



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

EFFECTO INHIBITORIO DE LOS FLAVONOIDES EN LA
FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS DE *Aggregatibacter*
actinomycetemcomitans.

TESINA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANO DENTISTA

P R E S E N T A:

JOSÉ ANTONIO SERRANO PEÑA

TUTORA: Dra. GLORIA GUTIÉRREZ VENEGAS



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.



A la UNAM

Le agradezco a la máxima casa de estudios por haberme dado la oportunidad de haber realizado no sólo mis estudios, también el conocer a grandes personas que marcaron mi vida y cambiaron mi forma de pensar.

A la Facultad de Odontología

Mi tiempo en la facultad de odontología fue en verdad un capítulo de mi vida lleno de estrés, cansancio, hora de desvelarme, llamadas a pacientes pero los momentos de felicidad, auto realizamiento, e infinito aprendizaje no los cambiaría jamás. En esta facultad conocí personas que sin duda jamás olvidare, agradezco aquellos maestros que fueron motivación para aumentar mis conocimientos, superarme, que me enseñaron a ser más paciente, pero sobre todo agradezco a la facultad por permitirme tocar la vida de los pacientes que atendí a lo largo de la carrera.

A la Dra. Gloria Gutiérrez-Venegas

Agradezco no sólo la oportunidad que la Dra. Gloria Gutiérrez-Venegas me dio para formar parte de su equipo de trabajo, también por su infinita paciencia y sus conocimientos que me ayudaron no solo mi crecimiento académico, también mi crecimiento personal y profesional.

Al Laboratorio de bioquímica

Al señor Antonio González Rosales que siempre tenía un momento para conversar a pesar de su laboriosa labor en el laboratorio. A Juan Arturo Gómez Mora por enseñarme todo en el laboratorio y por sus pláticas que hacían ameno el momento. A Marisol Rosas por su actitud siempre motivada y positiva.



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	7
2. ANTECEDENTES.....	8
2.1 PERIODONTO.....	8
2.2 MICROBIOTA ORAL.....	11
2.3 PLACA DENTOBACTERIANA.....	12
2.3.1 PLACA SUPRAGINGIVAL.....	12
2.3.2 PLACA SUBGINGIVAL.....	12
2.3.3 COLONIZADORES PRIMARIOS.....	13
2.3.4 COLONIZADORES SECUNDARIOS.....	14
2.4 PERIODONTITIS.....	14
2.4.1 CLASIFICACIÓN DE PERIODONTITIS.....	14
2.5 <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	17
2.5.1 FACTORES DE VIRULENCIA.....	18
2.5.2. LEUCOTOXINA.....	19
2.5.3 TOXINA DE DISTENSIÓN CITOLETAL.....	20
2.5.4 LIPOPOLISACÁRIDO.....	21
2.5.5 BIOFILM.....	21
2.5.6 INTERACCIÓN CON EL SISTEMA INMUNE.....	23
2.6 FLAVONOIDES.....	24
2.6.1 ESTRUCTURA Y CLASIFICACIÓN.....	25
2.6.2 PROPIEDADES TERAPÉUTICAS.....	27



3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	29
4. JUSTIFICACIÓN.....	30
5. OBJETIVOS.....	30
6. HIPÓTESIS.....	31
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
7.1 REACTIVOS.....	31
7.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	31
7.3 TAMANO DE MUESTRA.....	31
7.4. CRITERIOS CONSIDERADOS.....	32
7.5. MATERIAL Y EQUIPO.....	32
7.6. ACTIVACIÓN BACTERIANA.....	32
7.7 TINCIÓN DE GRAM.....	33
7.8. PRUEBA CATALASA.....	34
7.9. ENSAYO MC FARLAND.....	34
7.10. VIABILIDAD CELULAR.....	34
7.11. FORMACIÓN DE BIOFILM.....	35
7.12. ELABORACIÓN DE MEDIOS ESPECIALIZADOS.....	36
7.13. DISCOS DE INHIBICIÓN.....	36
8. RESULTADOS.....	37
8.1 VIABILIDAD CELULAR.....	37
8.2 FORMACIÓN DE BIOFILM.....	38
8.3 DISCOS DE INHIBICIÓN.....	40



9. DISCUSIÓN.....	41
10. CONCLUSIONES.....	43
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45



ABREVIATURAS

Asociación americana de periodoncia	AAP
Adenosín trifostato	ATP
Ácido desoxirribonucleico	DNA
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	A.a
Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil) -2,5-difeniltetrazólico	MTT
Toxina de distensión citoletal	CDT
Interleucina	IL
Periodontitis agresiva localizada	LAP
Lipopolisacárido	LPS
Microgramos	µg
Microlitros	MI
Mililitros	MI
Polimorfo nuclear	PMN



Resumen

La etiología de la enfermedad periodontal es multifactorial, sin embargo, determinados microorganismos presentes en la placa dentobacteriana son los principales causales. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) muestra gran relevancia en el desarrollo de la enfermedad, en particular en la periodontitis agresiva localizada. A.a se ha aislado de biopsias obtenidas de pacientes que padecen actinomicosis, endocarditis infecciosa, osteomielitis, glomerulonefritis, absceso cerebral, osteomielitis, neumonía e infecciones hepáticas. Este microorganismo fue aislado por primera ocasión por Klinger en 1912, es un cocobacilo, no encapsulado, con fimbrias y facultativo. Entre sus principales factores de virulencia se encuentran la leucotoxina, la toxina de distensión citoletal, endotoxina, proteína similar a GROE1, colagenasa, citotoxinas y epiteliotoxinas. Crece adherida a la superficie, por lo que el biofilm que forma esta bacteria, es resistente a la remoción aún mediante la utilización de diferentes agentes, entre los que se encuentran detergentes, proteasas, calor, sonicación y agitación. Los biofilm son más resistentes al tratamiento con antibióticos en comparación cuando crecen en condiciones planctónicas. La adherencia que posee es una propiedad que le confiere la capacidad de colonizar la mucosa oral, en el que participan los pilli y fimbrias. Por otra parte, los flavonoides son producto del metabolismo secundario de las plantas, estas moléculas les confieren diferentes ventajas adaptativas entre las que se encuentran la defensa contra patógenos, protección a los rayos UV y por su variada coloración actúan como atrayentes para promover la polinización. Por su efecto de protección ante patógenos, los flavonoides se han utilizado para evaluar sus propiedades anti-microbianas. Por este motivo en la presente investigación, nos proponemos evaluar el efecto de los flavonoides en la inhibición de biopelículas de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Nuestros resultados mostraron que los flavonoides afectaron la formación de biofilm, en donde se encontraron mejores resultados, fue en los experimentos de discos de inhibición donde se encontró que la combinación de quercetina y naringina mostraron más efecto de inhibición en comparación con el resto de los flavonoides aquí empleados. Por lo que concluimos que A.a se ve afectada de alguna manera por los distintos flavonoides empleados en el estudio.



1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la enfermedad periodontal junto con la caries bucal ha sido la patología bucal más frecuente a nivel mundial. De acuerdo con el informe publicado en 2016 por el Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Patologías Bucles (SIVEPAB), señala que el 56.7% de la población adulta presenta algún tipo de enfermedad periodontal¹. La enfermedad periodontal es un proceso de inflamación crónica que puede ser localizada o generalizada, causada por la acumulación de placa dentobacteriana promoviendo el deterioro de los tejidos periodontales; entre los factores sistémicos para el desarrollo de la enfermedad periodontal se encuentran: tabaquismo, alcoholismo, diabetes, deficiencia nutricional, nivel socioeconómico y consumo de medicamentos y entre los factores locales encontramos: mala higiene bucal, restauraciones sobre extendidas y factores microbianos. En estado de salud los microorganismos que forman parte la flora bucal desempeñan un papel benéfico para el huésped, no obstante, cuando se rompe el equilibrio los agentes microbianos juegan un papel importante en el desarrollo de diversas enfermedades. *A.a* es el agente patógeno principal relacionado con la periodontitis agresiva localizada, se ha demostrado que *A.a* cuenta con un gran número de factores de virulencia. Al ser la periodontitis una enfermedad con tanta prevalencia, el tratamiento de la misma es fundamental, es por ello que la creación e investigación de nuevos agentes terapéuticos es primordial para combatir esta enfermedad. Los flavonoides son polifenoles que han demostrado tener un gran potencial como agentes preventivos y terapéuticos causantes de la enfermedad periodontal.



2. ANTECEDENTES

2.1 PERIODONTO

El periodonto es el conjunto de estructuras que rodean y proporcionan soporte a los órganos dentarios. Está constituido por dos tejidos blandos: encía, ligamento periodontal y dos tejidos duros: cemento radicular y hueso alveolar. Entre las principales funciones del periodonto se encuentra la recepción y redistribución de las fuerzas de masticación. Se ha demostrado que el periodonto tiene varias funciones benéficas para los órganos dentarios, entre las cuales encontramos:

- Inserción del diente al alveolo.
- Resistir y resolver las fuerzas generadas por la masticación, habla y deglución.
- Mantener la integridad de los componentes separando el medio externo e interno.
- Defensa contra medios y/o microorganismos nocivos que estén presente en la cavidad oral.

ENCÍA

Es la mucosa que cubre el proceso alveolar, rodea los dientes y su parte cervical. Se extiende desde el margen de la encía marginal hasta la línea mucogingival. La encía tiene un color particular, que va desde el rosa pálido a rosa coral, ésta variación en la coloración se debe al grado de vascularización, espesor del epitelio y etnia. La encía igual presenta un puntilleo debido a la interdigitación de epitelio con el tejido conectivo⁵.

Existe un espacio que se crea entre la superficie dentaria y la encía marginal este es denominado surco gingival. En estado de salud se considera que tiene una profundidad de 0.5mm- 3 mm⁴.



