicha propiedad le permitiría a naringina ingresar dentro del biofilm bacteriano, llevando a quercetina dentro de la bacteria para que ejerza su efecto bacteriostático.

El realizar este tipo de experimentos ha permitido determinar las condiciones para el crecimiento de Biofilm de *E. faecalis*; sin embargo, las condiciones estáticas en las que se cultiva el biofilm no provee el suficiente suministro continuo de nutrientes como en el organismo y por ende la incapacidad de generar un biofilm maduro, lo cual es una desventaja que se presenta en este estudio, pese a que se utilizó la mayor cantidad de condiciones favorables para la formación de bacteria.

Dado que en los resultados obtenidos en este trabajo se demuestra que la mezcla de flavonoides posee una actividad favorable en la inhibición de biofilm y posterior muerte de la bacteria por efecto del flavonoide lo que puede representar una alternativa viable para el tratamiento de las patologías generadas por esta bacteria.

Aunque quercetina, morina, naringina, quercetina con morina y quercetina con naringina fueron efectivas antimicrobianas contra el biofilm de *E. faecalis*,



es necesario realizar investigaciones adicionales (in vivo) que permitan determinar los efectos de éstos flavonoides en comparación con los desinfectantes actualmente usados en la terapia endodóntica como el hidróxido de calcio e hipoclorito de sodio.

## 9. CONCLUSIONES

La capacidad de *E. faecalis* de formar biopelículas (“biofilm”), es una estrategia de supervivencia para esta bacteria debido a la protección que le confiere la matriz de sustancias poliméricas extracelulares a éste patógeno contra los efectos de distintos antimicrobianos, lo que le ha permitido sobrevivir a ciertas medicaciones intraconducto y a diversos protocolos de irrigación.

Se determinó que las mejores condiciones de crecimiento de biofilm de *E. faecalis* fueron con la adición de sacarosa en el medio TSB y a pH 7 incubados en jarra de anaerobiosis durante 2 horas.

En orden decreciente: quercetina con naringina, quercetina con morina, quercetina, morina y naringina, demostraron su acción antimicrobiana sobre *E. faecalis*. Por lo que de acuerdo a estos resultados se demuestra que dichos flavonoides pueden ser una alternativa viable para combatir el biofilm de *E. faecalis* formado en los conductos radiculares.





## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Díaz-Martín GA. Fundamentos y técnicas de análisis microbiológico. Antibiograma. Laboratorio de Diagnóstico Clínico. Segundo curso U.T. 17-1 Bloque temático III. Curso 2009- 2010. Centro de Formación Profesional. Instituto Villaverde.
2. Cordiés-Jackson L, Machado-Reyes LA, Hamilton Cordiés ML. Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. *Acta Med* 1998; 8(1):13-27.
3. Hart CA. La resistencia a los antibióticos. ¿Un problema creciente? *Br Med Journal* 1998; 6:147-148.
4. Vancomycin-resistant enterococcal infections: epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. *Dove Press Journal* 2015; 8:217-230
5. Tomás-Barberán FA, Wollenweber E. Flavonoid aglycones from the leaf surfaces of some *Labiatae* species. *Plant Syst Evol* 1990; 173(3-4):109-118.
6. Harborne JB (editores). *The flavonoids, advances in research since 1986*. Londres: Chapman & Hall; 1994.
7. Barrow GI, Feltham RKA. *Cowan and Steels manual for the identification of medical bacteria*. 3 ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1993. Pp. 66-7.
8. Murray BE. The life and times of the *Enterococcus*. *Clinical Microbiology Reviews* 1990; 3:46-65.



