



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos a 26 de enero del 2021

ASUNTO: VOTO PROBATORIO

**MAESTRA JESICA LÓPEZ BUCIO FABIÁN
DIRECTORA INTERINA DE LA FACULTAD DE NUTRICIÓN
PRESENTE**

A través de este documento me permito informarle que en mi calidad de jurado de examen de grado del estudiante en licenciatura en nutrición **HÉCTOR ANDRÉS LÓPEZ MARIACA**, he leído y revisado la tesis titulada: “**EFFECTO DE LA EXPOSICIÓN A (-) – EPICATEQUINA SOBRE GENES DE RESPUESTA INFLAMATORIA INDUCIDA POR LPS EN CÉLULAS ENDOTELIALES DE CORDÓN UMBILICAL (HUVECs)**”y considero esta cumple con los requisitos señalados en los lineamientos que rigen la titulación para tesis profesional en la UAEM. Con lo anterior mencionado el alumno puede continuar con los trámites correspondientes para solicitar fecha de examen.

Sin más por el momento agradezco la atención prestada.

**ATENTAMENTE
Dra. Carolina Bustos Rivera Bahena
SINODAL DE TESIS**

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

CAROLINA BUSTOS RIVERA BAHENA | Fecha:2021-01-27 08:08:59 | Firmante

BHdTubTq7+aq/VbPrRs5yok7juPue98hpBq1RNBaxCu40VTZJwyHumqsg1jYjSdfNX9s4t2jG2SrgiQT5mb0jJZedxuRt3b/0wsROGSvoDoupUv7O5i0g7FAYqnORaOtdnh4I6fmMul
kvsS1mYQlcU1FPzGNzrOVnbol5sneM323N5XsfoVDGp8oY/qHpo2xXCV8Qni6EWI16/P+BfDyG6d4a/H4MK8glbEho5TxLB0BhQo9dmJfGg8ddcdiNGLFXataVtaVFKwM5xge4yz3
Xc4DorC8mWTcM7GP7moRBulgjxdUUS9Xd8hji4fxLPFWO/BTcE9hQJJoZyGrY642w==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[LY5cAn](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/2vGleonNfPPNT1qabKYaUamBAqV40DQ5>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 27 de enero de 2021.
Asunto: Voto aprobatorio.

DRA. JESICA LÓPEZ BUCIO FABIÁN
DIRECTORA INTERINA DE LA FACULTAD DE NUTRICIÓN, UAEM
P R E S E N T E

Por este conducto me permito comunicarle que en mi calidad de jurado para examen de grado del (a) estudiante de Licenciatura en Nutrición Héctor Andrés López Mariaca, he leído y revisado la tesis titulada EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A (-) –EPICATEQUINA SOBRE GENES DE RESPUESTA INFLAMATORIA INDUCIDA POR LPS EN CÉLULAS ENDOTELIALES DE CORDÓN UMBILICAL (HUVECs), y considero que ésta cubre los requisitos señalados en los lineamientos de Titulación de la Universidad para tesis profesional. Por lo tanto, el estudiante puede continuar con los trámites correspondientes para solicitar fecha de examen.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE

DRA. CAROL ARELY BOTELLO AMARO.

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

CAROL ARELY BOTELLO AMARO | Fecha:2021-01-27 09:15:31 | Firmante

HwSIncWA65ERLXWHPwOaG+egabd2FIA2sG0QzcbnEv1GM3FhKS8AACXgIKsGiAeN+ZhB7Uha++SFGiwx6wN0SxT+9KuXZzHcyZTqUcwzzdylo9DXxKbTWWf2luvLnkLcF0X3LGXHPRE1xBL4DgXmc3GHX4D0vk8Bt0GXV6nZZqRPY8/Au08M6jHpUzTegNoNWIMyXYy64TjDHVE6dA5yhKcrLldt9ggjdS3Oov+1Eay4I9IYNL0RnQgnQE55i40HEbL9Y0m ecHUO4wUGrFRYwuWXgELyyiDTYkWJ3lee/ePwvEyl0QoCwwX+7+ZxGkVQXgyCdUURGanU/aN0PQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



XReOxr

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/GNWcizJhpucTg5Ayk2MeFQC1sJ3Rk53u>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 27 de Enero 2021
Asunto: Voto aprobatorio.

MCS. JÉSICA LÓPEZ BUCIO FABIÁN
DIRECTORA DE LA FACULTAD DE NUTRICIÓN, UAEM
P R E S E N T E

Por este conducto me permito comunicarle que en mi calidad de jurado para examen de grado del (a) estudiante de Licenciatura en Nutrición HÉCTOR ANDRÉS LÓPEZ MARIACA he leído y revisado la tesis titulada EFFECTO DE LA EXPOSICIÓN A (-) –EPICATEQUINA SOBRE GENES DE RESPUESTA INFLAMATORIA INDUCIDA POR LPS EN CÉLULAS ENDOTELIALES DE CORDÓN UMBILICAL (HUVECs), y considero que ésta cubre los requisitos señalados en los lineamientos de Titulación de la Universidad para tesis profesional. Por lo tanto, el estudiante puede continuar con los trámites correspondientes para solicitar fecha de examen.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE

DRA. NOELIA VÁZQUEZ BENÍTEZ

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

NOELIA VAZQUEZ BENITEZ | Fecha:2021-01-27 19:08:04 | Firmante

UY19WweTTjtq5Sa6+Vuev/Y9Q/feoNZklqey0ChbTyMEC4GZ0YaUNrlcmFVaMK0SBJdJinv/3Ow+aVePfulF07m9DJxjebxdwIRu4nRF1OXldtD4PrkPO5CTkzikFzVE2oFgLpBhLI
MlecXyg+/d766EGPtUMq1FzzV/CodHuDgZ8y18U9XdyiDN1w9sksRtmOYSpIPonFEB+ZPP7fX+XP7JphfyVrTmf8czy8OcyOmVWQf6A8lJT/aChnK0L5R+CvDk0G/HY/WWixR+lu4
qCTPbv95ZQS/mGZmyJgkusE8itW85pYeo4p1LkQ5i0Bhybnd3Q/3ulvimuGfy2aWjw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[TwS4tL](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/NhR3v4JxqSOd4EKzBWHtoabMq6N0JAAQ>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 20 de enero 2021
Asunto: Voto aprobatorio.

MCS. JÉSICA LÓPEZ BUCIO FABIÁN
DIRECTORA DE LA FACULTAD DE NUTRICIÓN, UAEM
P R E S E N T E

Por este conducto me permito comunicarle que, en mi calidad de jurado para examen de grado del estudiante de Licenciatura en Nutrición HÉCTOR ANDRÉS LÓPEZ MARIACA, he leído y revisado la tesis titulada EFFECTO DE LA EXPOSICIÓN A (-) –EPICATEQUINA SOBRE GENES DE RESPUESTA INFLAMATORIA INDUCIDA POR LPS EN CÉLULAS ENDOTELIALES DE CORDÓN UMBILICAL (HUVECs), y considero que ésta cubre los requisitos señalados en los lineamientos de Titulación de la Universidad para tesis profesional. Por lo tanto, el estudiante puede continuar con los trámites correspondientes para solicitar fecha de examen.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE

M. en C. Raúl Dávila Delgado

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

RAUL DAVILA DELGADO | Fecha:2021-01-20 17:46:50 | Firmante

GODex8trkObMLrVvHCsLzPeodeHf/fFKY5wVO6AYFj5KAKY6SM4tpF/AfuXxqhb3ZODgdkXPVVL8mDeJSh7c1RSPEXFO31A/JEmcl0kuRzfTxVtikmdRBE8vkPdNECi3exX3uQX
VE5bQPg3cqkCTWlqENqn8STHrYnepyTsbDydUb21H5G2XNiRRrUzWWL6Bn8mZbP0JHEHPWIG4xJdOtIQQBmcYcO5M0Kq0kJ0/B9HSs2/fkka+b+u7AQkhdkxks6pStwaEob
BWh1VNY59hfujjPb4iEvJixVG+z8B1cOEAvEMrfBfqN7In6eGSqW6qVcd6RprTSZeDrfVxvaCNbg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



3ArMdw

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/KhHioi09FoOhV4pAoXdA10e9ZHRGZ9t6>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 21 Enero 2021
Asunto: Voto aprobatorio.

Mtra. Jéssica López Bucio Fabián:
Directora interina de la Facultad de Nutrición
P R E S E N T E

Por este conducto me permito comunicarle que en mi calidad de jurado para examen de grado del estudiante de Licenciatura en Nutrición **HÉCTOR ANDRÉS LÓPEZ MARIACA**, he leído y revisado la tesis titulada “**EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A (-) – EPICATEQUINA SOBRE GENES DE RESPUESTA INFLAMATORIA INDUCIDA POR LPS EN CÉLULAS ENDOTELIALES DE CORDÓN UMBILICAL (HUVECs)**”, y considero que ésta cubre los requisitos señalados en los lineamientos de Titulación de la Universidad para tesis profesional. Por lo tanto, el estudiante puede continuar con los trámites correspondientes para solicitar fecha de examen.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Dra. Ollin Celeste Martínez Ramírez

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

OLLIN CELESTE MARTINEZ RAMIREZ | Fecha:2021-01-21 10:28:40 | Firmante

W2y/LW5+XVaf1UMg17EPfJ8fdAJ6+CyrNe79W0olHeb7wIWqleZBoD0+BSuH+Sne3w2bPxET8uraAyflkR6qQa+gASRN/+mJT4tadV5NSfnYMY5E+E8ch+sD5tsIWKR1dnvI0NI
SV+HHzPISlk/1TYoxDIIDmTa0ihgemclyDFsu3nK1NmsvgnprCQN2G5I/riiFA71R+oifbT51thUq4ZEZpHopuPVMYDJrAkLagSxD3RlX4S/2OpR6ztwxyfYxJocWiECyvvG1TCTOI8IN
DGAt1dgxmXWXUqKaJ8kAxXi4ar3Qqo4INEtT5Xja5JIH67qcHzzwiiCEtgi9RTrP7xg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[sxpjKG](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/nZRQpPDZlQwxmtWAI2Smkd01H5ZzYR6G>

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE NUTRICIÓN

EFFECTO DE LA EXPOSICIÓN A (-) –EPICATEQUINA SOBRE GENES DE RESPUESTA INFLAMATORIA INDUCIDA POR LPS EN CÉLULAS ENDOTELIALES DE CORDÓN UMBILICAL (HUVECs)

TESIS

P R E S E N T A
HÉCTOR ANDRÉS LÓPEZ MARIACA

Para obtener el Grado de
LICENCIADO EN NUTRICIÓN

DIRECTOR (A)

Dra. Ma. Elizabeth Tejero Barrera

CO DIRECTOR (A)

M. en C. Leticia Sebastián Medina

SINODALES

Dra. Carolina Bustos Rivera Bahena

Dra. Carol Arely Botello Amaro

Dra. Noelia Vázquez Benítez

M. en C. Raúl Dávila Delgado

Dra. Ollin Celeste Martínez Ramírez

AGRADECIMIENTOS

<<“Si supiéramos lo que estábamos haciendo, no lo llamaríamos ciencia”>> Fue la frase que repetidamente encontraba en mi búsqueda de información para desarrollar éste proyecto; no sabía que esta frase ya me acompañaba desde el momento en el que decidí aventurarme en un mundo donde los nutriólogos hacen algo diferente a lo que –se supone- deberíamos hacer; donde aportamos conocimiento a la nutrición desde lo que pareciera ser la base de todo, *la genética*.

Agradezco a Dios por darme la fortaleza y la templanza en todo este camino; a mis papás, Ángeles y Benito porque todo lo que hoy soy se lo debo a ustedes, por su amor y apoyo incondicional, por impulsarme cada vez que lo necesité; por emocionarse conmigo, por creer en mí. A Sophi también por su apoyo y por siempre sacarme una sonrisa, por estar ahí en todo momento.

A la Dra. Liz Tejero por haberme dado la oportunidad de desarrollar éste proyecto, por inspirar y guiarme como nutriólogo en investigación, por permitirme contribuir a la nutrición desde otra perspectiva. Gracias a Lety, por su apoyo y acompañamiento desde el primer hasta el último experimento, por compartir su conocimiento y demostrarme que en efecto, sí podía. A Lyssia y Paloma por sus consejos y apoyo siempre. A mis amigos del laboratorio, Jan, Victor, Cristal y Diana por su ayuda, por escuchar y motivarnos todos juntos.

A la Dra Azucena y a mis sinodales por sus aportes a éste trabajo, por su tiempo y compartir sus ideas.

Mis amigos Cin, Joe, Su y Gi; por estar siempre, escucharme y tener siempre un consejo.

A la Cátedra de Nutrigenómica Nestlé-INMEGEN y el INMEGEN por los fondos otorgados para hacer posible éste trabajo de investigación.

...Y a ti Héctor del 2018 por haber sido valiente, porque sabías que sería difícil tomar esa decisión y te atreviste. Si no hubieras decidido hacerlo hoy no estaría aquí, orgulloso de saber que lograste lo que te habías propuesto, y de ver todo lo que has hecho. Gracias porque hoy sé que soy capaz de alcanzar todo lo que mañana me proponga. Lo logramos...