LIGAMENTO PERIODONTAL

Consta de un tejido conectivo vascularizado el cual conecta con la pared interna del hueso alveolar; se ha encontrado que tiene un espacio en promedio de 0.2mm. Las fibras periodontales forman parte del ligamento periodontal, las fibras periodontales están compuestas por colágeno otorgando soporte y flexibilidad, a lo que se ha demostrado que es vital al momento de la distribución de fuerzas. Las funciones que tiene son nutricionales, sensoriales y de soporte. El ligamento periodontal es un tejido conectivo que rodea la raíz del diente relacionándolo de forma directa con el hueso, éste se continúa con el tejido conectivo de la encía y se comunica con el hueso mediante los canales vasculares que se encuentran ubicados en los espacios medulares del mismo^{2,3}.

Fibras Periodontales: se dividen en 5 clases

1. Fibras crestal-alveolares: Se ubican del cemento que se encuentra justo debajo del epitelio a la cresta alveolar. Estas fibras también corren del cemento a través de la cresta alveolar hasta el estrato fibroso del periostio cubriendo el hueso alveolar. Sus funciones son prevenir la extrusión del diente y resistir los movimientos laterales.
2. Fibras horizontales: Insertándose en el cemento corren por todo el eje longitudinal del diente hasta fijarse al hueso alveolar.
3. Fibras oblicuas: Es el grupo más grande de fibras periodontales. Se insertan en el cemento y se dirigen en dirección coronal oblicua al hueso. Su función es resistir las fuerzas verticales de la masticación y transformarlas en tensión que absorberá el hueso alveolar.
4. Fibras apicales: Surgen del cemento de la zona del foramen apical y se insertan en el hueso. No están presentes en dientes con raíz incompleta.



5. Fibras interradiculares: Se despliegan en abanico desde el cemento a la zona de la furca de dientes multirradiculares².

CEMENTO RADICULAR

El cemento es un tejido mesenquimatoso calcificado avascular que forma la cubierta exterior de la raíz anatómica, sirve para anclar el diente al hueso alveolar. Hay dos tipos de cementos celular y acelular.

El cemento proporciona un medio de retención por anclaje de las fibras colágenas del ligamento periodontal que fijan el diente al hueso alveolar, controla el ancho del espacio periodontal, permite la reorientación de fibras periodontales, conserva la inserción de dichas fibras durante el movimiento dentario, transmite las fuerzas oclusales a la membrana periodontal, repara la superficie radicular cuando se presentan fracturas o resorciones, y compensa el desgaste del diente por atrición^{2, 4}.

HUESO ALVEOLAR

El proceso alveolar es la porción del maxilar y de la mandíbula que forma y soporta los alvéolos dentales. El proceso alveolar se forma cuando los dientes erupcionan y se reabsorbe gradualmente cuando los dientes se pierden². El hueso alveolar se forma a partir de células de folículo dental como el cemento radicular y el ligamento periodontal⁵.

Presenta varias perforaciones en su superficie por donde pasan varios vasos sanguíneos, linfáticos, fibras nerviosas, hacia el ligamento periodontal. El hueso esponjoso contiene trabéculas óseas, cuya arquitectura y tamaño están en parte determinados genéticamente, en parte son el resultado de las fuerzas a las cuales están expuestos los dientes durante la función.

Los osteoblastos formadores de hueso o en reposo, incluidos los odontoclastos, que son células multinucleadas que participan en la



reabsorción ósea, producen una matriz que contiene principalmente proteoglucanos y glucoproteínas. Esta matriz ósea u osteoide experimenta una mineralización por depósito de minerales, como calcio y fosfato, que posteriormente se transforman en hidroxapatita. Durante el proceso de maduración y mineralización del osteoide, parte de los osteoblastos quedan atrapados en la matriz. Las células presentes en el osteoide y, después, en el tejido óseo mineralizado, se denominan osteocitos.

La reabsorción del hueso está vinculada siempre a los osteoclastos. Estas son células gigantes especializadas en la degradación de la matriz mineralizada (hueso, dentina, cemento) y, probablemente se generan a partir de los monocitos vasculares. La osteólisis (es decir, la degradación del hueso) es un proceso celular activo ejercido por los osteoclastos. Tanto el hueso cortical como el esponjoso experimentan continuamente un remodelado (es decir, reabsorción seguida de neoformación), en respuesta al desplazamiento de los dientes y a los cambios en las fuerzas funcionales que actúan sobre los dientes^{2,4}.

2.2 MICROBIOTA ORAL

La microbiota oral está conformada por muchos organismos como bacterias, virus, hongos, protozoos y arqueas. En estado de equilibrio todos ayudan a la promoción de la salud a través de resistencia a patógenos, modulación del sistema inmune creando una homeostasis que está sujeta a disponibilidad de proteínas, pH e interacción entre las mismas comunidades orales, pero cuando existe un desequilibrio generado por factores sistémicos, medicamentos, la microbiota oral juega un papel muy importante en la etiología de enfermedades sistémicas y de la cavidad oral⁵.



2.3 PLACA DENTOBACTERIANA

Se define como una comunidad bacteriana compuesta que se adhiere a las superficies dentales, prótesis y superficies orales⁴. Está constituida por polímeros de origen bacteriano y salival. Los microorganismos que forman esta placa dentobacteriana están en proximidad con otros, lo que crea interacciones entre sí.

Se presenta tanto en individuos sanos como enfermos, pero es un factor determinante para el desarrollo de enfermedades en la cavidad oral como caries y enfermedad periodontal.

De acuerdo a su localización la placa dentobacteriana se clasifica en subgingival y supragingival.

2.3.1 PLACA SUPRAGINGIVAL

Las superficies dentales suelen estar rodeadas de una película, compuesta de proteínas de origen salival, denominada película adquirida. Esta película juega un papel importante en la adhesión de los primeros colonizadores. Los primeros colonizadores suelen ser microorganismos gram positivos, cocos facultativos, principalmente *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Veillonella*. La placa supragingival abarca toda la corona clínica, prótesis y suele encontrarse en los carillos. Los microorganismos encontrados comúnmente en dichos sitios en adultos incluyen *Streptococcus mitis*, *S. sanguinis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Rothia dentocariosa*, *Actinomyces viscosus*, *Actinomyces naeslundii* y a veces especies de *Neisseria* y *Veillonella*^{6, 8}.

2.3.2 PLACA SUBGINGIVAL

Está compuesta principalmente por gram-negativos, anaerobios, al igual que el complejo supragingival se encuentra en la mayoría predominan especies como *Actinomyces*, pero igual podemos encontrar comúnmente

Porphyromonas gingivalis, *Treponema denticola*^{7, 8}. El crecimiento de la de placa subgingival está directamente relacionado con la alteración de los tejidos blandos. Después del asentamiento de la placa supragingival, el margen gingival muestra una típica inflamación y enrojecimiento estos cambios en el tejido generan una pseudo-bolsa, lo que da vía libre a los microorganismos a colonizar y crecer en este ambiente⁸.

2.3.3 COLONIZADORES PRIMARIOS

La adhesión de los primeros microorganismos a la superficie dentaria no es un evento casual se ha encontrado que los colonizadores tempranos tienen características que les permiten ser los primeros en adherirse. Soncrasky realizó una pirámide donde divide a los diferentes grupos de microorganismos de la placa dental (**figura 1**)⁹. Entre los colonizadores tempranos encontramos *Actinomices*, complejo amarillo, complejo verde, complejo morado⁶.



Fig 1. Diagrama de grupo de especies en la placa dentobacteriana

Asociación normal entre las bacterias de la placa dentobacteriana, en la parte superior de la pirámide encontramos a los colonizadores secundarios y en la base a los colonizadores tempranos. Adaptada de Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol 1998; 25: 134–144.



2.3.4 COLONIZADORES SECUNDARIOS

Una vez creada una primera superficie de microorganismos que se han asentado en la superficie dental estos colonizadores se comienzan a adherirse, por ello los colonizadores secundarios se encuentran en la parte más superficial de la placa dentobacteriana. Podemos encontrar que los colonizadores secundarios pertenecen a los complejos naranja y rojo. Estos complejos están fuertemente relacionados con la enfermedad periodontal⁶.

2.4 PERIODONTITIS

2.4.1 CLASIFICACION DE ENFERMEDADES PERIODONTALES

La enfermedad periodontal se clasificó y analizó por la American Academy of Periodontology (AAP) en 1999¹⁰.

Enfermedades Gingivales

- Enfermedades gingivales inducidas por placa
- Enfermedades gingivales modificadas por factores sistémicos
- Enfermedades gingivales por medicamentos
- Enfermedades gingivales modificadas por malnutrición
- Enfermedades gingivales no inducidas por placa
- Enfermedades gingivales de origen viral
- Origen micótico
- Origen bacteriano específico
- Lesiones gingivales de origen genético
- Manifestaciones gingivales de condiciones sistémicas
- Lesiones traumáticas



Enfermedades periodontales

- Periodontitis crónica
- Periodontitis agresiva
- Periodontitis como manifestación de enfermedades sistémicas
- Enfermedad periodontal necrosante
- Abscesos del periodonto
- Periodontitis asociadas a lesiones endodóncicas
- Condiciones y deformidades adquiridas o del desarrollo

ENFERMEDADES GINGIVALES

La mayor parte de las enfermedades gingivales están producidas por placa dental, la gingivitis se presenta en el periodonto sin pérdida o con pérdida de inserción, caracterizada por una inflamación y sangrado recurrente, al eliminar el factor etiológico, que es la placa dental el tejido gingival vuelve a la normalidad.

PERIODONTITIS

Es una enfermedad inflamatoria de los tejidos de soporte de los dientes provocada por microorganismos o grupo de microorganismos específicos en especial los Gram positivos, que tiene como resultado la destrucción progresiva del ligamento periodontal y hueso alveolar con formación de bolsas, recesión o ambas⁴. Se clasifican de acuerdo a las áreas afectadas como, localizada; la extensión se caracteriza al tener menos del 30 % de los sitios afectados, en cambio la periodontitis generalizada; abarca más del 30% de las zonas afectadas^{2, 3}. **Figura 2³⁴**.