9. Harrington DJ, Sutcliffe IC, Chanter N. "The molecular basis of *Streptococcus equi* infection and disease". *Microbes Infect* 2002; 4 (4): 501-10.
10. Jett B D, Huycke M M, Gilmore M S. Virulence of enterococci. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7: 462-78.
11. Kayaoglu G, Orstavik D. Virulence factors on *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004; 15: 308-320.
12. Kreft B, Marre R, Schramm U, Wirth R. Aggregation Substance of *Enterococcus faecalis* Mediates Adhesion to Cultured Renal Tubular Cells. *Infect Immun*. 1992; 60: 25-30.
13. Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta M, Cucarella C, Lamata M. et al. The Enterococcal Surface Protein, Esp, Is Involved in *Enterococcus faecalis* Biofilm Formation. *Appl Environ Microbiol*. 2001; 67: 4538-4545.
14. Nallapareddy S, Qin X, Weinstock G, Hook M, Murray B. *Enterococcus faecalis* Adhesin, Ace, Mediates Attachment to Extracellular Matrix Proteins Collagen Type IV and Laminin as well Collagen Type I. *Infect Immun*. 2000; 68: 5218-5224
15. Hubble T, Hatton J, Nallapareddy S, Murray B, Gillespie M. Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18: 121-6.
16. Ehrenfeld E, Kessler R, Clewell D. Identification of Pheromone-Induced Surface Proteins in *Streptococcus faecalis* and Evidence of a Role for Lipoteichoic Acid in Formation of Mating Aggregates. *J Bacteriol*. 1986; 168: 6-12.



17. Huycke M, Abrams V, Moore D. Enterococcus faecalis produces extracellular superoxide and hydrogen peroxide that damages colonic epithelial cell DNA. *Carcinogenesis*. 2002; 23: 529-536.
18. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 881-890.
19. George S, Kishen A, Song K. The Role of Environmental Changes on Monospecies Biofilm Formation on Root Canal Wall by Enterococcus faecalis. *J Endod*. 2005; 31: 867-72.
20. Stuart Ch, Shwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. Enterococcus faecalis: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod* 2006; 32 (2): 93-98.
21. Distel J, Hatton J, Gillepsie MJ. Enterococcus faecalis colonization and biofilm formation in medicated root canals. *J Endod* 2001; 28: 689-93.
22. George S, Kishen A, Song K. The Role of Environmental Changes on Monospecies Biofilm Formation on Root Canal Wall by Enterococcus faecalis. *J Endod* 2005; 31: 867-72.
23. Duggan J, Sedgley C. Biofilm formation of Oral and Endodontic Enterococcus faecalis. *J Endod* 2007; 33: 815-8.
24. Giardino L, Ambu E, Savoldi E, Rimondini R, Cassanelli C, Debbia E. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of NaOCl, MTAD and Tetraclean against Enterococcus faecalis biofilm. *J Endod* 2007; 33: 852-5.
25. Costerson JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms; a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284: 1.318-22.



26. Brändle N, Zehnder M, Weiger R, Waltimo T. Impact of growth conditions on susceptibility of five microbial species to alkaline stress. *J Endod* 2008; 34: 579-82.
27. Carvalho CCR. Biofilms: recent developments on an old battle. *Recent Patents in Biotechnology* 2007;1:49-57.
28. Chenoweth, CE. *Enterococcus*. En: APIC Text of infection control and epidemiology Washington DC: APIC; 2000; (94):1-94-7.
29. Hayden MK. Insights into the epidemiology and control of infection with Vancomycin- resistant enterococci. *Clin Infect Dis*.2000; 31:1058-1065.
30. Deshpande LM, Fritsche TR, Moet GJ, Biedenbach DJ, Jones RN. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci from North America and Europe: Areport from the SENTRY antimicrobial surveillance program.*Diagn Microbiol Infect Dis*.2007; 58:163-70.
31. Caballero-Granado FJ, Becerril B, Cisneros JM, Cuberos L, Morenol, Pachón J. Case- control study of risk factors for the development of enterococcal bacteriemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2001; 20: 83-90.
32. Moellering RC Jr.Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen.*Clin Infect Dis* 1992; 14, pp. 1173-8
33. Carton Sánchez JA. Epidemiología de las infecciones enterocócicas *Rev Clin Esp* 1995; 195, pp. 3-11
34. Chou Y, Lin T, Lin J, Wang N, Peng M, Chang F. Vancomycin-resistant enterococcal bacteremia: Comparison of clinical features and outcome between *Enterococcus faecium* and *E. faecalis*. *J Microbiol Immunol Infect*. 2008; 41:124-32.