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.	1
2. MARCO TEÓRICO.	3
3. JUSTIFICACIÓN.	28
4. HIPÓTESIS.	29
5. OBJETIVOS	
5.1. General.	29
5.2. Específicos.	29
6. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.	30
6.1 Diseño del estudio.	30
6.2 Muestra.	30
6.3 Instrumento de investigación.	31
6.4 Desarrollo del proyecto.	32
6.5 Diseño de análisis estadístico.	43
7. RESULTADOS.	44
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	61
9. CONCLUSIONES.	66
10. PERSPECTIVAS Y/O RECOMENDACIONES.	67
11. REFERENCIAS.	68
12. ANEXOS.	81

SIGLAS, SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ECV: Enfermedades Cardiovasculares

HUVECs: Human Umbilical Vein Endothelial Cells (Células endoteliales de cordón umbilical humano)

EC: (-) -epicatequina

IL-6: Interleucina 6

IL-8: Interleucina 8

β -Actina: Beta-actina

eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial

SOD2: Superóxido dismutasa 2

NF- κ B: Factor nuclear Kappa-B

Sele-E: Selectina endotelial

ANOVA: Prueba de varianza

rpm: Revoluciones por minuto

LPS: Lipopolisacárido

M199: Medio 199

DMSO: Dimetil-sulfóxido

SFB: Suero fetal bovino

TABLAS

Tabla 1. Alimentos con alto contenido de (-) –epicatequina.	6
Tabla 2. Perfil de compuestos de <i>Theobroma Cacao</i>	7
Tabla 3. Esquema de diluciones de (-) –epicatequina para tratamientos con HUVECs. . .	37
Tabla 4. Cálculos para preparación de Master Mix para RT-PCR.	40
Tabla 5. Sondas utilizadas para PCR en Tiempo Real.	41
Tabla 6. Cálculos de Master Mix para reacción de PCR en tiempo real.	41
Tabla 7. Prueba de MTT 1 h en células HUVECs.	59
Tabla 8. Prueba de MTT 4 h en células HUVECs.	60

FIGURAS

Figura 1. Principales causas de muerte en México.	2
Figura 2. Clasificación de los polifenoles y algunas fuentes en los alimentos.	4
Figura 3. Estructura básica de los flavonoides.	5
Figura 4. Estructura de las catequinas, principales compuestos fenólicos del cacao.	8
Figura 5. Esquema del metabolismo de epicatequinas.	12
Figura 6. Factores que promueven la disfunción endotelial y consecuencias.	13
Figura 7. Anatomía del cordón umbilical.	15
Figura 8. Representación de la inflamación aguda crónica del endotelio mediada por IL-6.	17
Figura 9. Panorama de la activación de neutrófilos inducido por CXCR2 en el proceso inflamatorio.	18
Figura 10. Activación de <i>Sele-E</i> y mecanismo de acción.	21
Figura 11. Esquema general de la producción de ROS y su metabolismo mediado por SODs.	22
Figura 12. Activación de la ruta canónica de NF-kB.	24
Figura 13. Estructura del lipopolisacárido (LPS).	25
Figura 14. Diagrama de flujo.	32
Figura 15. Procedimiento para realizar los pases celulares.	34
Figura 16. Diluciones de (-) –epicatequina para tratamientos de HUVECs.	37
Figura 17. Esquema del tratamiento de 2 h.	38
Figura 18. Esquema del tratamiento de 4 h.	39
Figura 19. HUVECs al microscopio.	45
Figura 20. Análisis de citometría de flujo en HUVECs. Anticuerpo CD31.	46

Figura 21. Análisis de citometría de flujo en HUVECs. Anticuerpo CD62E (Sele-E)	47
Figura 22. Expresión de <i>IL-6</i> en HUVECs al estimular con tratamientos durante 2 h y 4 h.	48
Figura 23. Expresión de <i>IL-8</i> en HUVECs al estimular con tratamientos durante 2 h y 4 h.	50
Figura 24. Expresión de <i>Sele-E</i> en HUVECs al estimular con tratamientos durante 2 h y 4 h.	52
Figura 25. Expresión de <i>eNOS</i> en HUVECs al estimular con tratamientos durante 2 h y 4 h.	54
Figura 26. Expresión de <i>NF-κB p50</i> en HUVECs al estimular con tratamientos durante 2 h y 4 h.	56
Figura 27. Expresión de <i>SOD 2</i> en HUVECs al estimular con tratamientos durante 2 h y 4 h.	58

ABSTRACT

Background: Cardiovascular disease (CVD) is the leading cause of death globally. Malnutrition, obesity, and physical inactivity are triggers for these diseases. Several studies have shown the consumption of polyphenols like (-) –epicatechin (EC) (the most abundant flavanol in cocoa (*Theobroma cacao L*), has a positive impact on CVD attributed to its ability to regulate gene expression of antioxidant and anti-inflammatory genes and attenuating the progression of endothelial dysfunction.

Objective: To evaluate the effect of (-) –epicatechin on the expression of genes associated with the inflammatory response induced by LPS in HUVECs.

Methodology: Cultured HUVECs cells obtained from human umbilical cord were used as a model of vascular endothelium. The cells were stimulated with physiological doses of EC and then challenged to LPS-induced stress. The expression of inflammatory response genes (IL-6, IL-8, eNOS, Sele-E, NF-kB p50 and SOD 2) was quantified by RT-qPCR. To analyze changes in gene expression, a one-way ANOVA test was performed; data was analyzed using the SPSS Statistics 25 statistical analysis software.

Results: Our results indicate that a previous exposure to the LPS stimulus with EC physiological doses in HUAVECs cell culture can attenuate the expression of IL-6, IL-8, Sele-E, and SOD 2 at mRNA level. Through cytotoxicity tests it was found that physiological doses of EC do not affect cell viability at 2 and 4 h of exposition.

Conclusions: Physiological doses of EC can attenuate the expression of IL-6, IL-8, Sele-E, and SOD 2, genes involved in the LPS-induced inflammatory response in HUVECs cells. This study emphasizes the benefits of polyphenols such as EC on

the development of endothelial dysfunction, an initial factor in the progression of CVD in doses that can be achieved through diet.

RESUMEN

Antecedentes: Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la primera causa de muerte a nivel global. La malnutrición, obesidad, e inactividad física son factores desencadenantes de estas enfermedades. Diversos estudios han evidenciado que el consumo de polifenoles como la (-) –epicatequina (polifenol más abundante del cacao) (*Theobroma cacao L*) tiene un impacto positivo en las ECV atribuido a su capacidad de regular la expresión de genes de respuesta inflamatoria y antioxidante, atenuando el desarrollo de la disfunción endotelial.

Objetivo: Evaluar el efecto de la (-) –epicatequina en la expresión de genes asociados a la respuesta inflamatoria inducida por LPS en HUVECs.

Metodología: Se utilizaron células HUVECs en cultivo obtenidas de cordón umbilical humano como modelo de endotelio vascular. Las células fueron estimuladas con dosis fisiológicas de (-) epicatequina (EC) y luego sometidas a estrés inducido por lipopolisacárido (LPS). Se cuantificó la expresión de genes de respuesta inflamatoria (*IL-6*, *IL-8*, *eNOS*, *Sele-E*, *NF-kB p50* y *SOD 2*) mediante RT-qPCR. Para analizar los cambios en la expresión de los genes, se utilizó una prueba ANOVA de una vía, el análisis estadístico se realizó en el software SPSS Statistics 25.

Resultados: Los resultados indican que una exposición previa al estímulo de LPS con dosis fisiológicamente alcanzables de EC en HUVECs, es capaz de atenuar la expresión de mRNA de *IL-6*, *IL-8*, *Sele-E* y *SOD 2*. Mediante pruebas de

citotoxicidad se comprobó que dosis fisiológicas de EC no afectan la viabilidad de las células en tiempos de exposición de 2 y 4 h.

Conclusiones: Dosis fisiológicamente alcanzables de EC son capaces atenuar la expresión de *IL-6*, *IL-8*, *Sele-E*, y *SOD 2*, genes involucrados en la respuesta inflamatoria inducida por LPS en células HUVEC. Éste estudio permite enfatizar los beneficios de polifenoles como la EC sobre el desarrollo de la disfunción endotelial, factor inicial en la progresión de ECV en dosis que pueden ser alcanzadas a través de la dieta.

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente se considera que las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) como la diabetes, hipertensión y enfermedades cardiovasculares (ECV); son el principal desafío de la salud pública a nivel global, pues representan 2/3 de todas las muertes en el mundo. En el año de 1990 representaba el 57% de todas las muertes; para el año 2008 ésta cifra había aumentado al 63%. Las ECV acumulan casi la mitad de todas las muertes en el mundo por ECNT(1,2). Al día de hoy en México según datos del INEGI en 2017, las ECV son la primer causa de muerte en nuestro país (3).

A principios del siglo XX, México era un país en vías de desarrollo al no contar con total acceso a agua potable, los servicios de drenaje eran deficientes, existía una subutilización de servicios de salud; ésta situación impactaba directamente en el comportamiento epidemiológico de las enfermedades, siendo las infecciones la principal causa de muerte (4). Sin embargo, a mitad del siglo XX, la urbanización y el desarrollo lograron la disminución de la mortalidad infantil y aumentar la esperanza de vida, generando así un fenómeno denominado "transición de riesgos"(5) donde la exposición al sedentarismo, el estrés, el consumo de tabaco y la mala alimentación, posicionaron a las enfermedades crónicas no transmisibles como la principal causa de muerte.

Según datos del INEGI, las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en México, junto con la diabetes y algunos tumores malignos (6) (Figura 1). Hoy en día éste panorama representa uno de los más grandes problemas de salud pública en nuestro país, pues el conjunto de ECNT la causa de

aproximadamente el 77% de las muertes en adultos en México, y tan solo las enfermedades cardiovasculares (ECV) representan el 24% de ésta cifra (7).

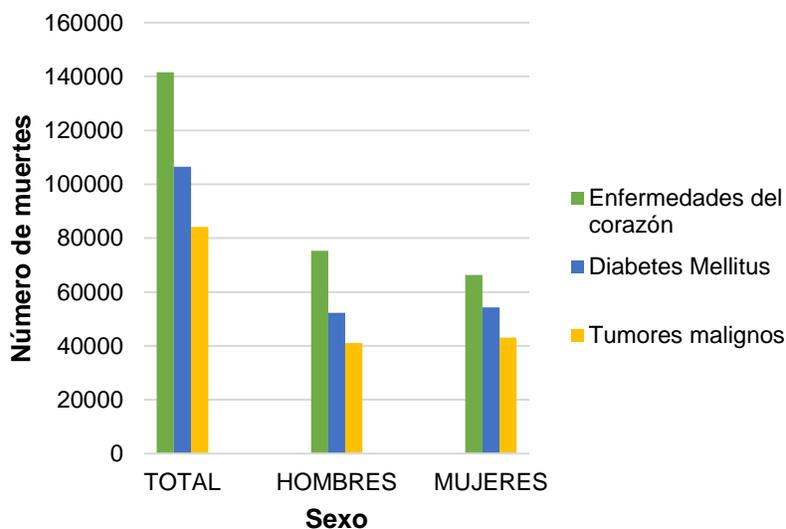


Figura 1. Principales causas de muerte en México. INEGI (2018) (3).

Se ha denominado como enfermedades cardiovasculares a aquellos “desórdenes del corazón y de los vasos sanguíneos”(5,8); entre las que pueden incluirse la cardiopatía coronaria, enfermedades cerebrovasculares, arteriopatías periféricas, trombosis venosas y embolias pulmonares. La mayoría de estas enfermedades comparten un factor desencadenante común que es la aterosclerosis. La aterosclerosis se define como una enfermedad que se caracteriza por la disminución de la luz en las arterias (9,10), éste fenómeno se genera por una lesión en la capa íntima donde se forma una placa ateromatosa compuesta por lípidos (principalmente colesterol); y que a su vez es producto del proceso inflamatorio derivado de una disfunción endotelial.

La alimentación es pieza clave en la progresión de la aterosclerosis, pues el consumo elevado de grasas saturadas, grasas trans, colesterol, sodio y azúcar son factores que desarrollan ésta enfermedad (10,11), pero por otro lado, la alimentación también puede ser el tratamiento preventivo de la aterosclerosis y ECV. Una dieta rica en frutas, vegetales, fibra, pescados y nueces disminuye el riesgo de padecer ECV (11), y una de las moléculas responsables de brindar éste factor protector, son los polifenoles (12), compuestos antioxidantes presentes en grandes cantidades en frutas y algunos vegetales.

2. MARCO TEÓRICO

Polifenoles

Los polifenoles han llamado la atención en los últimos años por tener propiedades antioxidantes y antiinflamatorias principalmente. Son metabolitos secundarios de algunos vegetales (13) como frutos en su mayoría; aunque también pueden encontrarse en algas, cereales y semillas. En las plantas brindan protección contra el estrés fotosintético y la radiación ultravioleta, especies reactivas de oxígeno, desarrollo de agentes patógenos y algunos herbívoros (14), además, en los alimentos confieren algunas propiedades organolépticas (color, sabor, olor), y ayudan a mantener la estabilidad de los mismos alimentos (13).

Los polifenoles se caracterizan por tener en su estructura, la unión de uno o varios grupos hidroxilo al anillo aromático; y esto es lo que los distingue de otros compuestos químicos (15).

Los polifenoles pueden clasificarse de acuerdo a su estructura química. Los estilbenos, lignanos, flavonoides, ácido elágico y ácidos fenólicos son los grupos de polifenoles que se conocen actualmente; los flavonoides a su vez abarcan muchos más compuestos (Figura 2).