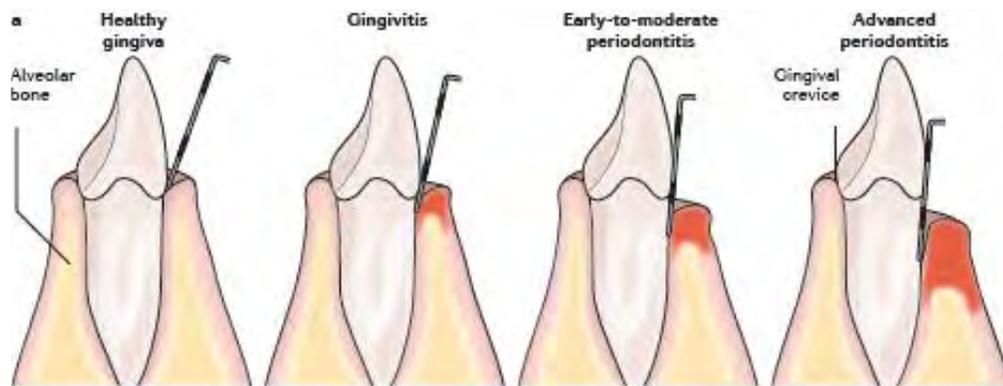


Fig 2. Enfermedad periodontal. La figura muestra el avance de la enfermedad periodontal causando inflamación de los tejidos blandos y pérdida de tejidos duros. Adaptada de: Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. Nat Rev Dis Primers. 2017 Jun 22;3:17038. doi: 10.1038/nrdp.2017.38.

PERIODONTITIS CRÓNICA

Es la forma más común de periodontitis que está influenciada por factores locales o sistémicos, ambientales, se puede describir la enfermedad por la gravedad de la misma como ligera (1 a 2 mm), moderada (3 a 4 mm) o grave (5 o más), en base a la pérdida de inserción. Con frecuencia se ha encontrado formación de cálculo subgingival², el avance de esta enfermedad es de lento a moderado, con posibles periodos de evolución rápida.

PERIODONTITIS AGRESIVA

Es una clase de periodontitis con avance rápido de la enfermedad que se observa en pacientes aparentemente sanos en aspectos como ausencia de acumulaciones grades de placa y/o cálculo, pero con historial clínico familiar con antecedentes lo que llega a sugerir tendencias genéticas, está relacionada a afecciones microbiológicas e inmunológicas muestra las características clínicas de pérdida de inserción. A.a se ha encontrado en tomas clínicas de este tipo de periodontitis por lo cual se le ha figurado como pieza clave para la triada de la enfermedad¹¹.



ENFERMEDADES PERIODONTALES NECROSANTES.

Este tipo de enfermedades se han descrito con la presencia de úlceras y necrosis en la encía papilar y marginal cubiertas por una pseudo membrana blanco-amarillenta, papilas romas y hemorragia espontánea provocada, dolor y aliento fétido. Suelen ser lesiones agudas que responden bien a la terapia antimicrobiana combinada^{2, 3} y tienen una etiología bacteriana. Los factores predisponentes son el estrés psicológico, tabaquismo, inmunosupresión, mal nutrición.

2.5 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

A.a es un miembro de la familia *Pasteurellaceae*¹² y del grupo HAECK conocido por la participación de sus integrantes en enfermedades bacterianas. Por muchos años esta bacteria fue conocida como *Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus aphrophilus*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens* y *Kingella kingae* y clasificada como *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, pero Nørskov –Laursetn y Kilian la nombraron *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* en el año 2006¹². *A.a* es un microorganismo Gram-negativo, capnófilico, anaerobio facultativo, es capaz de fermentar carbohidratos que le sirven como fuente de energía. Es el principal agente bacteriano causal de la periodontitis en jóvenes y adolescentes (Periodontitis agresiva localizada)¹³. Muestra una morfología circular, brillante, lisa (**figura 3**).



Fig 3. Muestra la clásica formación de colonias de *A.a* en agar sangre. Adaptada de. Roberto Flores R. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Rev. chil. infectol. vol.28 no.6 Santiago dic. 2011 Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182011000700011.

Se han descrito 5 tipos de serotipos de *A.a* (a-e), el serotipo B es más común en periodontitis agresiva¹⁴. El hábitat natural de *A.a* es la cavidad oral pero también se le ha aislado en una gran variedad de infecciones no orales como: Endocarditis, bacteriemia, septicemia, aterosclerosis, neumonía, osteomielitis, infecciones urinarias, infecciones de la piel y diferentes tipos de abscesos¹¹.

2.5.1 FACTORES DE VIRULENCIA

El potencial de virulencia de *A.a* puede ser ocasionado por tres factores:

- 1.- Factores que modulan y promueven la colonización y la inflamación.
- 2.- Factores que promueven la destrucción de tejidos
- 3.- Factores que inhiben la reparación de tejidos.

Estos factores incluyen exotoxinas, exopolisacáridos, estructuras de la pared celular.

La enfermedad periodontal puede ser producida por diversos factores en los que se encuentran los genéticos, factores ambientales, desórdenes hematológicos^{2,3}. Estudios sugieren que infecciones bacterianas crónicas promueven cáncer oral²⁹



2.5.2 LEUCOTOXINA

Es uno de los principales factores de virulencia de *A.a* la cual puede destruir células de defensa inmunológica¹⁶. Pertenece al grupo de citolisinas bacterianas Repeat-in-Toxin (RTX). El operón de esta toxina consiste en cuatro genes: *ltxC*, *ltxA*, *ltxB* y *ltxD*. Cada uno con un papel importante para la producción y uso de esta toxina¹¹. La leucotoxicidad de las colonias de *A.a* es de 61%¹⁶. *A.a* puede afectar a leucocitos polimorfonucleares (PMNs), monocitos, macrófagos, linfocitos y eritrocitos^{17, 18}. La leucotoxina de *A.a* tiene diferentes formas de actuar (**figura 4**), Se ha demostrado que la leucotoxina con ayuda de Poli-N-acetilglucosamina puede evitar la destrucción celular de *A.a* efectuada por macrófagos¹⁶. Poli-N-acetilglucosamina es un polisacárido superficial que media la formación de biofilm, adhesión intercelular y resistencia a detergentes^{10, 11}. Se ha encontrado que la leucotoxina de *A.a* serotipo b puede incrementar el riesgo de pérdida de hueso periodontal¹⁶. La pérdida de hueso debido a *A.a* se debe a la activación y formación de osteoclastos en el área afectada¹⁹. Se ha sugerido que estos eventos tienen origen por citosinas pro-inflamatorias como IL-1²⁰. El aumento de IL-1 está relacionado con el progreso de la enfermedad periodontal²¹. LFA-1 es un receptor alterno para *ltxA* en linfocitos, la unión a este receptor induce la vía apoptótica de las caspasa 1 -dependiente en los monocitos²¹. Monocitos/macrófagos son lisados por la activación de caspasa 1 y el incremento de IL-1 por esto estas células son muy sensibles a *ltx*²¹. En artículos^{23,24} se sugiere que la leucotoxina tiene efectos en los procesos de coagulación, esta es homóloga de B2GPI que es una proteína plasmática que inhibe la activación de protombinasa, producción de factor plaquetario IX²⁴.

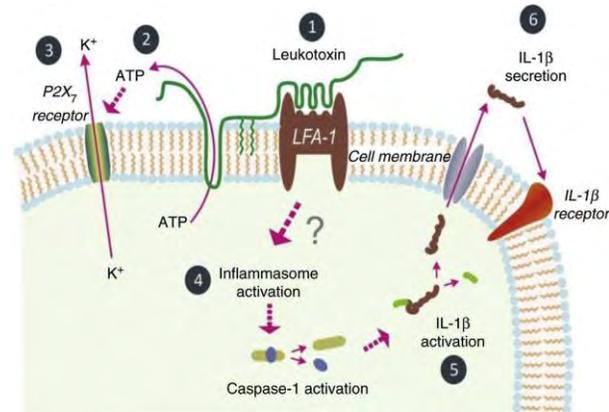


Fig 4. Mecanismos de acción de leucotoxina. 1) LTA se une a LFA-1 el cual activa la liberación de ATP 2) el ATP liberado se une al receptor P2X7 3) lo que provoca la liberación de K⁺ fuera de la célula 4) la unión de LTA con LFA activa la vía de la caspasa-1 5) la cual puede activar a IL-1B y 6) causar la secreción masiva de IL-1B generando enfermedad periodontal. Pourya Gholizadeha, Ali Pormohammad, Hosein Eslami., Oral pathogenesis of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Microbial Pathogenesis* 113 (2017) 303–311,

2.5.3 TOXINA DE DISTENSIÓN CITOLETAL

Es otro factor de virulencia importante que está involucrado en la modulación del sistema inmune. CDT tiene tres sub unidades (A-c), cdtB es la unidad activa, cdtA y cdtC son ligandos a los receptores de la célula^{11,25}. El objetivo de cdtB es suprimir el ciclo celular en las fases G0/G1 y G2/M dañando el DNA mediante la actividad de fosfatasas, las células que se ven afectadas por estas toxinas son macrófagos, células T y varios tipos de células epiteliales²⁵. Se ha encontrado que los fibroblastos son susceptibles a CDT pero las células del ligamento periodontal no lo son²⁵.

CDT está relacionada con periodontitis agresiva localizada (LAP), anticuerpos contra CDT han sido encontrados en suero (muestras) de algunos pacientes²⁵. Otra función de CDT es la interrupción de funciones de macrófagos a través de la producción y activación de citocinas²⁶. Además, puede inducir apoptosis de macrófagos por medio del mecanismo: fosfo independientes (AIF)²⁷.



2.5.4 LIPOPOLISACÁRIDO

Es una molécula larga constituida por un lípido A y un polisacárido. LPA de A.a induce mediadores pro inflamatorios^{28, 29}. Li et al. Sugiere que LPA induce a caspasas que producen apoptosis celular de la línea BeWo³⁰. (línea celular *Homo sapiens* placental). LPS afecta a la producción de óxido nítrico de igual manera activa numerosos mediadores proinflamatorios y citocinas¹¹. Estos cambios pato fisiológicos producen inflamación aguda o crónica resultando en daño tisular. LPA reacciona induciendo TLR-4 el cual estimula células e induce la expresión de Proteína quimioatraedora-1 (MCP-1), Proteína inflamatoria de macrófago-1 (MIP-1). La función de MIP-1 es la inducción de la infiltración de macrófagos, linfocitos, PMN's dentro de los sitios con periodontitis dando, así como resultado resorción ósea y daño tejido periodontal³¹.