35. Murray BE. Vancomycin-resistant enterococcal infections. *N Engl J Med.* 2000; 342: 710-21.
36. McHugh C, Zhang P, Michalek S, Eleazer P. pH required to kill *Enterococcus faecalis* in vitro. *J Endod.* 2004; 30: 218-9.
37. Duggan J, Sedgley C. Biofilm formation of Oral and Endodontic *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2007; 33: 815-18.
38. Sánchez-Molina, M.I., Martín, D., Valladares, C. y cols. *Sensibilidad del género Enterococcus a nuevos antimicrobianos.* *Rev Esp Quimioterap* 2004; 17: 184-188.
39. McDonald, L.C., Kuehnert, M.J., Tenover, F.C., Jarvis, W.R. *Vancomycin-resistant enterococci outside the health-care setting: Prevalence, sources, and public health implications.* *Emerg Infect Dis* 1997; 3: 311-317.
40. Torres C, Cercenado E. Lectura interpretada del antibiograma de cocos grampositivos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010; 28: 541-53.
41. Zhou Q, Moore C, Eden S, Tong A, McGeer A. Factors associated with acquisition of vancomycin-resistant enterococci (VRE) in roommate contacts of patients colonized or infected with VRE in a tertiary care hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008; 29:398-403.
42. Gavaldá J, Torres C, Tenorio C, López P, Zarazaga M, Capdevilla JA, et al. Efficacy of ampicillin plus ceftriaxone in the treatment of experimental endocarditis due to *Enterococcus faecalis* highly-resistant to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43:639-46.
43. Klibi N, Sáenz Y, Zarazaga M, Ben Slama K, Ruiz-Larrea F, Boudabous A, et al. Polymorphism in *pbp5* gene detected in clinical *Enterococcus faecium* strains with different ampicillin MICs from a Tunisian hospital. *J Chemother.* 2008; 20:436-40.



44. Antimicrobial resistance surveillance in Europe. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Surveillance reports. 2009. Disponible en: <http://ecdc.europa.eu>
45. Goossens H, Jabes D, Rossi R, Lammens C, Privitera G, Courvalin P. European survey of vancomycin-resistant enterococci in at-risk hospital wards and in vitro susceptibility testing of ramoplanin against these isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2003; 51 Suppl 3:5-12.
46. Phillips I, Casewell M, Cox T, De Groot B, Friis C, Jones R, et al. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *J Antimicrob Chemother.* 2004; 53:28-52.
47. Kühn I, Iversen A, Finn M, Greko C, Burman LG, Blanch AR, et al. Occurrence and relatedness of vancomycin-resistant enterococci in animals, humans, and the environment in different European regions. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71:5383-90.
48. Chow JW, Kak V. Acquired antibiotic resistances in enterococci. En: MS Gilmore, et al, editors. *The enterococci: pathogenesis, molecular biology and antibiotic resistance.* Washington DC: ASM Press; 2002.
49. Havsteen B: Flavonoids. A class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol*, 1983, 32:1141-1148.
50. Kühnau J: The Flavonoids: a class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev NutrDiet*, 1976, 24:117-190.
51. Formica JV y Regelson W.: Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol*, 1995, 33:1061-1080.
52. Ross JA y Kasum CM: Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr*, 2002, 22:19-34.