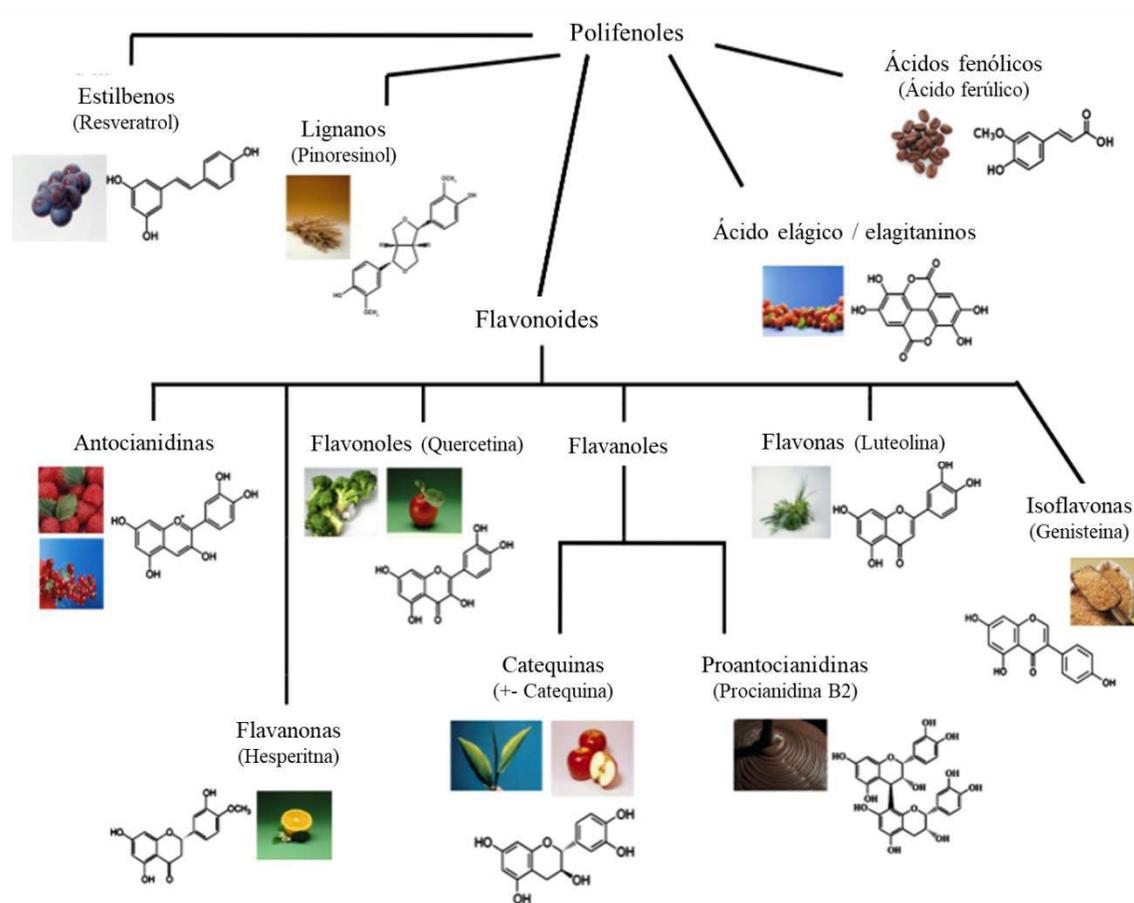


Figura 2. Clasificación de los polifenoles y algunas fuentes en los alimentos. *Adaptado de: Dietary polyphenols in the prevention and treatment of allergic diseases. A. Singh (2011)(15).*

Flavonoides

Los flavonoides son el grupo de polifenoles que abundan más en las plantas, además de ser los más estudiados y de los cuáles se tiene mayor información actualmente.

Se caracterizan por ser compuestos de bajo peso molecular. Comparten una estructura común que se compone de difenilpiranos (C6, C3, C6) formados por dos anillos fenilos A y B; unidos por un anillo C heterocíclico (16) (Figura 3). Ésta estructura es lo que les concede propiedades antioxidantes que derivan de las propiedades redox de los grupos hidroxifenólicos.

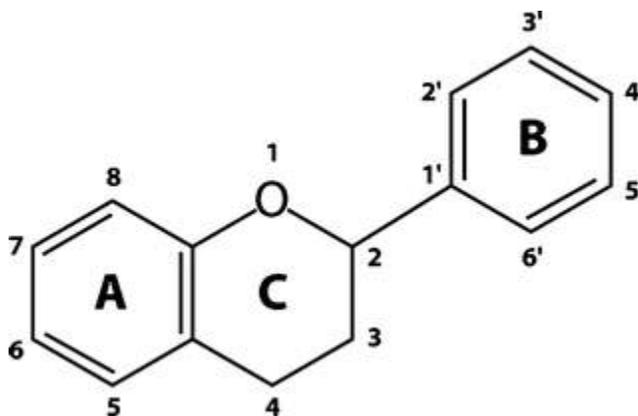


Figura 3. Estructura básica de los flavonoides. Tomado de: *Molecular structure, biological functions, and metabolic regulation of flavonoids*. S. Dwivedi (2017)(16)

Las variaciones en el anillo C de la estructura básica de los flavonoides, condiciona su clasificación en antocianidinas, flavanonas, flavanoles, flavonas e isoflavonas.

Los flavanoles en conjunto con las antocianinas constituyen la principal fuente de consumo de compuestos fenólicos en nuestra alimentación; diversos estudios muestran evidencia de sus efectos antiinflamatorios, anticarcinógenos; incluso como coadyuvantes en el tratamiento contra el cáncer (17–19).

La epicatequina y la catequina son algunos de los flavanoles que se encuentran de manera común en los alimentos; principalmente en café, chocolate, vino y té verde (20). El chocolate, producto derivado del cacao llama la atención por su alto contenido de éstos compuestos fenólicos (Tabla 1).

Tabla 1. Contenido de (-) –Epicatequina en distintos alimentos. (*) Alimentos derivados de *Theobroma cacao L.* Adaptado de la base de datos Phenol Explorer (2013) (21).

Alimento	Cantidad de (-) - EC mg/100 g
*Cacao en polvo	158.30
*Chocolate amargo	70.36
*Chocolate, leche	14.58
Sidra	28.67
Zarzamora	11.48

Aspectos generales del cacao y composición

El cacao (*Theobroma cacao L.*) es un árbol de clima tropical, endémico de la región de centro y sud-américa, actualmente también es cultivado en África, Asia y comercializado en todo el mundo (22). Todos los productos consumidos derivan del grano del cacao, por lo que se considera la materia prima; el licor se obtiene a partir de la trituration de los granos fermentados de cacao; por otro lado, la manteca de cacao se obtiene a partir del prensado de licor de cacao representando hasta el 50% del peso total y es utilizada para la elaboración de algunos chocolates y demás productos alimenticios. El otro producto que resulta del prensado del licor es la “torta de cacao” que al ser pulverizada se obtiene la cocoa (23).

Se tiene registro de que el consumo del cacao data desde hace más de 34 siglos gracias a vasijas de cerámica halladas en las zonas arqueológicas de Paso de la Amada en Chiapas (24) y en el Manatí en Veracruz; Powis y colaboradores en 2011(25) muestran evidencia de que su consumo se mantuvo desde el año 1800 y 1000 A.C. en la que fue la capital Olmeca, San Lorenzo, en Veracruz. Según

documentos encontrados en la zona Arqueológica de San Lorenzo, el cacao era utilizado como parte de rituales mortuorios en sacrificios (26), como ofrenda y como moneda de cambio; en culturas andinas, se tiene registro de que era utilizado en brebajes y empleado con fines terapéuticos (27).

La composición del cacao es compleja, contiene ácidos grasos saturados (ácido palmítico y esteárico) y monoinsaturados (ácido oléico); el contenido de ácido oleico es similar al del aceite de oliva (28,29) (Tabla 2). Aminoácidos derivados de la pirazina; triptamina y tiramina; polifenoles, principalmente epicatequina y catequina; vitaminas del complejo B, vitaminas E y C.

Tabla 2. Perfil de compuestos de *Theobroma Cacao*. Recuperado de Council of Scientific and Industrial Research (CSIR) (2019) (29).

Composición de <i>Theobroma cacao L.</i>	
<i>Cantidad por cada 100g</i>	
Proteína	12 g
Lípidos	46.3 g
Carbohidratos	34.7 g
Fibra	8.6 g
Ca	106 mg
P	537 mg
Fe	3.6 mg
<i>% de ácidos grasos</i>	
Ácido palmítico	26.20%
Ácido esteárico	34.40%
Ácido oléico	37.30%
Ácido linoléico	2.30%

Polifenoles y biodisponibilidad

Aproximadamente entre el 6-8% del peso seco del cacao son polifenoles, principalmente catequinas (30); antocianinas y proantocianidinas en menor proporción. Éstos flavanoles se encuentran en forma de monómeros (+) – catequina e isómeros (-) –epicatequina (Figura 4), siendo éste el que se encuentra en mayor proporción (35% del total del contenido fenólico). De los alimentos derivados del *Theobroma cacao L.* el cacao es el alimento que mayor contenido de (-) – epicatequina tiene, aportando 158.30 mg/100 g, seguido del chocolate oscuro con 70.36 mg/100 g y finalmente el chocolate con leche, con 14.58 mg/100 g (21).

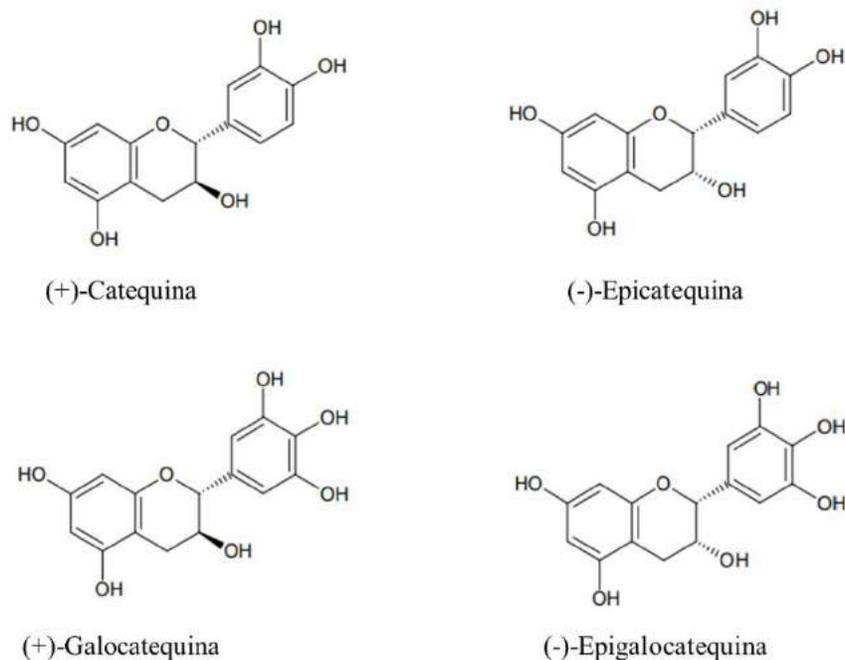


Figura 4. Estructura de las catequinas, principales compuestos fenólicos del cacao. *Adaptado de: Polyphenols from Cocoa and Vascular Health—A Critical Review. Rimbach G (2009) (30).*

Los efectos fisiológicos que induce la (-) –epicatequina dependen de su biodisponibilidad en el organismo, ésta puede estar condicionada por la matriz del alimento y la dosis; incluso por la microbiota y las enzimas digestivas (31).

Se han realizado diversos estudios para evaluar la biodisponibilidad de los polifenoles del cacao en humanos, se tiene registro de la concentración en plasma de los metabolitos de (-) –epicatequina, pudiendo ir desde los 0.011 μM (32) hasta los 5.92 μM (33); condicionado por su consumo a través de la dieta; en una revisión Borges *et al*, reportan que los indígenas Kuna, (pertenecientes a la costa del caribe de Panamá) tienen el mayor consumo de flavanoles y proantocianidinas, alcanzando hasta 1.888 g/día, en contraste con habitantes de República Checa, que tienen una ingesta de aproximadamente 225 mg/día (34).

Rein y colaboradores (35), en 2000 determinaron que el pico de concentración de (-) –epicatequina en plasma tras el consumo de chocolate se da entre las 2 y 3 h. En 2012, Ottaviani *et al* (36) registra en el primer estudio de biodisponibilidad de polifenoles de cocoa en humanos, una concentración máxima de metabolitos de (-) –epicatequina a las 2 h, reafirmando los hallazgos de Rein en el año 2000, con una concentración de 589 nmol/L. de (-) –epicatequina-3'-O-glucurónido, siendo éste el metabolito encontrado en mayor concentración.

Actis Goretti y colaboradores (37) en 2012 también cuantificaron la concentración de metabolitos de (-) –epicatequina, posterior a una ingesta de 100 g de chocolate oscuro que contenía 241 μmol de (-) –epicatequina en sujetos sanos; encontrando una concentración de 290 nmol/L de (-) –epicatequina-3'-O-glucurónido, reportado como el metabolito en mayor concentración al igual que Ottaviani. Sin embargo, el

pico de concentración fue aproximadamente a las 3 h. Ésta diferencia podría atribuirse a los efectos de la matriz alimentaria del chocolate utilizado por Actis Goretta y la bebida de cocoa de Ottaviani; concluyendo que el alimento *per se* también podría condicionar la biodisponibilidad de la (-) –epicatequina.