Puede activar diferentes vías de señalización así como la dependiente de Myd88 (Proteína primaria responsable diferenciación mieloide) y la activación de RANKL (receptor activador de NF- κ B) pueden ser responsables de la resorción alveolar^{32, 33}. LPA también afecta a la diferenciación de células reparadoras como los osteoclastos. La activación de MMP-2 es otra manera en la que LPA afecta en la periodontitis con la degeneración de tejido conectivo¹¹.

2.5.5 BIOFILM

Se puede definir como comunidades estructuradas de microorganismos adheridas a una superficie y embebidas en una matriz extra celular³⁴.

La cavidad bucal es un espacio que está en constantes cambios, ya sea de temperatura por el hecho de tomar bebidas frías o calientes, la ingesta de múltiples y diferentes clases de alimentos que proporcionan una fuente de energía para los microorganismos, incluso los cambios de pH por bebidas como refrescos. Por lo anteriormente mencionado los microorganismos se han

adaptado y desarrollado un complejo mecanismo para el asentamiento, formación y maduración de biofilm en la cavidad oral. La formación de biofilm se puede identificar por tres etapas (**figura 5**).

Fijación

Esta primera etapa es representada por microorganismos que se adhieren a la superficie, en el caso de los biofilm dentales a la superficie dental, estos microorganismos se van acomodando de acuerdo a las interacciones de los mismos, suelen ser los colonizadores primarios, la fijación de estas bacterias esta mediada por las proteínas, carbohidratos que están en la cavidad bucal y en la película adherida. La adhesión en esta etapa es muy débil.

Maduración

En esta etapa una vez asentada el biofilm se forman micro colonias de bacterias, esto da paso a un cambio de metabolismo del biofilm, este cambio permite una adhesión más específica y más resistente. En esta etapa se forma la matriz polimérica extra celular, que es donde está embebido el biofilm, la cual está constituida por exopolisacáridos, ácidos nucleicos, proteínas³⁴.

Dispersión:

Una vez maduro el biofilm, la demanda de recursos y competencia por los mismos obliga a las bacterias a moverse para poder obtener los nutrientes que necesitan.

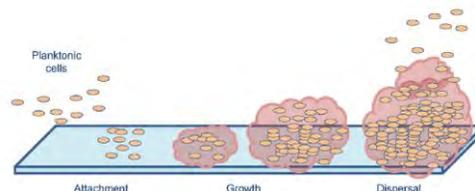


Fig 5. Formación de Biofilm

Diagrama típico de crecimiento de biofilm, donde se aprecian las etapas de desarrollo de biofilm. Adaptada de Nancy J. Lin., Biofilm over teeth and restorations: What do we need to know?, J. d e n t a l m a t e r i a l s 3 3 (2 0 1 7) 667–680.



Normalmente las bacterias juegan un papel importante en la salud bucal previniendo el desarrollo predominante de agentes patógenos como *A.a*, sin embargo, *A.a* cuenta con varias proteínas que ayudan a la regulación y formación de biofilm a través de proteínas que permiten la regulación de factores de virulencia, como la captación de hierro^{35,36}, en ambientes anaeróbicos *A.a* podrá activar genes que modificarán su metabolismo para poder adaptarse al ambiente del hospedero³⁵. Además, cuenta con estructuras extracelulares como las fimbrias y pilis que son requeridos para la adhesión a la superficie.

2.5.6 INTERACCIÓN CON EL SISTEMA INMUNE

Como ya se ha mencionado *A.a* tiene diversas formas de interactuar con el sistema inmune del hospedero como: LPS, GroEL, Proteína asociada a lípido-A que pueden inducir reabsorción ósea o inducir diferenciación de osteoclastos. En la periodontitis se ha encontrado que los niveles de inmunoglobulinas G e interleucinas se encuentran disminuidas y estas naturalmente actúan como controladores de citoquinas pro inflamatorias³⁷. La activación de receptores tipo Toll (TLR) en particular TRL2 y TRL4 es otra manera en la que LPA de *A.a* puede producir resorción ósea y daño tisular¹¹. *A.a* ha desarrollado formas para defenderse de los cambios en el medio bucal producidos por inmunidad innata, como los cambios de temperatura, donde *A.a* activa proteínas que reaccionan al calor y la protegen de efectos letales tales son: GroEL, Dnak, HtpG^{38,39}.

GroEL no solo protege a *A.a*, sino que permite su crecimiento en las bolsas periodontales a través de proliferación del epitelio lo que permite a la bacteria adentrarse más profundamente en las bolsas periodontales. GroEL ha mostrado tener efectos citotóxicos en células epiteliales⁴⁰, también puede estimular varias células de la defensa innata del hospedero, lo que sugiere que



esta proteína modula células de defensa innata a través de la manipulación de la respuesta inmune del hospedero^{40,41}.

Las células polimorfonucleares (PMNs) son la primera línea de defensa celular y de la activación de la respuesta inmune del hospedero contra bacterias. PMNs eliminan a *A.a* por medio de mecanismos reactivos de oxígeno y gránulos citoplasmáticos. También patógenos como *Porphyromonas.gingivals* que son susceptibles a estos mecanismos de defensa. De acuerdo a Guentsch et al., altos niveles de IgG contra *A.a* y *P.gingivalis* promueve la fagocitosis de PMNs en periodontitis crónica y agresiva⁴².

A.a ha sido identificada en muestras obtenidas de pacientes que padecen periodontitis generalizada crónica y periodontitis agresiva localizada. *A.a* puede producir resorción ósea y daño tisular por medio de diferentes maneras. Muchos factores intervienen como la capacidad inmune del hospedero, hábitos como fumar y tomar alcohol. *A.a* se vale de diferentes proteínas para inducir la expresión de citocinas, las cuales son la principal causa de destrucción tisular y resorción ósea. Un mejoramiento de la salud bucal a través de la higiene puede reducir el riesgo de resorción ósea causada por bacterias orales, especialmente *A.a*.

2.6 FLAVONOIDES

Los flavonoides comprenden un vasto grupo de compuestos polifenólicos que se encuentran en frutos y vegetales, así como en té negro, cerveza, vino tinto, los flavonoides son resultado del metabolismo secundario de las plantas, se ha demostrado ampliamente que tienen efectos positivos para la salud del ser humano^{43,44}. Por sus fuentes de origen los flavonoides se encuentran comúnmente en la dieta diaria. Los flavonoides se han estudiado recientemente por su potencial terapéutico preventivo y de tratamiento contra algunas enfermedades como: cáncer, enfermedades cardiovasculares y enfermedades neurodegenerativas.

Las propiedades terapéuticas de los flavonoides más reconocidas son: anti-cancerígena, anti-oxidante, anti-inflamatoria, antimicrobiana^{44,45}. Los compuestos fenólicos en hortalizas y frutos comprenden el grupo con mayor acción anti-oxidativa en la naturaleza.

2.6.1 ESTRUCTURA Y CLASIFICACIÓN

Los flavonoides se pueden clasificar en seis subfamilias en base a su estructura molecular (**Tabla I**). Se han identificado más de 8000 compuestos, todos tienen la característica de un esqueleto base de 15 carbonos (**figura 6**), C6-C3-C6, que consiste en dos anillos bencénicos (A y B) unidos mediante un anillo heterocíclico derivado de pirano (C)⁴⁵.

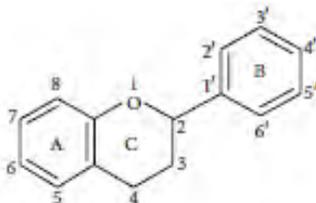
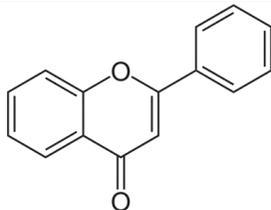


Fig 6. Estructura básica de los flavonoides

Tabla I Clasificación de los Flavonoides.		
GRUPO	ESTRUCTURA BASE	EJEMPLO
Flavonas	 <p>Diagrama de la estructura base de una flavona, que muestra un esqueleto de 15 carbonos (C6-C3-C6) con un grupo carbonilo (C=O) en el anillo C y un grupo hidroxilo (OH) en el anillo C.</p>	Luteolina Apigenina Crisina

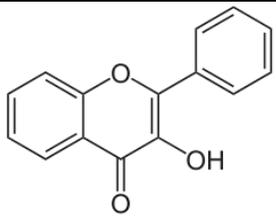
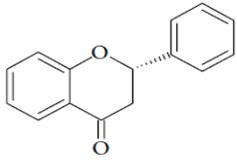
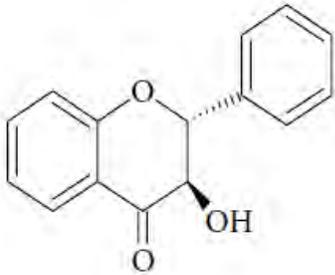
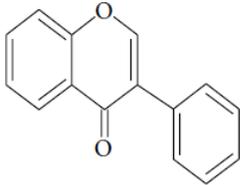
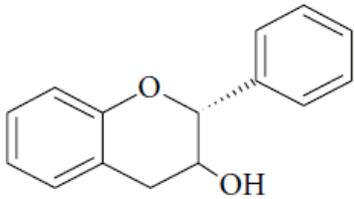
Flavonoles		Quercetina Kaempferol Galagina
Flavanonas		Heperitina Naringina
Flavanonoles		Taxifolin
Isoflavonas		Genisteína Diadzeína
Flavan 3-oles		Catequina Epicatequina

Tabla 1. Diferentes grupos de flavonoides y sus estructuras químicas

Adaptada de Shashank Kumar and Abhay K. Pandey., Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. The scitific world Jurnal, 2013, 1-16.