53. Bylka W, Matlawska I, Pilewski NA. Natural flavonoids as antimicrobial agents. *J Am Nutraceutical Assoc.* 2004; 7(2):24–31).
54. Cushnie TP, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J of Antimicrob Agents.* 2005; 26:343–56.
55. Xu HX, Lee SF. Activity of plant flavonoids against antibiotic-resistant bacteria. *Phytother Res.* 2001;15:39–43.
56. N.D. Martini, D.R.P. Katerere, J.N. Eloff. Biological activity of five antibacterial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae) *Journal of Ethnopharmacology* 2004; 93: 207–212.
57. Hossion AM, Zamami Y, Kandahary RK, Tsuchiya T, Ogawa W, Iwado A, et al. Quercetin diacylglycoside analogues showing dual inhibition of DNA gyrase and topoisomerase IV as novel antibacterial agents. *J Med Chem.* 2011; 54:3686–703.
58. Al-Saif SS, Abdel-Raouf N, El-Wazanani HA, Aref IA. Antibacterial substances from marine algae isolated from Jeddah coast of Red sea, Saudi Arabia. *Saudi J Biol Sci.* 2014;21:57–64.
59. Mirzoeva, O.K., Grishanin, R.N. y Calder, P.C. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiology Research.* 1997; 152: 239–46.
60. Suganya Tachakittirungrod. Antioxidant Active Principles Isolated from *Psidium guajava* grow in thailand. *Scientia Pharmaceutica* 2007; 75: 179-193.
61. Annapoorani, A., Parameswari, R., Pandian, S.K., Ravi, A.V. Methods to determine antipathogenic potential of phenolic and flavonoid compounds



against urinary pathogen *Serratia marcescens*. *J. Microbiol. Methods* 2012b; 91: 208–211.

62. Huang, P., Hu, P., Zhou, S.Y., Li, Q., Chen, W.M. Morin inhibits sortase A and subsequent biofilm formation in *Streptococcus mutans*. *Curr. Microbiol.* 2014; 68: 47–52

63. Kang, S.S., Kim, J.G., Lee, T.H., Oh, K.B. Flavonols inhibit sortases and sortase-mediated *Staphylococcus aureus* clumping to fibrinogen. *Biol. Pharm. Bull.* 2006; 29, 1751–1755

64. Peterson, J.J., Dwyer, J.T., et al. Flavanones in oranges, tangerines (mandarins), tangors, and tangelos: a compilation and review of the data from the analytical literature. *J Food Compost Anal* 2006; 19: S66- S73.

65. Tsui, V.W.K., Wong, R.W.K y Rabie, A.-B.M. The inhibitory effects of naringin on the growth of periodontal pathogens in vitro. *Phytother Res* 2008; 22: 401-406.

66. Celiz G., Daz M. y Audisio M.C. Antibacterial activity of naringin derivatives against pathogenic strains. *J Applied Microbiology.* 2011; 111: 731-738.

67. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotics susceptibility testing by standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* 1966; 45:493-6.

68. Rippere R. Preparation and control of antibiotic susceptibility discs and other devices containing antibiotics. In: Lorian V, editor. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 5th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. Pp. 549-572.

69. Rachid S, Cho S, Ohlsen K, Hacker J, Ziebuhr W. Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation by environmental factors: the





possible involvement of the alternative transcription factor sigB. *Adv Exp Med Biol.* 2000a; 485:159–166. [PubMed: 11109102].

70. Nunez P, García L. Bioquímica de la caries. *Rev Haban Cienc Med* 2010;9(2).

71. Steven M. Kwasny and Timothy J. Opperman. Static biofilm cultures of Gram-positive pathogens grown in a microtiter format used for anti-biofilm drug discovery. *NIH Public Access.* 2012; 1; 50: 13A.8.1–13A.8.23.

72. Cuenca E, Cuenca S. Baca. *Saliva y Placa Bacteriana.* En: *Odontología Preventiva y Comunitaria.* Masson; 2007.

73. Gésime Oviedo, J.M., et.al. Influencia del ph en las relaciones microbianas de la cavidad bucal. *Revisión bibliográfica.* 2014; 52: 2.

74. Pei Lee, Kai Soo Tan. Effects of Epigallocatechin gallate against *Enterococcus faecalis* biofilm and virulence. *Archives of oral biology* 60. 2015; 393 – 399.

75. O. Cartayae Inés Reynaldo. *Reseña bibliográfica Flavonoides: características químicas y aplicaciones.* *Cultivos Tropicales.* 2001; 22: 2, p. 5-14