En reportes de estancia en el laboratorio de nutrigenética y nutrigenómica del Instituto Nacional de Medicina Genómica, Ponce de León (38) en 2008 y González (39) en 2017 determinaron que estímulos de (-) –epicatequina en tiempos de 2 y 4 h son capaces de inducir cambios en la expresión de genes de respuesta inflamatoria como *IL-6*, *NF-kB* y *eNOS* en HUVECs.

Metabolismo de (-) -epicatequina

El metabolismo de la (-) –epicatequina y los polifenoles en general comienza con la digestión en la boca por acción de la amilasa, generando una reducción de las partículas de entre 100 μM y 1000 μM ; el impacto de las enzimas sobre la (-) –epicatequina *per se* no es relevante, pues el tiempo de exposición es mínimo (40). Posteriormente, en la fase intestinal se absorbe la mayor cantidad de metabolitos de la (-) –epicatequina; se generan partículas de menor tamaño (<500 μm) a causa de la pepsina, del movimiento peristáltico y el pH del estómago. El pH ácido del estómago favorece la presencia de la forma no disociada de los polifenoles, lo que ayudaría a la difusión de éstos a través de la matriz alimentaria (31). Es importante mencionar que hasta éste momento, la mayoría de los polifenoles generalmente se encuentran acoplados a un azúcar, y son denominados glicósidos.

Algunas enzimas presentes en el borde en cepillo de la pared intestinal como la lactasa-florizina hidrolasa (LPH) y carboxilesterasas se encargan de separar a los polifenoles de ésta porción de azúcar mediante una hidrólisis, generando de ésta manera compuestos denominados agliconas (Figura 5).

Posteriormente, éstas agliconas son conjugadas por UDP-glucuronosiltransferasas, formando glucorónidos, por sulfotransferasas formando sulfatos, y por catecol-metiltransferasa creando grupos metilados; éstos compuestos son absorbidos en el intestino delgado y en el hígado principalmente (41). Después de ello, sólo una pequeña porción de la catequina pasa al colon con la bilis secretada en el proceso de recirculación enterohepática; éstos compuestos serán degradados en diferentes anillos flavonoides por la acción de la flora intestinal. Los ácidos fenólicos catabolizados pueden ser reabsorbidos en la circulación siendo distribuidos a distintos órganos y tejidos para realizar sus distintas funciones biológicas, o excretados en orina (42).

No se han encontrado receptores específicos en la superficie de las células epiteliales del intestino, por lo que el mecanismo de transporte de la (-) – epicatequina en el epitelio es a través de difusión pasiva (43).

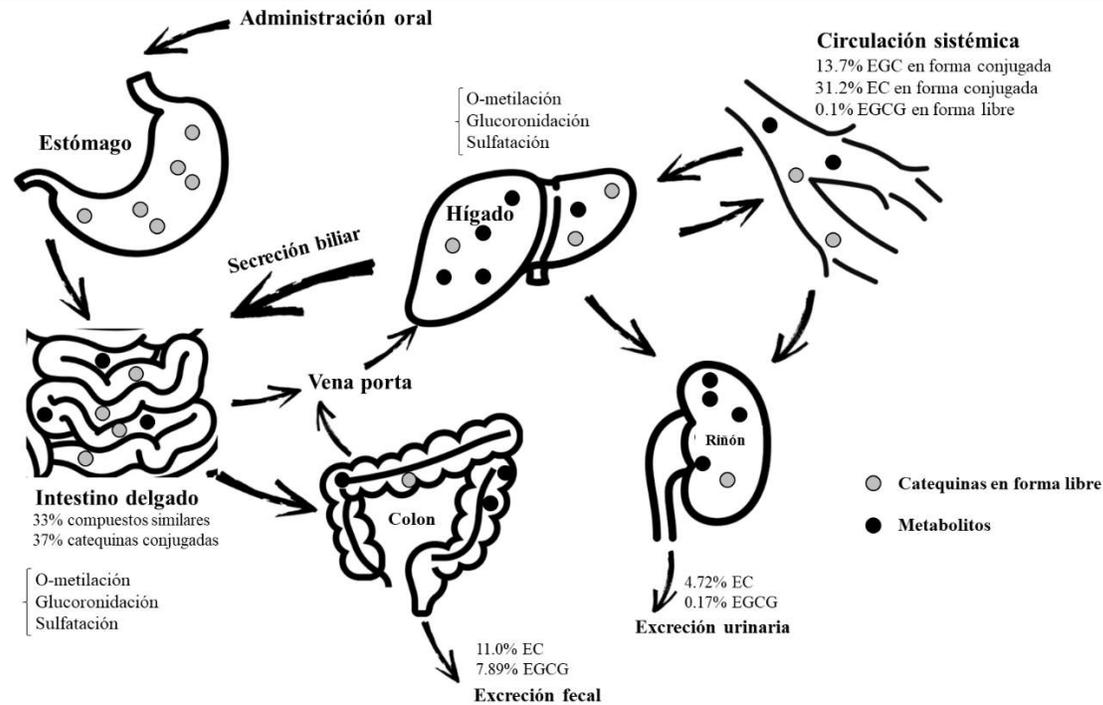


Figura 5. Esquema del metabolismo de epicatequinas. *Adaptado de: Bioavailability of tea catechins and its improvement. Cai Z. (2018) (43).*

Disfunción endotelial

El endotelio es la capa que recubre la parte interna de todos los vasos sanguíneos, está formado por células endoteliales que se encuentran en contacto directo con la sangre. Su principal función es la regulación del tono vascular, mediante la secreción de sustancias vasodilatadoras (óxido nítrico, prostaciclina, factor hiperpolarizante) y vasoconstrictoras (endotelina I, tromboxano A II y angiotensina II)(34) además de regular la proliferación de células vasculares del músculo liso, activación plaquetaria y adhesión leucocitaria.

Bernatova y colaboradores (44) definen la disfunción endotelial como un desequilibrio en el proceso fisiológico normal mediado por el endotelio, que resulta en la disminución de las propiedades anticoagulantes y antitrombóticas, crecimiento

acelerado de tejido vascular y del músculo liso, así como la alteración en la vasodilatación mediada por el endotelio. Factores como la predisposición genética, sedentarismo, tabaquismo, dislipidemias, y el estrés promueven el desarrollo de la disfunción endotelial (Figura 6).

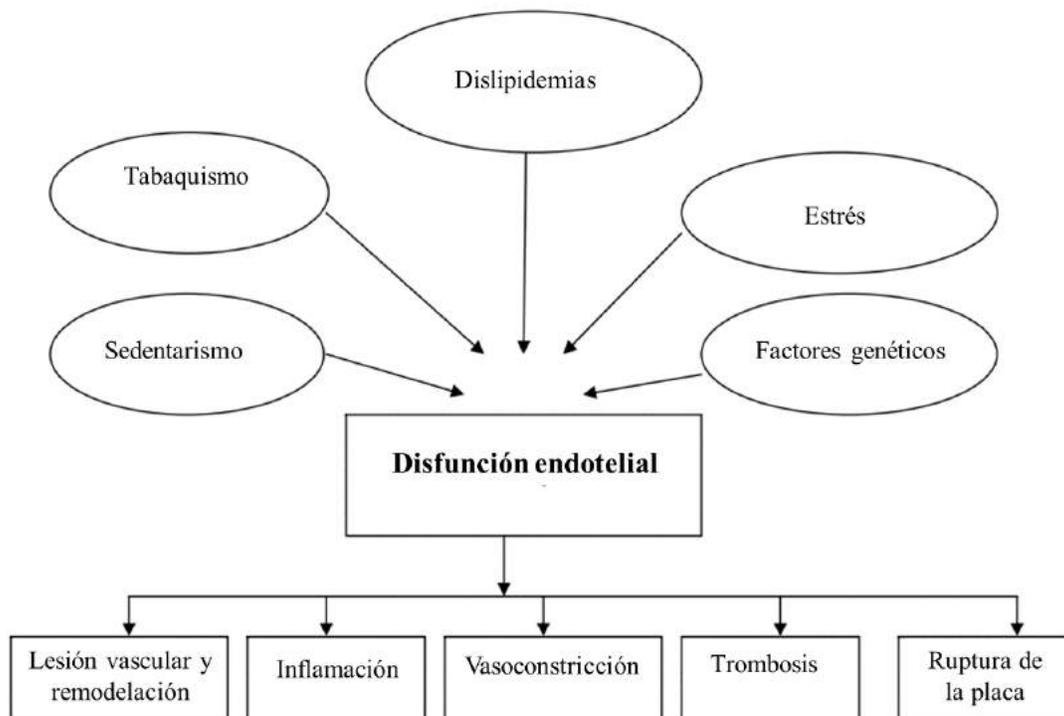


Figura 6. Factores que promueven la disfunción endotelial y consecuencias. *Adaptado de: Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. Hadi H. (2005) (45).*

Los principales mecanismos que participan en la disfunción endotelial son la reducción en la producción de óxido nítrico, aumento en estrés oxidante y reducción en la producción de factor hiperpolarizante (46). La disfunción endotelial está asociada con el desarrollo de hipertensión arterial, cardiopatía coronaria, enfermedad cerebrovascular, insuficiencia cardiaca; y es el primer paso para la progresión de aterosclerosis (considerándose como un marcador de riesgo

cardiovascular). En este proceso de aterogénesis se aumenta la expresión de moléculas de adhesión, entre las que más destaca la Selectina endotelial (Sele-E) (44).

El estrés oxidante es una de las principales causas de la disfunción endotelial, está generado por un desbalance entre la producción y eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediado por antioxidantes; éstas moléculas (ROS) fungen como segundos mensajeros en la activación y regulación de factores de transcripción de cinasas involucradas en crecimiento celular, inflamación, apoptosis y diferenciación celular. El estrés oxidante se asocia con daños y alteraciones en proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, señalización celular, mutaciones genéticas y activación inmunitaria (47).

La protección contra las ROS mediada por los flavonoides puede originarse de cuatro maneras: captación de ROS y/o inhibición de su producción enzimática, quelación de cationes divalentes, terminación de reacciones en cadena e interacción con otros iniciadores (34).

Células HUVEC

Como se ha mencionado antes, las células endoteliales son metabólicamente activas, por lo que están involucradas en distintos procesos patológicos como angiogénesis, inflamación y neoplasia. Distintas patologías comparten éstos procesos fisiológicos, por lo que hace que las células endoteliales sean un modelo ideal para estudios de diagnóstico y de tratamiento.

Las células endoteliales pueden obtenerse de la vena del cordón umbilical; que resulta ser una excelente fuente para su extracción tratándose de un “tejido vivo” y de fácil acceso (Figura 7). Éstas células son denominadas HUVEC (Human umbilical vein endothelial cells).

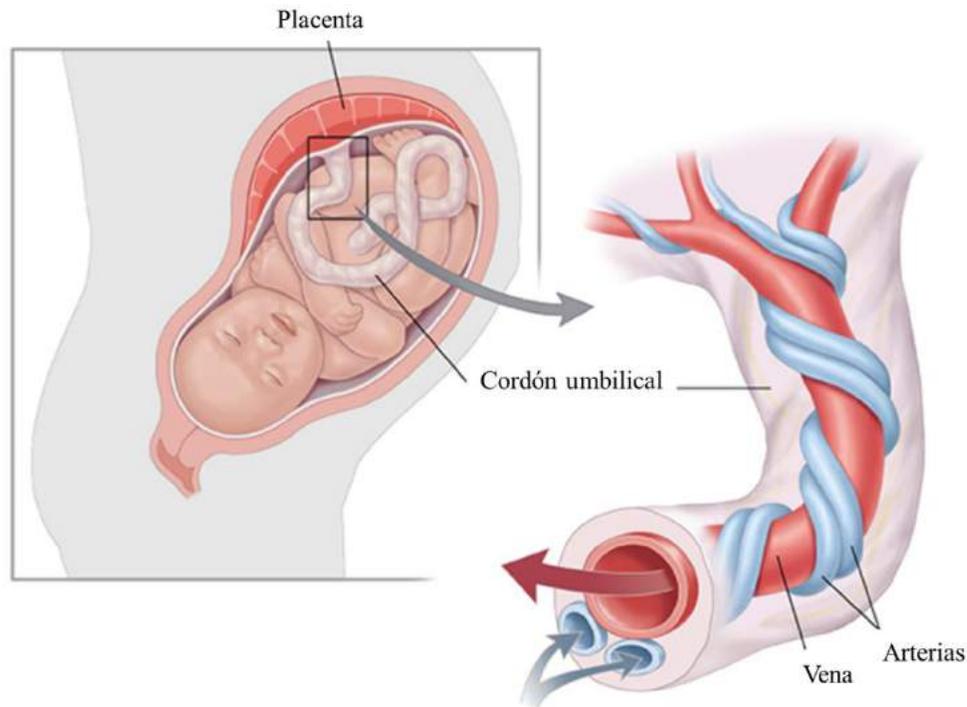


Figura 7. Imagen ilustrativa de la anatomía del cordón umbilical. Las células HUVEC se extraen de la vena umbilical.
Adaptada de Fetal development: The umbilical cord.(48).

Actualmente las células HUVEC son utilizadas para el estudio de procesos fisiológicos mediados por las células endoteliales, tratándose de un modelo estandarizado en análisis de función de células endoteliales humanas en general, desarrollo de aterosclerosis, metástasis, adhesión de leucocitos al endotelio y procesos inflamatorios en general (49).