2.6.2 PROPIEDADES TERAPÉUTICAS

La relevancia de los flavonoides radica en la importancia de las propiedades biológicas que han demostrado como agentes terapéuticos y de prevención de algunas enfermedades. Algunas de las propiedades terapéuticas que han demostrado son:

- **Anti-oxidante:** La gran cantidad de radicales libres en el organismo están disponibles a oxidar biomoléculas, generando daño tisular, muerte celular, enfermedades como cáncer, desordenes neuróticos. El efecto anti-oxidante depende del arreglo de los grupos funcionales sobre la estructura nuclear. La captación, sustitución o el número total de hidroxilo influyen en la eliminación de radicales y moléculas de iones quelantes^{44, 45}.
- **Antibacteriana:** La resistencia de ciertos agentes patógenos microbianos ante antibióticos se ha vuelto cada vez más importante desde el punto de vista de salud pública a nivel mundial. Se ha encontrado que los flavonoides tienen un gran potencial de acción anti bacteriana en una amplia gama de bacterias. Esto posiblemente se debe a que tienen varios objetivos celulares, como a la adhesión a la membrana plasmática de las bacterias, además de que logran desactivar ciertas enzimas, adhesinas microbianas, interferencia en la síntesis de DNA y proteínas de transporte⁴⁴⁻⁴⁸.

Estudios han demostrado que los flavonoides tienen propiedades bactericidas, anti biofilm, contra agentes patógenos causantes de la enfermedad periodontal como *A. a* y *Porphyromonas gingivalis*, con experimentos tipo dosis- dependientes^{49, 50}.

Los flavonoides no solo han demostrado tener propiedades contra bacterias si no también; estudios muestran como diferentes tipos de flavonoides tienen efecto antifúngico contra *Candida albicans* que es el principal patógeno en la candidiasis oral^{51, 52}.



- Anti-inflamatoria: Ciertos flavonoides han demostrado tener propiedades anti inflamatorias y analgésicas, se ha sugerido que los flavonoides inhiben cinasas debido a la competencia de unión con ATP de los flavonoides a los sitios catalizadores de las enzimas. Se ha reportado que los flavonoides pueden inhibir la expresión de óxido nítrico, ciclooxigenasa y lipooxigenasa que son esenciales para la producción de prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos^{44, 45}.
- Anti-cancerígena: Los flavonoides han demostrado tener un efecto potencial terapéutico como prevención contra diferentes tipos de cáncer, así como el desarrollo de los mismos durante la carcinogénesis. Se han sugerido muchas vías de acción de los flavonoides contra el cáncer las más reconocidas son: Inhibición de p53 mutada, arresto del ciclo celular, inhibición de tirosin cinasa, inhibición de proteínas de choque térmico, capacidad de unión a receptores de estrógeno, inhibición de la expresión de proteínas RAS^{44, 45}.
- Actividad antiviral: Se ha demostrado que ciertos flavonoides tienen actividad antiviral contra algunos virus como el virus herpes simple (HSV). Se ha propuesto como mecanismo de acción la inhibición de la polimerasa viral y la unión al ácido nucleico^{44, 45}.

Por todas las propiedades terapéuticas que presentan los flavonoides es que en la medicina actual los compuestos de origen natural juegan un papel tan importante en el desarrollo de nuevas técnicas y nuevos tratamientos. Actualmente muchos microorganismos son resistentes a antibióticos, esto se da más en pacientes con inmunosupresión, en donde se busca tratamientos menos invasivos, los flavonoides pueden ser la respuesta ante esta necesidad de salud pública.



3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los avances de la ciencia en el conocimiento y desarrollo de técnicas bioquímicas y moleculares, han permitido identificar a los agentes patógenos de las enfermedades de la cavidad oral. *Aggregatibacter actinomycetemcomytans* ha sido relacionado como el patógeno principal en la enfermedad periodontal agresiva localizada, la cual es más frecuente en jóvenes, este patógeno cuenta con diversos factores de virulencia que modifican la respuesta inmune del hospedero, permiten adaptarse a la respuesta del hospedero y promueven la destrucción ósea de los tejidos de soporte.

Además, ocupa proteínas para fomentar la formación de biofilms que son la principal etiología de las enfermedades periodontales, la cual actualmente tiene una gran prevalencia en la población mexicana. A pesar del desarrollo de técnicas y agentes terapéuticos, los tratamientos siguen siendo muy limitados.

Los flavonoides son polifenoles que han demostrado tener una gran variedad de propiedades terapéuticas como: anti cancerígena, anti vírica, anti oxidativa, anti inflamatoria, antibacteriana.

Por estos motivos ¿Los flavonoides pueden ser una alternativa terapéutica contra las infecciones por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*?, ¿Los flavonoides afectan el crecimiento de biofilms de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*?



4. JUSTIFICACIÓN

El hecho de que los clínicos no podamos identificar de manera fácil y exacta a los microorganismos de la cavidad bucal hace encontrar nuevas sustancias con propiedades antimicrobianas para la práctica odontológica que puedan tratar infecciones por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, para así devolver la salud y la función de los individuos que presenten este tipo de infección. Investigar este nuevo tipo de medicamentos no solo tendrá beneficios para combatir enfermedades contra microorganismos si no tiene un gran número de utilidades gracias a sus propiedades terapéuticas que han demostrado. El estudio *in vitro* de los flavonoides permitirá entender el efecto que tienen en el desarrollo de formación de biofilms.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de los flavonoides en la bacteria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 43718) para determinar si poseen propiedades antibacterianas.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el efecto de los flavonoides sobre la viabilidad celular en *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 43718).



- Determinar las condiciones óptimas para el crecimiento de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.
- Evaluar el efecto de quercetina en la formación de biofilm en *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* en medio líquido.
- Evaluar el efecto de quercetina, naringina, morina y sus combinaciones en la formación de biofilm en *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* en medio sólido.

6. HIPÓTESIS

Si los flavonoides tienen efecto antibacteriano en *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 43718), entonces evitara la formación de biofilm.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 REACTIVOS

Quercetina (SIGMA), naringina (SIGMA), morina (SIGMA), Medio BHI (DIBICO® México), medio agar sangre (DIBICO® México), Sangre de cordero defibrinada, vitamina K, hemina, glucosa, sacarosa, lactosa, Safranina (HYCEL), lugol, cristal violeta, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio (MTT), ampicilina(SIGMA), Ácido acético 33%, Formalina 10%.

7.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO:

Aggregatibacter actinomycetemcomitans (ATCC 43718).

7.3 TAMAÑO DE LA MUESTRA

150, 000,000 bacterias.



7.4 CRITERIOS CONSIDERADOS

Criterios de inclusión: Cultivos con una correcta morfología.

Criterios de exclusión: Cultivos catalasa negativos, morfología amorfa.

Criterios de eliminación: Cultivos contaminados.

7.5 MATERIAL Y EQUIPO

- Agitador magnético (Thermolyne)
- Auto clave
- Balanza (Sartorius)
- Campana de flujo laminar (The Baker Company)
- Celdas UV-VIS (Eppendorf)
- Placas Petri
- Placas de 24 pozos
- Jarra de anaerobiosis
- Placas de 96 pozos
- Espectrofotómetro UV/VIS (Optizen)
- Lector de placas (Biotek)
- Incubadora Felisa
- Puntas de pipetas
- Vórtex (Science MED)

7.6 ACTIVACIÓN DE LA BACTERIA

La bacteria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* se obtuvo de (ATCC 43718). Fue activada cerca de mecheros para garantizar esterilidad. Se inoculó en medio agar sangre +hemina+ vitamina k bajo condiciones estériles

con técnica de cultivo masivo. Las muestras se incubaron a 37C° en anaerobiosis.

7.7 TINCIÓN DE GRAM

Se tomó una muestra de la bacteria *A. actinomycetemcomitans* (ATCC 43718) con un asa bacteriológica estéril. La muestra se colocó en un portaobjetos limpio que tenía una gota de agua destilada y se esparció por la superficie del cubre objeto, se esperó a que se secase por completo la muestra antes de comenzar con las tinciones, los pasos a seguir en la tinción de Gram fueron: Se tiñó con cristal violeta agregando suficiente colorante sobre toda la superficie de la muestra durante 1 minuto, se lavó con agua suavemente, se colocó el mordiente lugol y se dejó actuar durante 1 minuto, después se lavó suavemente para retirar el mordiente, se decoloró con alcohol cetona con el cuidado de no sobre decolorar la muestra, se lavó nuevamente con agua suavemente, posteriormente se agregó safranina al 0.1% durante 3 minutos, se lavó suavemente la muestra y finalmente dejó secar la muestra para poderla observar al microscopio (**Figura 7**).

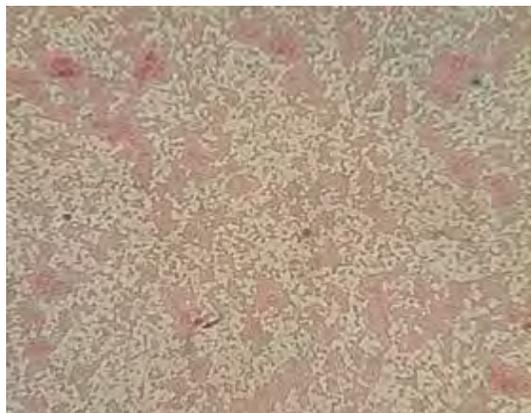


Fig 7. Tinción de gram

Debido a la composición de la pared celular que es más afín al colorante (cristal violeta) por a la bicapa lipídica externa se observa con color fucsia en *A.a*, lo que determina que es Gram negativo, imagen ampliada a 100 x.



7.8 PRUEBA DE CATALASA

Se tomó una muestra de la bacteria que se encontraba en agar sangre + hemina + vitamina k con un asa estéril. Se colocó la muestra en un porta objetos que contenía una gota de agua oxigenada y se observaron los resultados. La bacteria mostro ser catalasa positiva.

7.9 ENSAYO MC FARLAND

Se prepararon 7 tubos de ensayo con medio BHI (DIFCO®, St. Louis Mo) conteniendo 4.5 ml y 1 con 5ml. *A. a* (ATCC 43718) la cual, fue inoculada en el tubo con 5ml de medio BHI y de este tubo se comenzaron las diluciones seriadas en tubos con 4.5 ml, se tomaron y pasaron 500µl al siguiente tubo para continuar con las diluciones (-1; -2,-3; -4; -5; -6; -7). Con los stocks (-6 y -7) se tomaron 10 µl y 25 µl y las muestras fueron inoculadas en Agar sangre+ hemina +vitamina K (DIFCO, St Louis, Mo EUA) por técnica cultivo masivo. Posteriormente las colonias fueron contadas para así poder sacar el cálculo para asegurar el número de bacterias en los siguientes experimentos.

7.10 VIABILIDAD CELULAR

Se inocularon todos los pozos con 2.5µl que contenían aproximadamente 15,000.000 de bacterias, las muestras se incubaron a 37°C en condiciones de anaerobiosis. Después de 24 hrs de incubación se comenzó el tratamiento, tal se repitió a las 48 y 72 hrs. En cada tratamiento se colocó en los pozos correspondientes el flavonoide quercetina en diferentes concentraciones (1000 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml).

Para realizar el ensayo MTT se pesó 5mg de MTT y se disolvió en 1 ml de PBS. Se agregó la combinación a 10 ml de medio BHI (DIFCO® St Louis Mo



EUA). Se retiró el medio de la placa de 96 pozos. Se agregó 100µl de la combinación en cada pozo. Se dejó incubando por 4hrs en condiciones de anaerobiosis a 37°C. Finalmente después de haber succionado el medio y se agregó isopropanol ácido y se leyeron los resultados en espectrofotómetro a 540 nm.

7.11 FORMACIÓN DE BIOFILM

Para el tratamiento de formación de biofilm se realizó un curso temporal y dosis-respuesta en una placa de 96 pozos, conformada por cinco grupos; basal (Sin tratamiento), quercetina a 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml y 125 µg/ml tratados a 24, 48,72 hrs. Teniendo un volumen final de 100µl en cada uno pozos; 2.5 µl que correspondían aproximadamente a 15,000.000 de bacterias, 47.5 µl de medio y 50µl de tratamiento. Al finalizar el tratamiento, se llevó a cabo la tinción de biofilm que consistió en succionar el medio cuidadosamente sin dañar el biofilm, se lavó con PBS, se fijó con 500µl de formalina 10% por 10 minutos, se tiñó con 500µl de safranina al 0.1% durante 30 min, posteriormente se volvió a succionar el sobrenadante, se disolvió con ácido acético 33% y finalmente la placa se leyó en el espectrofotómetro a 540 nm.

7.12 ELABORACIÓN DE MEDIOS ESPECIALIZADOS

A lo largo del trabajo de experimentación se elaboraron diferentes tipos de medios BHI (DIFCO® St. Louis Mo EUA) los cuales se adicionaron con carbohidratos; Sacarosa, lactosa, glucosa al 0.5 %. Con el fin de poder observar y cuantificar cual sería el medio más óptimo para el cultivo de la bacteria, algunos aparte de haberles adicionado con carbohidratos se los hicieron con un pH específico.

Se realizó un ensayo comparativo de medio BHI con diferentes carbohidratos y a diferentes pH para observar en donde se encontraba mejor crecimiento de

A.a. Para realizar el ensayo comparativo en una placa de 24 pozos, dónde se realizó un curso temporal conformado por tres grupos; BHI adicionado con glucosa al 0.5% pH 7, BHI adicionado con lactosa pH 6, BHI adicionado con sacarosa pH 5. Se incubaron durante 48 hrs, se realizó el ensayo de formación de biofilm, tinción de biofilms y finalmente se leyeron en el espectrofotómetro a 540nm.

7.13. DISCOS DE INHIBICIÓN

A.a se inoculó en cajas de cultivo con medio BHI (DIBICO® México) mediante técnica de siembra masiva en la superficie del agar. Al tomar 5 µl 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. Se colocaron los discos impregnados con los tratamientos (Quercetina 1mg/ml, Morina1mg/ml, Naringina1mg/ml, y sus combinaciones), tomando como control DMSO y ampicilina. Las cajas se dividieron en 8 secciones esto en base al número de reactivos que se utilizaron. Se incubaron las cajas a 37°C en condiciones de anaerobiosis durante 24 hrs y se observaron los resultados (**Fig.8**).

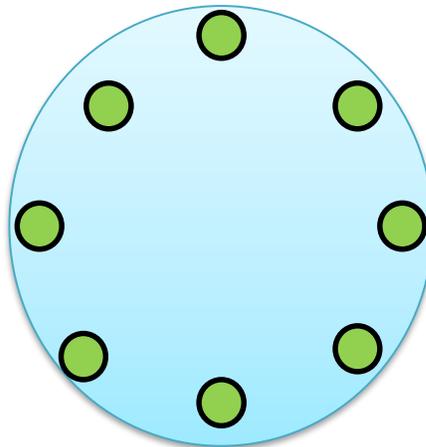


Figura 8. Discos de inhibición.

Se muestra como se colocaron los discos en agar BHI.
Fuente directa.

8. RESULTADOS

8.1 VIABILIDAD CELULAR (MTT)

Con el fin de evaluar si los flavonoides afectaron la viabilidad celular en la bacteria *A.a* (ATCC 43718), se realizó el ensayo de Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Se encontró que el flavonoide quercetina ejerció un efecto antibacteriano en *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 43718) de manera dosis dependiente a 1000 μ g/ml (**figura 9**).

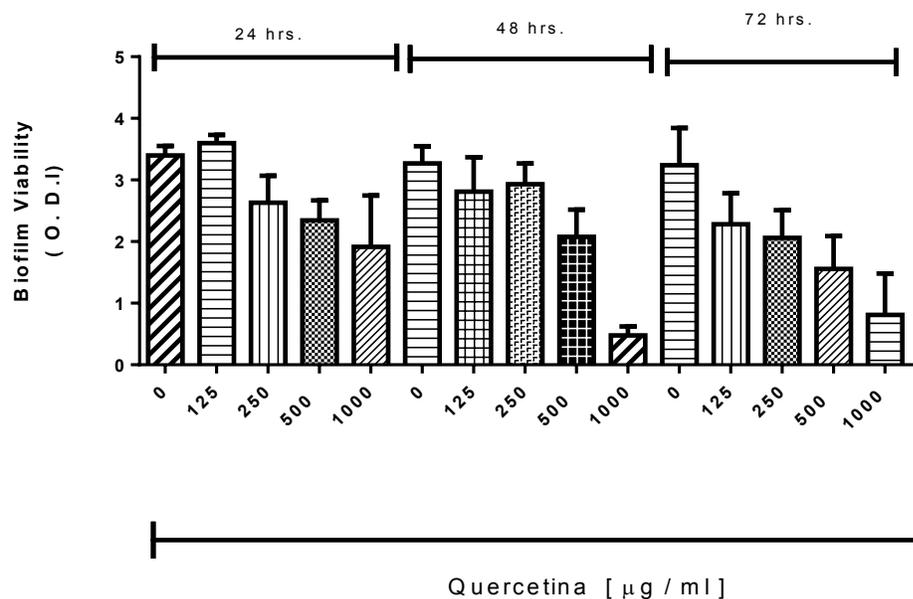


Figura 9. Ensayo de Viabilidad Celular

En la gráfica se muestra el curso temporal del efecto de quercetina en la viabilidad de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* a una dosis-dependiente. Las bacterias se incubaron por 24 horas y posteriormente se trataron con quercetina, dosis y tiempos indicados, posteriormente se trataron con MTT (5 mg/ml) durante 4h. Al término se retiró el reactivo y los cristales se disolvieron con alcohol ácido, al finalizar se leyeron a 540 nm.

8.2 FORMACIÓN DE BIOFILM.

Se encontró que el crecimiento de la bacteria fue irregular con respecto al grupo basal (**Figura 10**), por lo que se realizó un ensayo comparativo en diferentes condiciones del medio BHI. Se identificó el medio óptimo que consistió en sacarosa al 0.5 % con pH 5 (**Figura 11**); se halló que quercetina mantenía los niveles más bajos en formación de biofilm en comparación, con los grupos basales (**Figura 12**).

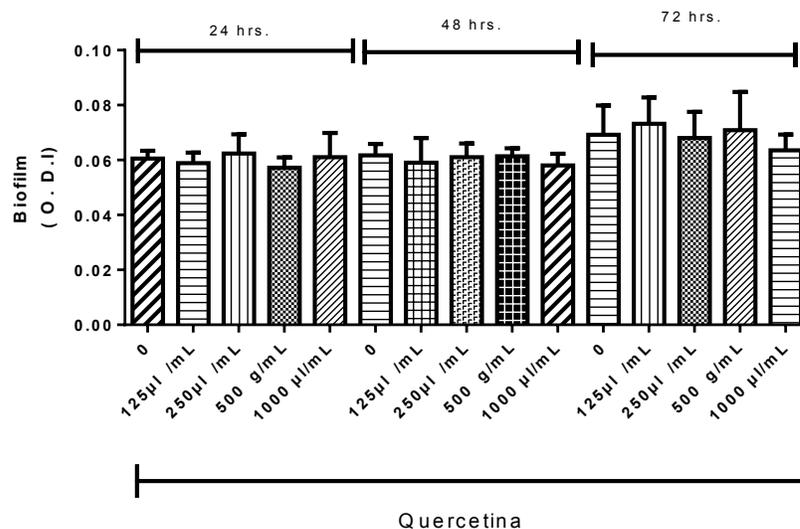


Figura 10. Ensayo de formación de biofilm

La gráfica muestra el curso temporal del efecto de quercetina en la formación de biofilm a una dosis-dependiente. La bacteria se inocula y al mismo tiempo, se colocó el tratamiento con quercetina a las dosis y tiempos indicados. Posteriormente se llevó a cabo el protocolo de tinción de biofilms y finalmente se leyeron a 540 nm.