Como se ha descrito anteriormente, las células endoteliales mantienen un estado de homeostasis vascular, que es alterado durante la disfunción endotelial desencadenando un proceso inflamatorio donde se ven involucradas algunas interleucinas (IL-6, IL-8) y factores de adhesión (Sele-E) mediados por la activación de NF-kB; así como la alteración en la función de enzimas como SOD 2 y eNOS; a continuación, se abordará a detalle de qué manera se involucran éstas moléculas en el proceso inflamatorio.

Interleucina 6 (IL-6)

Se considera que la IL-6 es una interleucina con efectos proinflamatorios. Es producida por diversos tipos celulares, tales como monocitos, macrófagos, linfocitos T y B, fibroblastos, células endoteliales, etc; y está regulada principalmente por la IL-1 y TNF- α , pero también pueden ser activadas por receptores tipo Toll (TLR), prostaglandinas y adipocinas (50). La IL-6 genera sus efectos a través de la unión a su receptor de membrana compuesto por dos subunidades (IL-6 R y gp130), ambas subunidades se solubilizan una vez unida la IL-6; el IL-6 R actúa como agonista de la IL-6, mientras que el gp130 actúa como antagonista (51).

Entre sus principales funciones está la regulación en la maduración y diferenciación de células B, la activación de células T y la inducción de fiebre ante algunas infecciones virales y bacterianas, por lo que se considera que es parte de la respuesta inflamatoria aguda (52). Sin embargo, también responde a inflamación crónica (Figura 9), mediada por estrés oxidante y angiotensina II (ANG II), siendo así un marcador de inflamación vascular, cardiopatías y síndrome metabólico (53).

En la disfunción endotelial, la IL-6 juega un papel importante promoviendo el aumento de moléculas de adhesión intercelular como ICAM-1 y VCAM-1 mediante la activación de la expresión de *Sele-E* (46).

La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) también contribuye al desarrollo de la disfunción endotelial, la IL-6 modula la expresión de receptores AT1R, lo que podría elevar la producción de ROS y vasoconstricción mediada por ANG II(54) y finalmente, todos los múltiples inductores de IL-6 (IL-1, LPS, TNF- α e IL-4) promueven interacciones entre las células endoteliales, leucocitos y plaquetas, generando una activación y daño del endotelio (53).

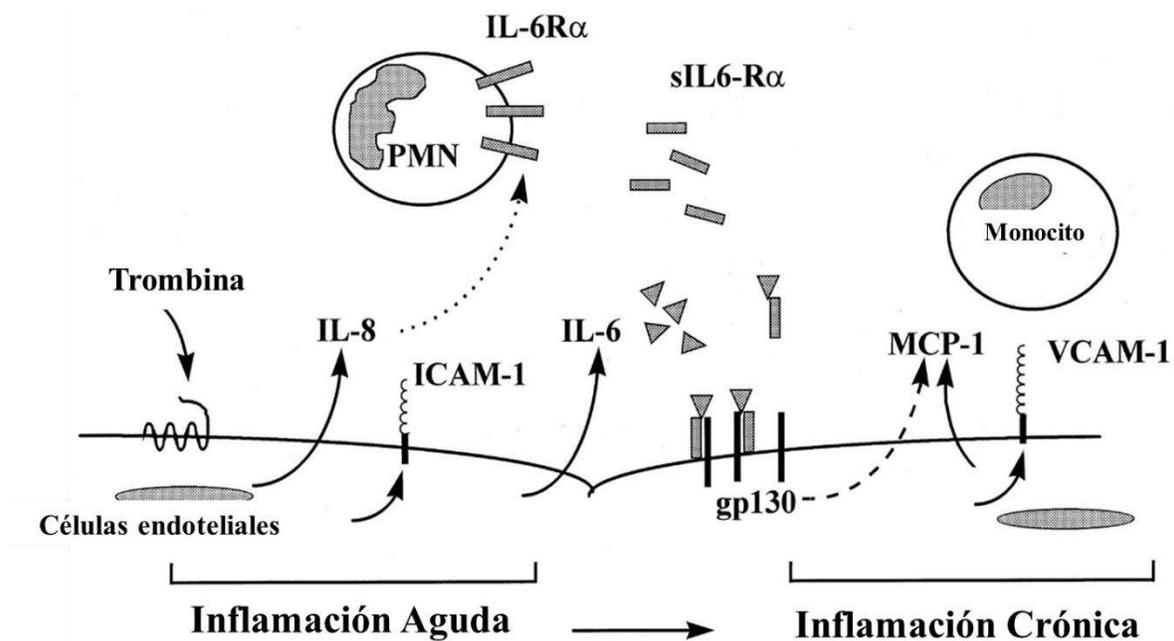


Figura 8. Representación de la inflamación aguda y crónica del endotelio mediada por el complejo IL-6/IL-6R α . Los efectos mediados por IL-6/IL-6R α se observan con la línea de guiones. Durante la inflamación aguda IL-6 promueve el aumento de moléculas de adhesión como ICAM-1, durante la inflamación crónica promueve el aumento de VCAM-1. Adaptado de: *The IL-6-Soluble IL-6R α Autocrine Loop of Endothelial Activation as an Intermediate Between Acute and Chronic Inflammation: an Experimental Model Involving Thrombin.* Marin, (2001) (52).

Interleucina 8 (IL-8)

La interleucina 8 es una citocina perteneciente al grupo de las quimiocinas y se caracteriza por tener efectos proinflamatorios; es codificada por el gen *CXCL8*. Es un importante agente de quimiotaxis de neutrófilos como los leucocitos (principalmente), algunos basófilos y células T (55).

Existen dos isoformas de la IL-8, la derivada de macrófagos y monocitos que cuenta con 72 aminoácidos, y la derivada de células endoteliales y fibroblastos que cuenta con 77 aminoácidos. Ésta interleucina es ligando de dos receptores de membrana: CXCR1 y CXCR2, ambos acoplados a proteínas G (56). Se considera una interleucina activadora de neutrófilos (Figura 9), ya que favorece su degranulación y estimula la fagocitosis.

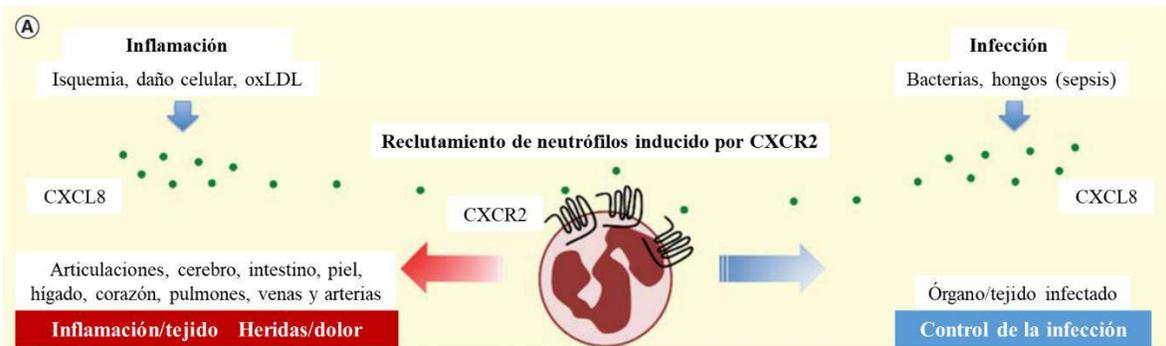


Figura 9. Panorama de la activación de neutrófilos inducido por CXCR2 en el proceso inflamatorio. Durante la inflamación, diversos estímulos pueden generar la producción de ligandos del receptor CXCR2, induciendo la migración de neutrófilos al tejido que se encargan de combatir a los agentes patógenos causantes de la infección. Algunos mediadores inflamatorios (como IL-8) también contribuyen al daño tisular a nivel crónico; incrementando la inflamación y causando dolor. *Adaptado de: The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. Russo. (2014) (57).*

Breland y colaboradores (58) encontraron un aumento en la expresión de quimiocinas ligando del receptor CXCR2 en células mononucleares periféricas y

dentro de la placa aterosclerótica, lo cual evidencia su participación en el desarrollo de la disfunción endotelial.

Una vez que entran contacto con las LDL oxidadas, los monocitos aumentan la expresión de *CXCR2* en su superficie, desencadenando un proceso de adhesión y quimiotaxis derivado de la *CXCL8*; los macrófagos derivados de monocitos también juegan un papel importante en angiogénesis, al ser capaces de formar células espumosas y al entrar en contacto con LDL oxidadas, migrando a la capa íntima de las venas y arterias (57) pudiendo ser éstos los principales mecanismos en la progresión de la aterosclerosis desencadenados por la *CXCL8*.

En algunos estudios con modelos de animales también se ha evidenciado el papel de la *CXCL8* en el desarrollo de aterosclerosis; Qin y colaboradores en 2013 (59) utilizaron una proteína recombinante modificada de *CXCL8* (G31P) como tratamiento para aterosclerosis inducida por una dieta alta en grasas en ratones; ésta proteína actuaba como antagonista de los receptores *CXCR1/CXCR2*. Como resultado de este tratamiento se redujo la expresión de citocinas proinflamatorias, disminución en la producción de metaloproteinasas en la aorta y una reducción significativa de los niveles de colesterol en sangre.

Óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS)

La enzima óxido nítrico sintasa endotelial, como su nombre lo dice, se encarga de producir óxido nítrico. El óxido nítrico participa en la relajación del músculo liso, modula el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) inducido en la angiogénesis y regula la coagulación a través de la activación de plaquetas (60),

por lo que se considera que tiene un papel protector en el desarrollo de aterosclerosis.

Existen tres isoformas de la NOS, NOS neuronal (nNOS), NOS inducible (iNOS) y NOS endotelial (eNOS, también conocida como NOS 3). En placas ateroscleróticas, se ha visualizado la expresión de las tres isoformas de NOS, sin embargo, en arterias normales, predomina la expresión de eNOS (61).

El óxido nítrico se sintetiza en las células endoteliales en una acción catalizada por la NOS (dependiente de NADPH), formando L-citrulina a partir de L-arginina (62).

Selectina-E (Sele-E)

La Sele-E es una glicoproteína que se encuentra en la superficie de las células endoteliales activas, tiene un rol importante en la inmunoadhesión. Se encarga de mediar la adhesión de neutrófilos en el endotelio activado por citoquinas a través de la interacción con PSGL1/CD44 (principales ligandos de Sele-E) y de modular la extravasación de leucocitos del torrente sanguíneo hacia sitios donde ocurre la inflamación (63).

La activación de Sele-E puede ser inducida por mediadores inflamatorios como IL-1B y TNF- α (64) (Figura 10). La Sele-E juega un rol muy importante en el desarrollo de placas ateroscleróticas siendo el primer punto para el desarrollo de éstas; todo inicia con la movilización de leucocitos hacia la superficie de las células endoteliales, donde posteriormente, monocitos proinflamatorios comienzan a filtrarse en la pared vascular, diferenciándose en macrófagos para agravar el proceso inflamatorio generando una progresión hacia la aterosclerosis (65,66).

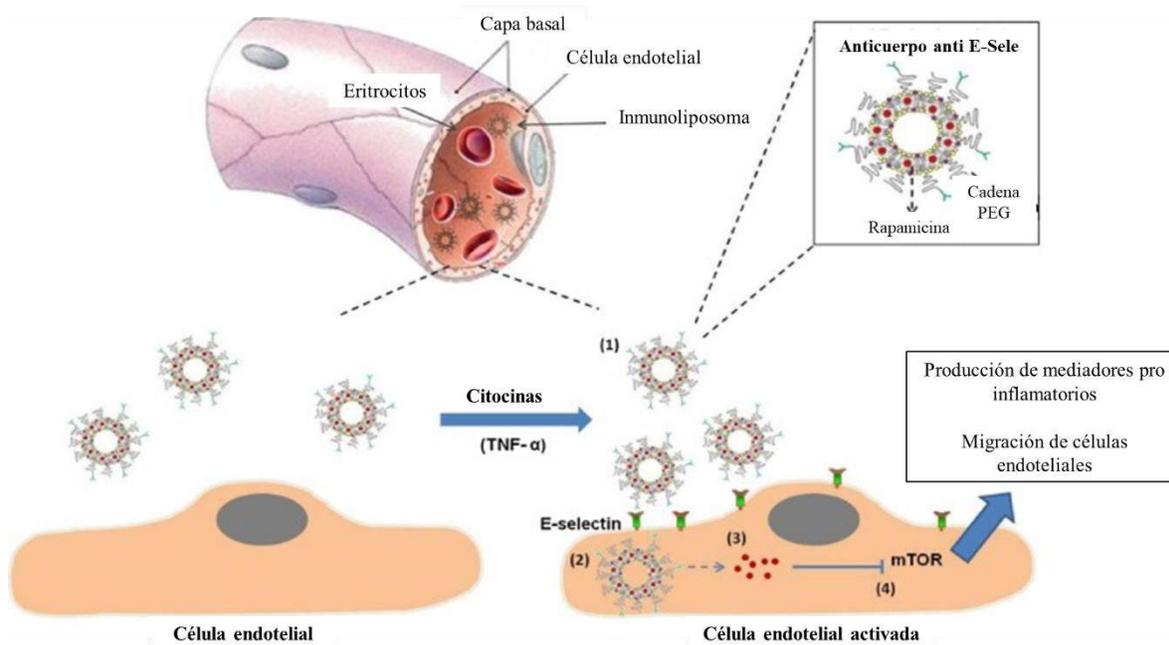


Figura 10. Activación de Sele-E y mecanismo de acción. La Sele-E se encuentra en la superficie de las células endoteliales y puede ser activada por citosinas proinflamatorias como IL-1B y mediadores inflamatorios como TNF- α ; una vez activada la Sele-E es capaz de promover la extravasación de leucocitos a sitios de inflamación y la producción de otros mediadores pro inflamatorios. *Adaptado de: E-selectin targeted immunoliposomes for rapamycin delivery to activated endothelial cells. Gholizadeh S. (2018) (66).*

Mientras que la Sele-E se encarga de activar la migración de leucocitos, otras moléculas de adhesión como VCAM-1 promueven una interacción más fuerte entre leucocitos y células endoteliales en la trans migración hacia el músculo liso (67).