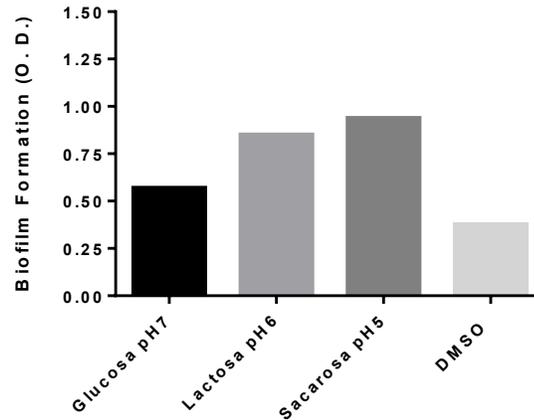


Figura 11. Ensayo de formación de biofilm en medio BHI con diferentes condiciones
 La gráfica muestra el curso temporal del crecimiento de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* en medio BHI adicionado con diferentes carbohidratos y pH. Se realizó el ensayo de formación de biofilm. Se incubaron durante 48 hr. Posteriormente se llevó a cabo el protocolo de tinción de biofilm y finalmente los resultados se leyeron a 540 nm.

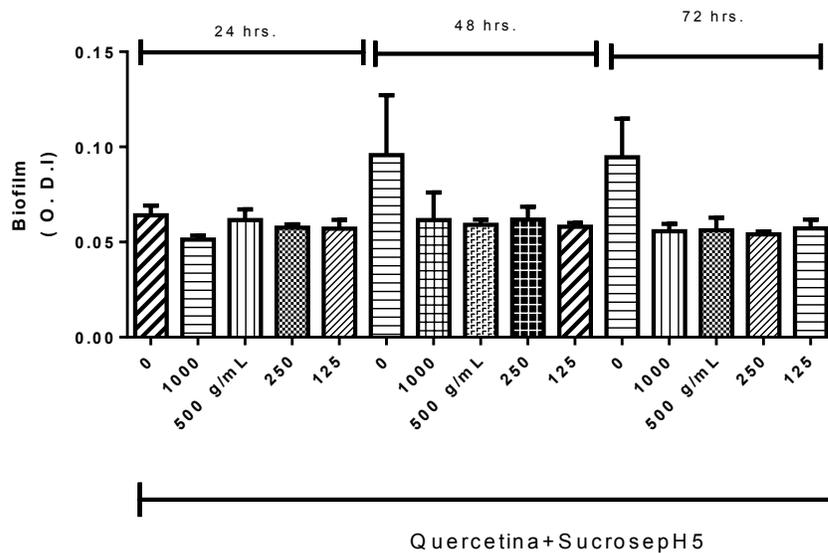


Fig 12. Ensayo formación de biofilm

La gráfica muestra el curso temporal del efecto de quercetina en la formación de biofilm en *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* a una dosis-dependiente. La bacteria se inocula y al mismo tiempo se tratan con quercetina a las dosis y tiempos indicados, posteriormente se llevó a cabo el protocolo de tinción de biofilm y finalmente se leyeron a 540 nm.



8.3 DISCOS DE INHIBICIÓN

Para evaluar el efecto inhibitorio de los flavonoides en la formación de colonias A.a (ATCC 43718), se realizó el ensayo de discos de inhibición. Se encontró efecto inhibitorio en la combinación QM con un promedio de 6.16 y 6.83 en QN (Tabla 2).

TABLA 2. DISCOS DE INHIBICIÓN								
FLAVONOIDE [concentración]	Q [1mg/ml]	M [1mg/ml]	N [1mg/ml]	QM [1mg/ml]	QN [1mg/ml]	MN [1mg/ml]	DMSO [1mg/ml]	Ampicilina [50µg/ml]
DIÁMETRO (mm)	0 mm	7 mm	0 mm	10 mm	13 mm	6 mm	6 mm	7 mm
	0 mm	7 mm	0 mm	9 mm	12 mm	0 mm	6 mm	0 mm
	0 mm	0 mm	0 mm	10 mm	8 mm	0 mm	0 mm	0 mm
	7 mm	0 mm	0 mm	8 mm	8 mm	0 mm	0 mm	0 mm
	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
PROMEDIO	1.16	2.33	0	6.16	6.83	1	2	1.16

Tabla 2. Discos de inhibición

En la tabla se muestran los resultados del efecto de los flavonoides quercetina, naringina, morina y sus combinaciones en *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Se inoculó la bacteria en medio agar BHI, se les colocó discos impregnados con tratamiento, se dejó en incubación por 48hrs posteriormente; se midieron los halos de inhibición. Fuente directa.



9. DISCUSIÓN

Como se mencionó previamente el objetivo fundamental de este trabajo consistió en evaluar el efecto de los diferentes flavonoides con el fin de determinar si poseían propiedades antibacterianas en *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Los resultados obtenidos mostraron que los flavonoides afectan de alguna manera al crecimiento de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

La enfermedad periodontal se encuentra entre las patologías bucales más frecuentes en nuestro país el 56.7% de nuestra población adulta la presenta¹, La periodontitis agresiva localizada se encuentra más relacionada con jóvenes. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* es el patógeno más importante en el desarrollo de la periodontitis agresiva localizada^{2, 3,4}. Se ha encontrado que este patógeno tiene diversos factores de virulencia que le ayudan a fomentar la periodontitis agresiva localizada a través de la modulación del sistema inmune del hospedero¹¹⁻¹⁴.

Por otra parte, la comunidad científica mundial ha obtenido evidencia de los flavonoides frente a varias patologías, se ha encontrado que los flavonoides tienen propiedades biológicas entre ellas la más importante para este trabajo es la propiedad antibacteriana, aunque hay trabajos donde se estudia el efecto antibacteriano en *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*^{42,53}. Se encuentran enfocados a una pequeña cantidad de flavonoides. Por todo lo anteriormente mencionado, el estudio y desarrollo de los flavonoides como futuros agentes terapéuticos contra enfermedades de la cavidad bucal no solamente de la enfermedad periodontal, resulta esencial y atractivo.

En este trabajo se utilizaron los flavonoides quercetina, naringina, morina y sus combinaciones. Para evaluar el efecto de estos flavonoides, se elaboraron experimentos de viabilidad celular, donde se encontró que quercetina tiene efecto cito tóxico para *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* donde las



concentraciones 500 μ l/ml y 1000 μ l/ml mostraron tener mayor efecto bactericida, lo que sugiere que quercetina tiene mayor potencial de acción a tiempo prolongados.

Por otro lado, se hicieron experimentos de formación de biofilm donde quercetina presento baja o acción antibiofilm. Cabe mencionar que siempre se procuró crear las mejores condiciones para el crecimiento de la bacteria, a los medios se les adiciono carbohidratos para mejorar el metabolismo de la bacteria pese a todos los esfuerzos el crecimiento de la bacteria fue irregular, sin embargo, estos experimentos crearon una base de protocolo para la elaboración de la mejor condición de crecimiento para la bacteria, que pueden ser de mucha ayuda para investigaciones futuras.

Por otro lado, los resultados de los discos de inhibición mostraron resultados más positivos, se encontró que la combinación de quercetina y naringina a una concentración 1mg/ml tenía el mayor efecto en comparación de los otros flavonoides utilizados.



10. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la presente investigación, quercetina mostró baja actividad antibacteriana en *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, al menos no con las condiciones aquí empleadas, lo cual sugiere que este flavonoide no es el más favorable para acciones antibacterianas, tal vez debido a su estructura química.

Sin embargo, la combinación de quercetina y naringina mostro actividad de inhibición. Esto puede ser debido a la interacción de los flavonoides aumentando su actividad antimicrobiana.

En orden decreciente: quercetina + naringina, quercetina + morina, morina, quercetina, morina + naringina, naringina; mostraron efectos de inhibición siendo que la combinación de los flavonoides quercetina y naringina 1mg/ml con un promedio de 6.83 tuvo mayor efecto de inhibición en *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Se determinó que las mejores condiciones para el crecimiento de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* fue el medio BHI adicionado con sacarosa 0.5% a pH 5.

Sin embargo, falta mucha investigación y desarrollo con los flavonoides por lo que no se puede descartar su uso como agentes terapéuticos contra enfermedades de la cavidad bucal como lo es la enfermedad periodontal.



11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.-Resultados del Sistema de Vigilancia Epidemiológicas de Patologías Bucales(SIVEPAB) 2016, pp 64-65, Ciudad de México.
- 2.- Newman, M., Takei, H.,Klokkevold, P., & Carranza, F.(2010). Periodontología clínica de Carranza. México, D.F.: Mc Graw-Hill Interamericana.
- 3.- Lindhe, J., Karring, T., &Lang, N. (2009). Periodontología clinica e implantologia odontologica. Buenos Aires: Medica Panamericana
- 4.- Vargas AP, Yañez R, Monteagudo C. Periodontología e Implatology. México, CD.MX.: Media Panamericana;2009
- 5.-Yangheng Zhang, Xiang Wang (2018), Human oral microbiota and its modulation for oral health, Biomedicine & Pharmacotherapy., Biomedicine & Pharmacotherapy. 99 (2018) 883–893., <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.01.146>
- 6.-Socransky, Haffajee AD., Dental biofilms: difficult therapeutic targets., Periodontol 2000. 2002;28:12-55.
- 7.-P.D Marsh, Zaura E, Dental biofilm: ecological interaction in health and disease., J Clin Periodontol 2017; 44 (Suppl. 18): S12–S22 doi: 10.1111/jcpe.12679
- 8.- Iisgarten, the structure of dental plaque. Periodontol 2000. 1994 Jun;5:52-65.
- 9.- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL,Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol 1998: 25: 134–144.
- 10.-ArmitageGC, Development of classification system for Periodontal Diseases and condition., Ann Periodontol. 1999 Dec;4(1):1-6.



- 11.- Pourya Gholizadeha, Ali Pormohammad, Hosein Eslami. Oral pathogenesis of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*., *Microbial Pathogenesis* 113 (2017) 303–311, <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.11.001>
- 12.- Nørskov-Lauritsen N, Kilian M. Reclasification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb. nov., *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description to include V factor-dependent and V factor-independent isolates. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006 Sep;56(Pt 9):2135-46., DOI: 10.1099/ijs.0.64207-0
- 13.- Fine, D., Markowitz, K., Furgang, D., Fairlie, K., Ferrandiz, J., Nasri, C., McKiernan, M. and Gunsolley, J. (2007). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and Its Relationship to Initiation of Localized Aggressive Periodontitis: Longitudinal Cohort Study of Initially Healthy Adolescents. *J Clin Microbiol*, 45(12), pp.3859-3869.
- 14.- Yang H, Asikainen S, Doğan B, Suda R, Lai C. Relationship of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Serotype b to Aggressive Periodontitis: Frequency in Pure Cultured Isolates. *J Periodontol.* 2004 Apr;75(4):592-9.
- 15.- H.F. Jenkinson, R.J. Lamont. Oral microbial communities in sickness and in health, *Trends Microbiol.* 13 (2005) 589–595.
- 16.- Höglund Åberg C, Haubek D, Kwamin F, Johansson A, Claesson R. Leukotoxic Activity of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and Periodontal Attachment Loss. *PLoS ONE.* 2014;9(8):e104095.
- 17.- Balashova N, Crosby J. Leukotoxin Confers Beta-Hemolytic Activity to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*., *Infect. Immun.* 74 (2006) 2015–2021.



- 18.- D.F. Mangan, N. Taichman, E. Lally, S. Wahl. Lethal effects of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin on human T lymphocytes, *Infect. Immun.* 59 (1991) 3267–3272.
- 19.- M. Taubman, T. Kawai. Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption., *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 12 (2001), pp. 125-135
- 20.- U.H. Lerner, New molecules in the tumor necrosis factor ligand and receptor superfamilies with importance for physiological and pathological bone resorption, *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 15 (2004), pp. 64-81
- 21.- J. Boch, N. Wara-Aswapati, P. Auron. CONCISE review biological: interleukin 1 signal transduction—current concepts and relevance to periodontitis. *J. Dent. Res.*, 80 (2001), pp. 400-407
- 22.- T. Dileepan, S. Kachlany, N. Balashova, J. Patel, S. Maheswaran. Human CD18 is the functional receptor for *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin. *Infect. Immun.*, 75 (2007), pp. 4851-4856
- 23.- J. Nimpf, E.M. Bevers, P.H. Bomans, U. Till, H. Wurm, G.M. Kostner, et al. Prothrombinase activity of human platelets is inhibited by β 2-glycoprotein-I *Biochimica Biophysica Acta (BBA)-General Subj.*, 884 (1986), pp. 142-149
- 24.- T. Shi, G.M. Iverson, J.C. Qi, K.A. Cockerill, M.D. Linnik, P. Konecny, et al., β 2-Glycoprotein I binds factor XI and inhibits its activation by thrombin and factor XIIa: loss of inhibition by clipped β 2-glycoprotein I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 101 (2004), pp. 3939-3944
- 25.- J.L. Smith, D.O. Bayles., The contribution of cytolethal distending toxin to bacterial pathogenesis. *Crit. Rev. Microbiol.*, 32 (2006), pp. 227-248
- 26.- E.S. Ando-Sugimoto, M.P. da Silva, D. Kawamoto, C. Chen, J.M. DiRienzo, M.P.A., Mayer The cytolethal distending toxin of *Aggregatibacter*



actinomycetemcomitans inhibits macrophage phagocytosis and subverts cytokine production *Cytokine*, 66 (2014), pp. 46-53

27.- S.D. Rabin, J.G. Flitton, D.R. Demuth., *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin induces apoptosis in nonproliferating macrophages by a phosphatase-independent mechanism. *Infect. Immun.*, 77 (2009), pp. 3161-3169

28.- C. Bodet, F. Chandad, D. Grenier., Anti-inflammatory activity of a high-molecular-weight cranberry fraction on macrophages stimulated by lipopolysaccharides from periodontopathogens., *J. Dent. Res.*, 85 (2006), pp. 235-239

29.- M. Wilson, K. Reddi, B. Henderson., Cytokine-inducing components of periodontopathogenic bacteria., *J. periodontal Res.*, 31 (1996), pp. 393-407

30.- Li, Y., Shibata, Y., Zhang, L., Kuboyama, N. and Abiko, Y. (2011). Periodontal pathogen *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* LPS induces mitochondria-dependent-apoptosis in human placental trophoblasts. *Placenta*, 32(1), pp.11-19. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2010.10.007>

31.- 2. Park O, Cho M, Yun C. Lipopolysaccharide of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* induces the expression of chemokines MCP-1, MIP-1 α , and IP-10 via similar but distinct signaling pathways in murine macrophages. *Immunobiology*.2015;220(9):1067-1074. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2015.05.008>

32.- Madeira M, Queiroz-Junior C, Cisalpino D, Werneck S, Kikuchi H, Fujise O et al. MyD88 is essential for alveolar bone loss induced by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide in mice. *Molecular Oral Microbiology*. 2013 ;28(6):415-424. <https://doi.org/10.1111/omi.12034>



- 33.- Hasegawa T, Yoshimura Y, Kikuri T, Yawaka Y, Takeyama S, Matsumoto A et al. Expression of receptor activator of NF-kappa B ligand and osteoprotegerin in culture of human periodontal ligament cells. *Journal of Periodontal Research*. 2002; 37(6):405-411. *J. periodontal Res.*, 37 (2002), pp. 405-411
- 34.- Nancy J. Lin., *Biofilm over teeth and restorations: What do we need to know?*, *J. dental materials* 33 (2017) 667-680.
- 35.- E.A. Novak, H. Shao, C.A. Daep, D.R. Demuth., *Autoinducer-2 and QseC control biofilm formation and in vivo virulence of Aggregatibacter actinomycetemcomitans.*, *Infect. Immun.*, 78 (2010), pp. 2919-2926
- 36.- K.P. Fong, L. Gao, D.R. Demuth., *luxS and arcB control aerobic growth of Actinobacillus actinomycetemcomitans under iron limitation.*, *Infect. Immun.*, 71 (2003), pp. 298-308
- 37.- R. Casarin, É. Del Peloso Ribeiro, F. Mariano, F. Nociti Jr., M. Casati, R. Gonçalves. *Levels of Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis, inflammatory cytokines and species-specific immunoglobulin G in generalized aggressive and chronic periodontitis.* *J. periodontal Res.*, 45 (2010), pp. 635-642
- 38.- T. Koga, T. Kusuzaki, H. Asakawa, H. Senpuku, T. Nishihara, T. Noguchi., *The 64-kilodalton GroEL-like protein of Actinobacillus actinomycetemcomitans.* *J. periodontal Res.*, 28 (1993), pp. 475-477
- 39.- I. Løkenstgard, V. Bakken, K. Schenck., *Heat shock response in Actinobacillus actinomycetemcomitans.*, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 8 (1994), pp. 321-328
- 40.- F. Goulhen, A. Hafezi, V.-J. Uitto, D. Hinode, R. Nakamura, D. Grenier, et al., *Subcellular localization and cytotoxic activity of the GroEL-like protein*



isolated from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*., *Infect. Immun.*, 66 (1998), pp. 5307-5313

41.- A. Nalbant, T. Saygılı., IL12, IL10, IFN γ and TNF α expression in human primary monocytes stimulated with bacterial heat shock GroEL (Hsp64) protein., *PloS One.*, 11 (2016), Article e0154085

42.- A. Guentsch, M. Puklo, P.M. Preshaw, E. Glockmann, W. Pfister, J. Potempa, et al., Neutrophils in chronic and aggressive periodontitis in interaction with *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*., *J. periodontal Res.*, 44 (2009), pp. 368-377

43.- Ramona Barbieria, Erika Coppoa, Anna Marcheseb., Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity., *Microbiological Reserch*

44.- Manjinder Singh, Maninder Kaur, Om Silakari., Flavones: An important scaffold for medicinal chemistry., *European Journal of Medecinal chemistry* 84(2014) 206-239

45.- Shashank Kumar and Abhay K. Pandey., Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The scitific world Jurnal*, 2013, 1-16.

46.- Barbieri R, Coppo E, Marchese A, Daglia M, Sobarzo-Sánchez E, Nabavi S et al. Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. *Microbiol. Research*. 2017;196:44-68.

47.- K.A.OhemengC.F.SchwenderK.P.FuJ.F.Barrett., DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones(1)., *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 1993, 225-230

48.- Michael Stavri Laura J. V. Piddock Simon Gibbons., Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*,



Volume 59, Issue 6, 1 June 2007, Pages 1247–1260,
<https://doi.org/10.1093/jac/dkl460>

49.-S. Taweechaisupapong, W. Pinsuwana, W. Suwannarong, R. Kukhetpitakwong, S. Luengpailin., Effects of *Streblus asper* leaf extract on the biofilm formation of subgingival pathogens., *South African Journal of Botany* 94 (2014) 1–5.

50.- Elif Burcu Bali, Leyla Açıık., Antimicrobial activity against periodontopathogenic bacteria, antioxidant and cytotoxic effects of various extracts from endemic *Thermopsis turcica*., *Asian Pac J Trop Biomed* 2014; 4(7): 505-514, doi:10.12980/APJTB.4.2014APJTB-2013-0010

51.- Muhammad Shahzad, Emma Millhouse, Shauna Culshaw., Selected dietary (poly)phenols inhibit periodontal pathogen growth and biofilm formation., *Food Funct.*, 2015, 6, 719., DOI: 10.1039/c4fo01087f

52.- Sebastián Barceló, Mariana Peraltab, Maximiliano Calisea., Interactions of a prenylated flavonoid from *Dalea elegans* with fluconazole against azole-resistant *Candida albicans*. *Journal Phytomedicine* 32 (2017) 24–29

53.- W.A. Vasconcelos, N.M.A. Braga, V.R. Chitarra, V.R. Santos, A.L. Andrade, R.Z. Domingues. Bioactive glass-green and Red Propolis association: antimicrobial activity against oral pathogen bacteria. *Nat. Prod. Chem. Res.*, 2 (2014), p. 6, 10.4172/2329-6836.1000154

BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTARIA.

Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers*. 2017 Jun 22;3:17038. doi: 10.1038/nrdp.2017.38.

Roberto Flores R. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Rev. chil. infectol.* vol.28 no.6 Santiago dic. 2011 Disponible en:



https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182011000700011