Superóxido dismutasa 2 (SOD 2)

Las especies reactivas de oxígeno tienen un importante rol en la patogénesis de enfermedades cardiovasculares como la HTA y aterosclerosis; las superóxido dismutasas (SODs) son la principal defensa de nuestro organismo ante éstas moléculas. Existen 3 isoformas de SOD; *SOD 1* se ubica en el citoplasma, *SOD 2* en la mitocondria, y *SOD 3* se ubica en el espacio extracelular (68). Las SODs son capaces de destruir los radicales aniones superóxido, producidos regularmente en

las mismas células mediante la dismutación de $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 y su posterior reducción a H_2O por acción de la catalasa (69) (Figura 11).

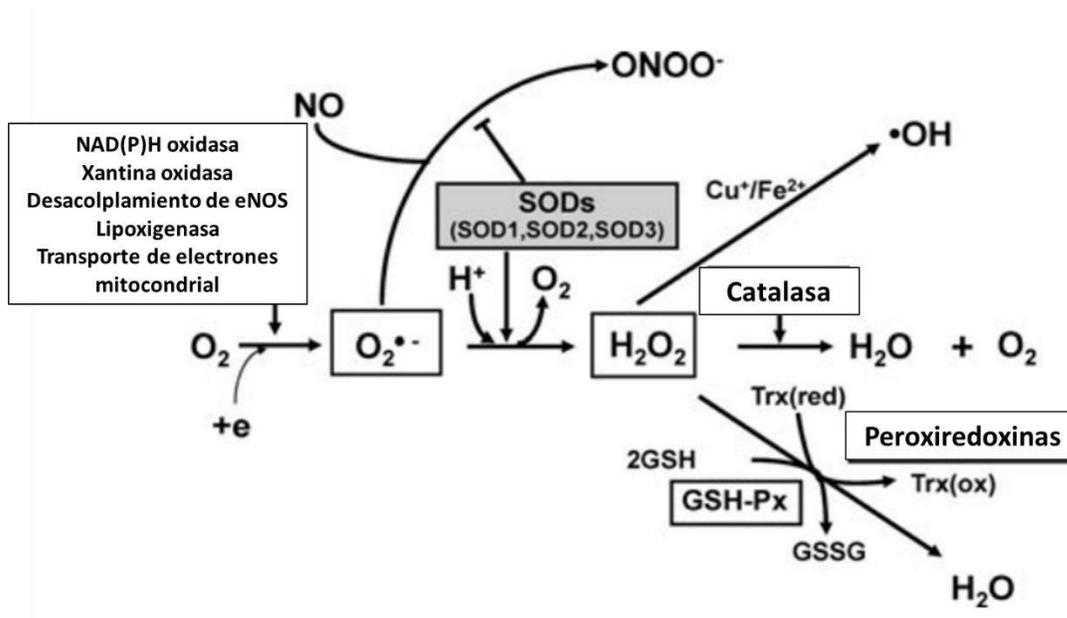


Figura 11. Esquema general de la producción de ROS y su metabolismo mediado por SODs. El superóxido ($O_2^{\cdot-}$) es producido por la NADPH oxidasa, xantina oxidasa y óxido nítrico sintasa y por algunas enzimas mitocondriales. Por acción de SOD, es convertido a H_2O_2 ; posteriormente es reducido a H_2O por algunas peroxidases y peroxiredoxinas. *Adaptado de Superoxide dismutases: Role in redox signaling, vascular function, and diseases. T. Fukai (2011) (68).*

SOD 2 se encarga de regular la función mitocondrial mediante la captación de ROS y la inhibición de ONOO $^-$, esto ocurriendo en la matriz mitocondrial, donde se genera gran cantidad de ROS por la vía de fosforilación oxidativa (68).

Factor nuclear kappa-B (NF-kB)

El factor nuclear kappa-B es un factor de transcripción pleiotrópico presente en casi todas las células del organismo, es el punto final de distintos eventos de señales de transducción iniciados por procesos como la inflamación, inmunidad, diferenciación, crecimiento celular, tumorigénesis y apoptosis (60). Se considera que NF-kB es un potente factor pro aterogénico por su capacidad de regular la expresión de genes

de respuesta inmune e inflamatoria tales como citoquinas, quimiocinas, moléculas de adhesión, etc (70).

NF- κ B es un complejo heterodimérico formado por proteínas de la familia Rel, conteniendo RELA/p65, RELB, NF- κ B1/p105, NF- κ B1/p50 y NF- κ B2/p52. Los distintos dímeros pueden actuar como activadores transcripcionales o represores. El complejo NF- κ B se encuentra en el citoplasma en un estado inactivo acoplado a inhibidores I κ B (60,71), siendo I κ B α el predominante y más conocido. Los I κ Bs son degradados por el proteosoma 26S en respuesta a estímulos con agonistas; liberando así los dímeros de NF- κ B para su translocación al núcleo y modular la expresión génica (72).

La activación clásica o canónica de NF- κ B es inducida por estímulos extracelulares como la activación de citocinas, TNF- α e IL-1 y por agentes externos como productos virales, bacterianos y de levaduras a través de distintos receptores tipo Toll (TLRs). Todos éstos agentes generan la activación del complejo I κ B cinasa (IKK). La ubiquitinación de factores asociados con el receptor de TNF (TRAF) y NEMO (modulador esencial IKK γ) facilita la activación del catalizador IKK β , promoviendo la fosforilación y degradación de I κ B dejando el dímero de NF- κ B libre para la translocación al núcleo y poder activar genes blanco. En ésta ruta, NF- κ B regula la transcripción de quimiocinas, citoquinas y moléculas de adhesión (71,73) (Figura 12).

La ruta alternativa o no canónica independiente de NEMO es inducida en respuesta al factor activador de células B (BAFF), linfotoxina β y RNA viral. La principal diferencia en ésta ruta es el procesamiento inducible del precursor p100 de NF- κ B2

en su forma madura y la liberación de los complejos de NF- κ B secuestrados. El procesamiento de p100 es mediado por la fosforilación inducida de IKK α (74).

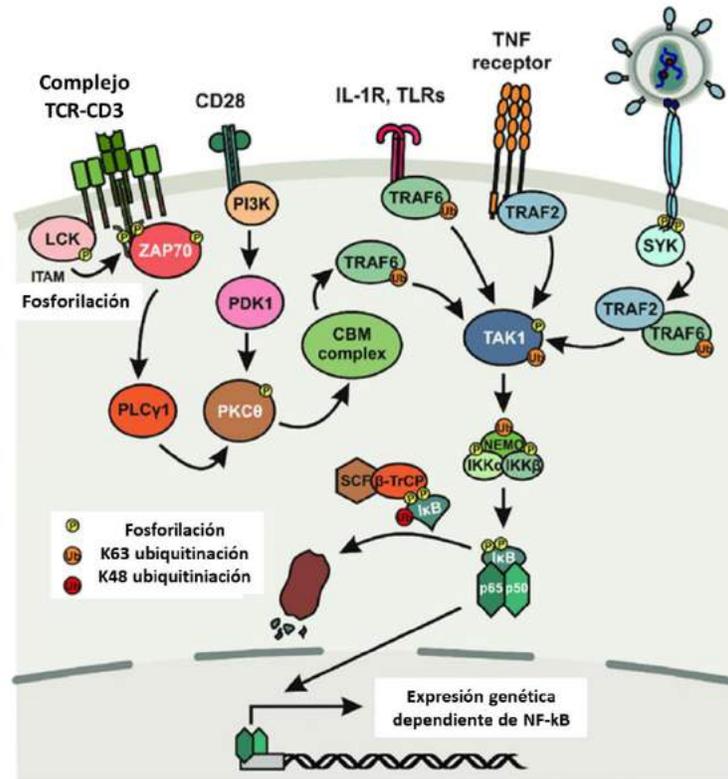


Figura 12. Activación de la ruta canónica de NF- κ B. Adaptado de: *Primate Lentiviruses Modulate NF- κ B Activity by Multiple Mechanisms to Fine-Tune Viral and Cellular Gene Expression*. E. Heusinger (2017)(73).

Lipopolisacárido (LPS)

Los lipopolisacáridos son un importante componente de la membrana de bacterias gram negativas; son glicoconjugados que consisten en un dominio lipídico unido a un oligosacárido central y un polisacárido distal (75). El lípido A (dominio hidrofóbico) es una endotoxina y principal agente de virulencia, el antígeno O- es el polisacárido distal repetitivo y el "core" u oligosacárido central (Figura 13).

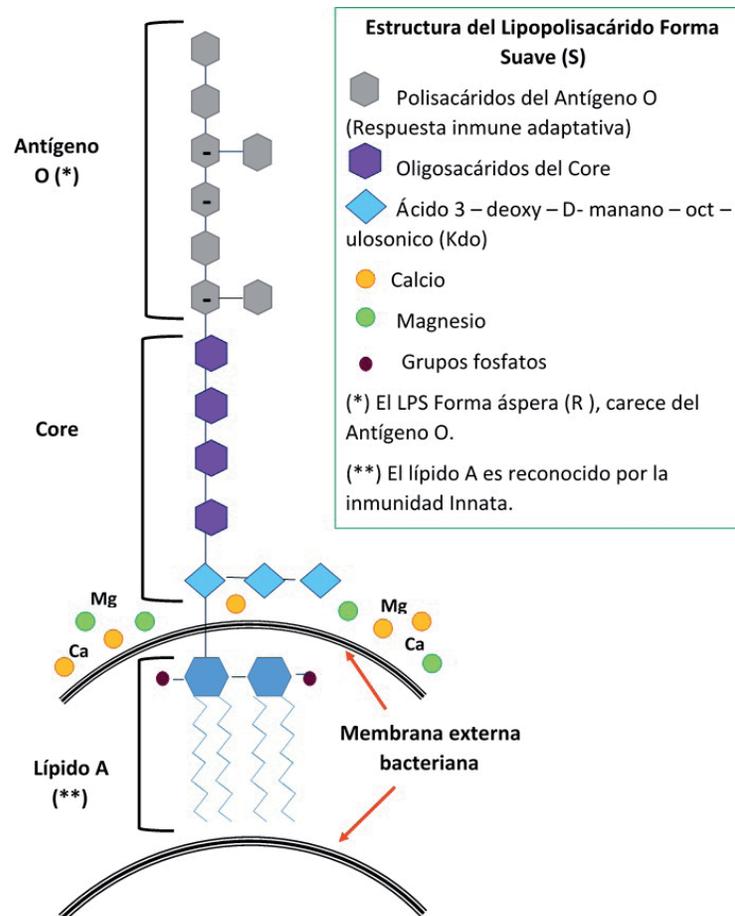


Figura 13. Estructura del lipopolisacárido (LPS). Tomado de: *Fisiopatología de la sepsis por bacterias gram negativas: bases moleculares.* Méndez Y. (2015) (76).

Diversos estudios muestran evidencia de que el LPS induce la expresión de quimiocinas e interleucinas en macrófagos y células del músculo liso. En HUVECs, es reconocido por receptores toll-like 4 (TLR 4), promoviendo la activación de NF- κ B desencadenando así la expresión de citoquinas como TNF- α , *IL-1*, *IL-6* e *IL-8* (77,78).

Antecedentes en el uso de (-) –epicatequina y HUVECs

Diversos estudios se han centrado en demostrar el potencial efecto de los polifenoles del cacao y el chocolate oscuro como agentes antioxidantes,

antiinflamatorios, derivando así beneficios en la salud cardiovascular tanto de manera preventiva como regresiva como a continuación son descritos:

Como se ha descrito anteriormente, la biodisponibilidad de los polifenoles depende en primera instancia de la cantidad que puede aportar el alimento así como su propia matriz, del consumo de cada individuo y del efecto de enzimas digestivas y la microbiota en el metabolismo (31). Se tiene registro de que la concentración de metabolitos en plasma puede ir desde los 0.011 $\mu\text{M/L}$ (32) hasta los 5.92 $\mu\text{M/L}$ (33), siendo consideradas como dosis fisiológicamente alcanzables.

Noratto y colaboradores en 2011(79) evaluaron el potencial efecto protector de polifenoles de açaí y de uva muscadine en HUVECs bajo estrés inflamatorio inducido por LPS y glucosa. Como parte de sus resultados encontraron que los tratamientos con açaí y uva muscadine lograron disminuir la expresión de mRNAs de *NF-kB*, *IL-6*, *IL-8* y de moléculas de adhesión como Sele-E, VCAM-1 e ICAM-1. A pesar de que ambos tratamientos mostraron efectos positivos, la uva muscadine pareciera ser más eficaz en la regulación de moléculas proinflamatorias.

Chen-Wei y colaboradores (80) en 2017 analizaron los efectos de resveratrol sobre la expresión de ICAM-1 inducido por TNF- α en HUVECs. El resveratrol logró contrarrestar la reducción en la expresión de miR-221/222, de p38 MAPK y NF-kB inducidas por TNF- α . También logró atenuar la expresión de ICAM-1 y la adhesión de monocitos.

González-Garrido y colaboradores en 2013 (81) analizaron el efecto de (-) –epicatequina sobre la vía de L-arginina-NO alterada en mujeres con preeclampsia,

usando HUVECs como modelo de estudio. Tratamientos con (-)-epicatequina 1 μ M y 5 μ M lograron disminuir la actividad de NADPH y arginasa; sugiriendo que la inhibición de éstas dos enzimas promovería la disminución de niveles de superóxido y el incremento en la síntesis y biodisponibilidad de NO.

Si bien el efecto protector de los polifenoles en la salud vascular ha sido evidenciado en diversos estudios, aún se desconocen puntualmente los mecanismos a nivel molecular y de acción a nivel endotelial. Milenkovic y colaboradores en 2018 (82) a través de análisis de transcriptoma, miRNoma y epigenoma de células endoteliales expuestas a (-)-epicatequina pudieron demostrar que a éstos niveles de regulación, los metabolitos afectan distintas vías celulares involucradas en la permeabilidad celular y de interacción con células del sistema inmune. Con estudios *in-vitro* comprobaron que los metabolitos de (-)-epicatequina reducen la adhesión de monocitos y su translocación al endotelio.

3. JUSTIFICACIÓN

Según datos del INEGI 2017, las ECV representan la principal causa de muerte y morbilidad en nuestro país, abarcando el 24% de todas las defunciones registradas en México. La OMS manifiesta que las principales causas para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares son la mala alimentación y la inactividad física; por lo que si se busca disminuir ésta epidemia global, la alimentación es un punto de enfoque para lograrlo.

Actualmente existen diversos estudios que muestran evidencia del efecto potencial de los polifenoles sobre el desarrollo de inflamación y estrés oxidante, (factores clave en la evolución de ECV). Sin embargo, no todos los polifenoles se encuentran en la misma proporción en los alimentos, y no todos los alimentos están disponibles para toda la población. Es por ello que para éste estudio resulta importante indagar sobre los efectos que generan dosis fisiológicamente alcanzables de EC, (compuesto fenólico que se encuentra en mayor proporción en el cacao) en la expresión de genes de respuesta inflamatoria generada en el proceso de disfunción endotelial como parte de la fisiopatología de las ECV. El cacao es un producto de fácil acceso en nuestro país, y en algunas regiones forma parte de la dieta de sus habitantes. Indagar sobre el potencial efecto de dosis de EC que pueden obtenerse a través de la dieta podría ayudar a desarrollar nuevas estrategias para la prevención y tratamiento de enfermedades cardiovasculares; a través de modelos estandarizados (como los son las HUVECs) para el análisis de la función de células endoteliales y comprender la fisiología de la aterosclerosis, la disfunción endotelial y procesos inflamatorios a nivel de expresión de genes.

4. HIPÓTESIS

La estimulación con dosis fisiológicamente alcanzables de (-) -epicatequina promoverá la disminución de la expresión de los genes *IL-6*, *IL-8*, *eNOS* y *Sele-E*, *NF-kB p50* y *SOD 2* en el proceso inflamatorio inducido por LPS en HUVECs.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la (-) -epicatequina en la expresión de genes de respuesta inflamatoria inducida por LPS sobre células endoteliales en cultivo primario (HUVECs).

5.2 Objetivos específicos

- Analizar el grado de pureza de los cultivos primarios de HUVECs mediante ensayos de citometría de flujo.
- Analizar la expresión de *IL-6*, *IL-8*, *Sele-E*, *eNOS*, *NF-kB p50* y *SOD 2* mediante q-PCR posterior a la estimulación en HUVECs con diferentes dosis fisiológicamente alcanzables de (-) -epicatequina, luego de generar una respuesta inflamatoria inducida por LPS.
- Comparar el efecto de la (-) -epicatequina posterior a la estimulación con diferentes dosis fisiológicamente alcanzables en la expresión de *IL-6*, *IL-8*, *Sele-E*, *eNOS*, *NF-kB p50* y *SOD 2* vs β -Actina como gen de referencia sobre HUVECs luego de generar una respuesta inflamatoria inducida por LPS.

- Demostrar la ausencia de un efecto citotóxico generado por los tratamientos de (-) –epicatequina mediante un ensayo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazol ó MTT.

6. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

Este estudio se generó a partir del proyecto "Comparación del efecto de un extracto de cocoa vs polifenoles biotransformados sobre la expresión génica en células mononucleares y endoteliales" con el número de registro 204 en el INMEGEN. Los fondos fueron otorgados por la Cátedra de Nutrigenómica Nestlé-INMEGEN y el INMEGEN. Dicho proyecto tiene aprobación de los comités de investigación, ética en investigación y bioseguridad del INMEGEN.

6.1 Diseño del estudio

Estudio experimental de laboratorio, utilizando como modelo un cultivo primario de HUVECs.

6.2 Muestra

Se usaron células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVECs) en cultivo primario. Se aseguró una reproducibilidad de la muestra realizando cada experimento por triplicado; todo esto a partir de la extracción de las células de los cordones umbilicales.

Para realizar los experimentos de expresión de mRNA se realizaron duplicados de las muestras obtenidas de la extracción celular (para qPCR).

Se utilizaron las muestras de RNA para hacer los experimentos por triplicado; se utilizaron muestras correspondientes a experimentos previos realizados en el laboratorio de Nutrigenética y nutrigenómica bajo las mismas condiciones por Gonzalez, M en 2017 (39) lo que permitió comparar el fenómeno en dos cordones umbilicales distintos.

Criterios de inclusión y de exclusión

Criterios de inclusión:

- Mujeres embarazadas mayores de edad sin comorbilidades y que aceptaron firmar el consentimiento informado.

Criterios de exclusión:

- Mujeres embarazadas menores de edad o con comorbilidades.

6.3 Instrumento de investigación

Al tratarse de un estudio experimental en laboratorio se utilizaron diversos instrumentos de investigación:

- QuantStudio 7 Real Time PCR System – Sistema para análisis de PCR en tiempo real, que permite detectar la abundancia de transcritos.
- BD FACSAria III – Citómetro de flujo, mediante marcadores específicos permite evaluar la pureza de los cultivos celulares.
- FilterMax F5 – Espectrofotómetro para cuantificar la absorbancia de distintas muestras que permite interpretar datos de citotoxicidad.

6.4 Desarrollo del proyecto

Diagrama de flujo

Para el desarrollo del proyecto se realizaron distintas actividades, partiendo desde un entrenamiento previo en técnicas de cultivo celular. En la Figura 14 se observan las actividades desarrolladas.

A continuación se explican a detalle todas las actividades.

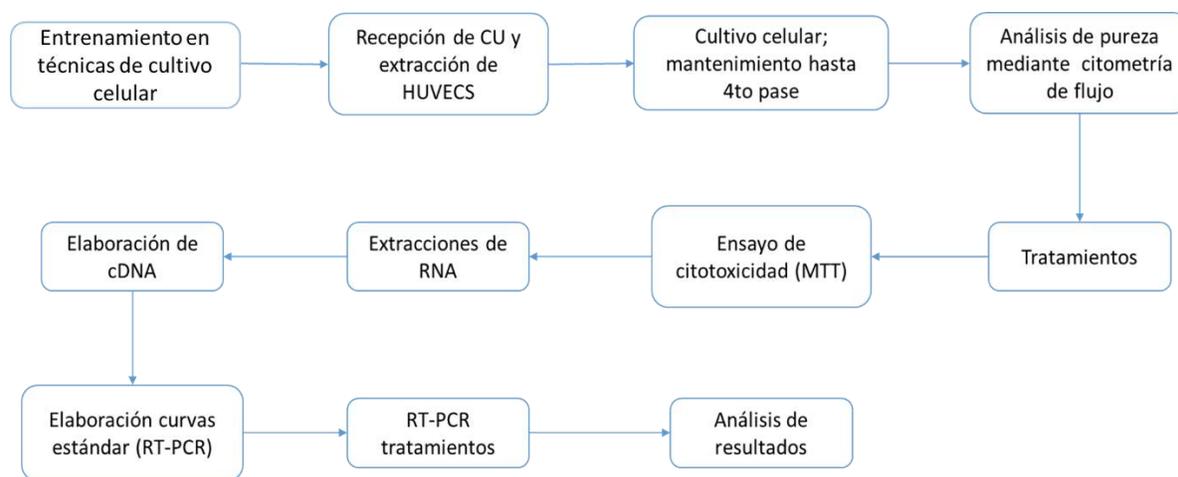


Figura 14. Diagrama de flujo. Desarrollo de las actividades realizadas en el estudio.

Entrenamiento en técnicas de cultivo celular

Previo a la recepción y manejo de los cordones umbilicales se realizó un entrenamiento en técnicas de cultivo celular, así como se revisaron las buenas prácticas del cuarto de cultivo celular y todos sus equipos (campana de flujo laminar, centrifugas, contador de células, estufas e incubadoras).

Recepción de cordones umbilicales y extracción de HUVECs.

En el presente estudio se utilizaron células HUVECs obtenidas de cordones umbilicales donados por mujeres sanas que fueron sometidas a cirugía de parto y que previamente habían firmado el consentimiento informado (Anexo 1). Los cordones fueron transportados desde el hospital de procedencia hasta el INMEGEN en Medio de transporte (M199) para su inmediata manipulación (Anexo 3).

La extracción de HUVECs se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo de B. Baudin y con algunas adaptaciones y modificaciones de acuerdo al laboratorio con el que se cuenta en el INMEGEN, como a continuación se describe:

Se utilizaron aproximadamente 15 ml de colagenasa 0.05% (Gibco Life Technologies #1797321), dejándose incubar 30 minutos a 37°C.

Para inactivar la colagenasa se utilizó la misma cantidad de M199 de inactivación (15 ml), posteriormente se centrifugó la muestra a 1200 RPM durante 7 minutos. El pellet formado en el fondo del tubo se resuspendió en 1 ml de M199 completo + 20% SFB + GF. Posteriormente se sembraron las células en frascos para cultivo Corning y fueron incubadas a 37°C y 5% CO₂. El protocolo completo para la extracción de HUVECs se encuentra en el Anexo 4 de éste documento.

Cultivos celulares y mantenimiento hasta 4to pase.

Las células se mantuvieron en condiciones estándar (a 37°C y 5% CO₂) se les realizó cambio de medio cada 48 h para asegurar su integridad. El medio utilizado hasta el primer pase fue M199 completo, con SFB 20% + Suplemento de Factor de crecimiento endotelial de pituitaria bovina (GF) (Sigma-Aldrich E0760). Después del

primer pase se utilizó M199 completo, con SFB 10% + GF, manteniéndose así hasta el 4to pase.

Para realizar los pases fue necesaria una confluencia celular de aproximadamente 80%-90%. Primero se retiró el medio, luego se hicieron 1 ó 2 lavados con 2 ml de PBS 1X (Gibco Life Technologies #1139904) a 37°C; se agregaron 3-4 ml de Tripsina-EDTA #25300-062 y la muestra se dejó incubar por aproximadamente 3-4 min a 37°C y 5% CO₂ hasta que se observaron en el microscopio las células despegadas. Para inactivar la tripsina se utilizó la misma cantidad de M199 (3-4 ml). La muestra se centrifugó a 1200 RPM por 7 min para obtener el pellet. El pellet fue resuspendido en 1 ml de M199 completo + SFB 10% para poder sembrar las células en otros frascos; dependiendo de la cantidad de células obtenidas se decidió en cuantos frascos se distribuían (Figura 15).

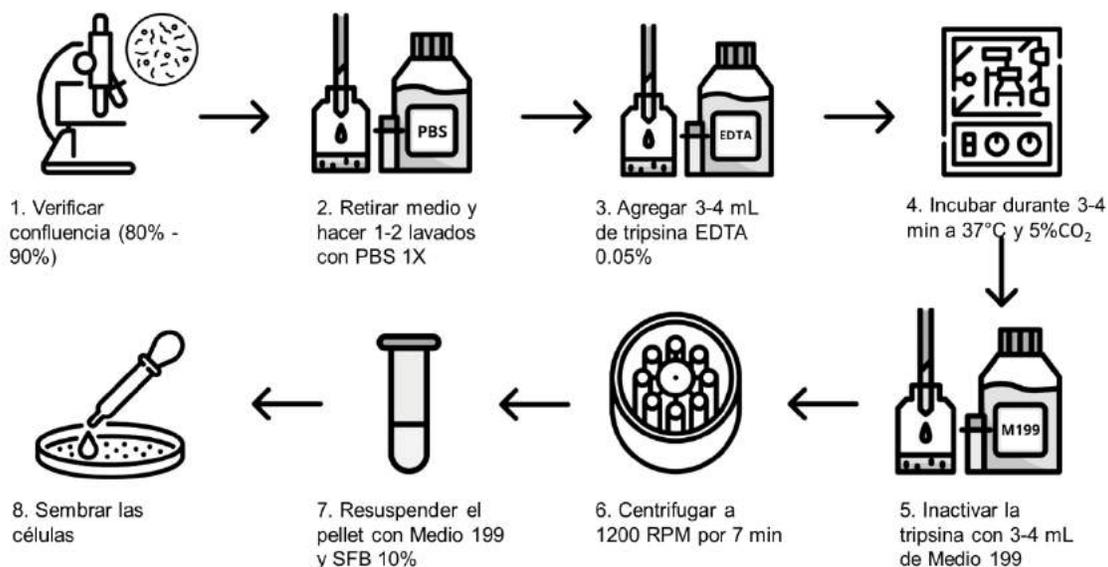


Figura 15. Procedimiento para realizar los pases celulares. Se realizaron 4 pases previos al tratamiento.

Se realizó el mismo procedimiento hasta alcanzar el 4to pase, donde se realizaron los tratamientos.

El protocolo para la realización de pases se encuentra en el Anexo 5. Los protocolos para congelación y descongelación de células se encuentran en los Anexos 6 y 7.

Análisis de pureza mediante citometría de flujo

Se realizó un análisis de citometría de flujo para evaluar la pureza de los cultivos celulares utilizados para este estudio, un promedio de 1×10^6 de células fue utilizado para éste análisis.

Se utilizaron 2 anticuerpos a una dilución 1:50 en SFB 2%. El primer anticuerpo fue CD31(PECAM-1) Mouse anti-human monoclonal (#CBL468F) (Chemicon) acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) con un espectro de luz de 516-525 nm y el anticuerpo Anti-CD62E de Selectina endotelial (#ab82531) (ABCAM) acoplado a ficoeritrina con un espectro de luz de 480-580 nm.

Para realizar el ensayo, primero se lavaron las células 2-3 veces con PBS 1X para eliminar residuos del medio, posteriormente se realizó un bloqueo con SFB al 5% durante 10 min; se lavaron nuevamente 2-3 veces con PBS 1X. La muestra se incubó con el respectivo anticuerpo 1 h y después se lavó nuevamente con PBS 1X. Se realizó una fijación con paraformaldehído 4% (PFA) durante 10 min a 4°C. La muestra finalmente fue resuspendida en 1 ml de PBS 1X para realizar la prueba. El análisis de citometría de flujo se realizó con el citómetro FACS Aria III en la Unidad de Citometría de Flujo del INMEGEN. El protocolo completo (Protocolo A) para realizar el análisis de citometría de flujo se encuentra en el Anexo 8.

Tratamientos

Los tratamientos se realizaron una vez que las células llegaron al 4to pase y al alcanzar una confluencia del 90%.

Para realizar los tratamientos, se utilizaron placas de cultivo de 6 pozos Corning. Previo a la estimulación se retiró el medio, se lavó con PBS 1X. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Los tiempos a evaluar en éste estudio fueron 2 y 4 h.

Tratamiento 1 – Estímulo con distintas dosis de (-) –epicatequina (EC).

Se seleccionaron 3 dosis fisiológicamente alcanzables, calculando diluciones seriales; una dosis baja (0.001 μ M), una dosis media (0.01 μ M) y una dosis alta (0.1 μ M) de (-) –epicatequina (SIGMA #E4018-5 mg).

El tiempo de estímulo fue de 2 h; como se ha revisado en la literatura (35,36), es el tiempo donde se ha registrado el mayor pico de concentración de (-) –epicatequina en plasma. De la misma manera, estos tiempos de estímulo han sido estandarizados en experimentos previos realizados en el laboratorio de nutrigenética y nutrigenómica del Instituto Nacional de Medicina Genómica, reportados por Ponce de León, S en 2008 (38) y González M en 2017 (39).

Para lograr la concentración deseada de las dosis utilizadas, se partió de una solución madre 10 mM diluída en DMSO. A continuación se muestra un diagrama de cómo se realizaron las diluciones (Figura 16 y Tabla 3).

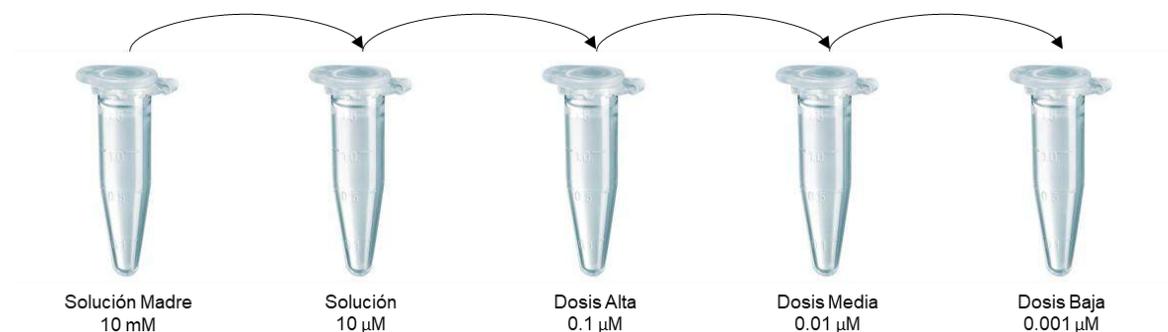


Figura 16. Diluciones de (-) –epicatequina para tratamientos de HUVECs.

Tabla 3. Esquema de diluciones de (-) –epicatequina para tratamientos con HUVECs.

Concentración	Vol. Necesario dilución	Vol. Necesario M199 + Antibiótico µL	Volumen final µL
10 µM	2 µL Sol. Madre	1,998	2,000
0.1 µM	40 µL Sol. 10 µM	3,960	4,000
0.01 µM	700 µL Sol. 0.1 µM	6,300	7,000
0.001 µM	600 µL Sol. 0.01 µM	5,400	6,000

Tratamiento 2 – Estímulos con LPS

Para realizar este tratamiento se utilizó LPS bacteriano, proveniente de *Escherichia coli* O55:B5 de Sigma Aldrich (#297-473-0). A partir de una solución madre (1 mg de LPS en 1 ml de PBS 1X) se realizó una dilución para obtener la concentración deseada en cada pozo; tomando 2 µL de la solución madre y colocándolos en 798 µL de medio de estimulación, logrando una concentración de 1 µg/ml.

Éste estímulo sólo con LPS se hizo para los tratamientos de 2 y 4 h. Todos los tratamientos se hicieron por triplicado.

Tratamiento 3 – Estímulos previos con (-) –epicatequina y LPS.

Para éste tratamiento se utilizaron las mismas diluciones de (-) –epicatequina y de LPS descritas anteriormente. Primero se realizó el estímulo con dosis 0.001 μM , 0.01 μM y 0.1 μM de EC, utilizando 200 μL de las dosis correspondientes (Tabla 3) y posteriormente el estímulo con LPS.

Para el tratamiento de 2 h, el estímulo con (-) –epicatequina se mantuvo 1 h y posteriormente se añadió el LPS 1 h. En el tratamiento de 4 h, el estímulo con (-) –epicatequina se mantuvo durante 2 h y posteriormente se añadió el LPS y se mantuvo durante 2 h.

Todos los tratamientos se realizaron por triplicado. A continuación se muestran los esquemas de los tratamientos completos de 2 h (Figura 17) y 4 h (Figura 18).

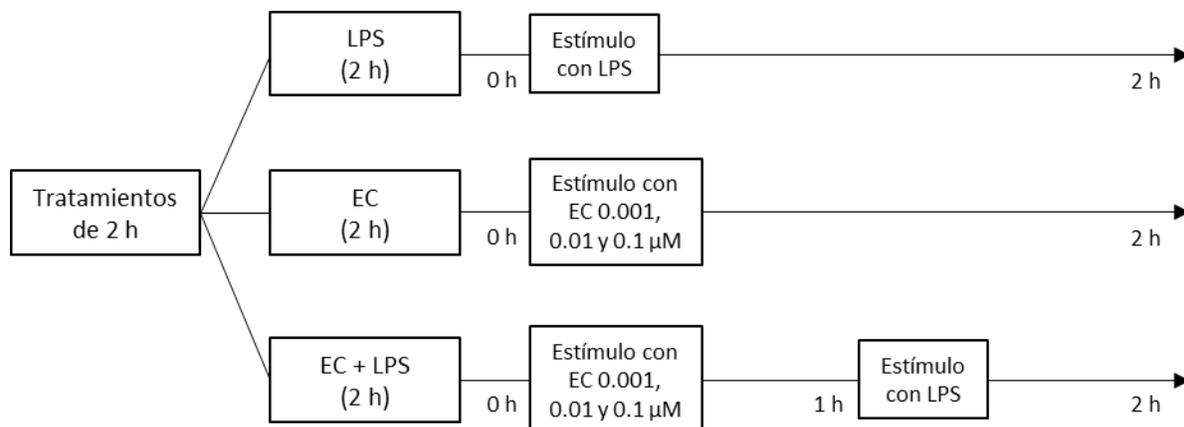


Figura 17. Esquema del tratamiento de 2 h. Cada tratamiento se hizo por triplicado. (-) –epicatequina (EC).

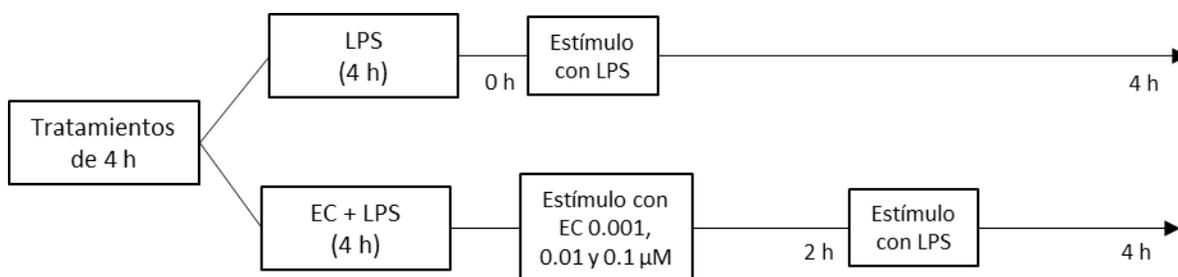


Figura 18. Esquema del tratamiento de 4 h. Cada tratamiento se hizo por triplicado. (-) –epicatequina (EC).

Extracciones de RNA

Se agregaron 500 μL de TRIzol (Invitrogen # de catálogo 98903) en cada pozo. Se agregaron 100 μL de cloroformo y las muestras se centrifugaron a 12,000 RPM por 15 min. Se separó la parte acuosa y se le agregaron 250 μL de isopropanol. Nuevamente se centrifugó la muestra a 12,000 RPM durante 10 min; con cuidado de no dañar el pellet, se retiró el sobrenadante. Se realizaron 3 lavados con 500 μL de etanol al 75%. Finalmente el pellet se resuspendió en 22 μL de H_2O grado molecular, libre de RNAsas.

Al terminar la extracción del RNA se cuantificó su pureza y concentración mediante medidas de absorbancia 260/280 y 260/230 nm en un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 de Thermo Fisher Scientific. El RNA se almacenó a -80°C . La extracción se realizó de acuerdo a las especificaciones del proveedor, el protocolo completo se encuentra en el Anexo 9.

Síntesis de cDNAs

Una vez obtenido el RNA, se utilizó para sintetizar cDNAs mediante RT-PCR usando el kit First Strand cDNA Synthesis Kit (#K1612).

Primero se ajustó la concentración de todas las muestras de RNA a analizar, con una concentración de entre 500-1000 ng, utilizando H₂O grado molecular ajustando a un volumen final de 20 µL. Se colocó 1 µL de Random Primer a cada tubo de la dilución. Para realizar la RT-PCR se siguió el protocolo del proveedor (Anexo 10), siguiendo los cálculos de la Tabla 4, esto se multiplicó por el número de reacciones que se realizaron en el momento.

Tabla 4. Cálculos para preparación de Master Mix para rt-PCR

Reactivo	Volumen (µl)
RNA	5
Agua	Ajustar volumen a 11 µl
Reaction Buffer 5X	4
10 mM dNTPs	2
Mm Rev	2
Ribolock RNAsa	1
TOTAL	20

Curvas estándar

Una vez obtenidas las muestras de cDNA se realizaron las curvas estándar para cada uno de los genes de estudio (*IL-6*, *IL-8*, *Sele-E*, *eNOS*, *NF-kB p50* y *SOD2*), así como de *β-Actina* que fue utilizada como gen de referencia. Se realizaron diluciones seriales 1:5, con concentraciones desde 1,000 ng hasta 0.3 ng. Se utilizaron 2 µL de cada muestra para hacer la reacción. Para cuantificar la expresión se realizó una PCR en tiempo real haciendo uso de sondas Taqman de Applied Biosystems específicas para cada gen de interés (Tabla 5).

Tabla 5. Sondas utilizadas para PCR en Tiempo Real.

Gen de Interés	Sonda
<i>IL-6</i>	HS00985639_m1
<i>IL-8</i>	HS00174103_m1
<i>Sele-E</i>	HS00174057_m1
<i>eNOS</i>	HS01574659_m1
<i>NF-kB (p50)</i>	Hs00765730_m1
<i>SOD2</i>	Hs00167309_m1

En la Tabla 6 se reportan los reactivos necesarios así como su cantidad para llevar a cabo la reacción.

Tabla 6. Cálculos de Master Mix para reacción de PCR en tiempo real.

Reactivo	Volumen (µl)
H ₂ O	2.5
MM Máxima Probe	5
Sonda	0.5
TOTAL	8

Al terminar el llenado de las placas, éstas se centrifugaron a 3,200 RPM durante 2-3 min para asegurar la homogeneidad en la muestra y evitar burbujas que alteraran la medición.

El análisis de las placas se llevó a cabo en la unidad de secuenciación del INMEGEN, en el equipo QuantStudio 7 de Applied Bio Systems; el análisis y visualización de los resultados se realizó en el Software QuantStudio 7.

El protocolo completo para la realización de PCR en Tiempo real se encuentra en el Anexo 11.

PCR en tiempo real RT-PCR

Para evaluar el efecto en la expresión de *IL-6*, *IL-8*, *Sele-E*, *eNOS*, *NF-kB p50* y *SOD 2* se hizo un análisis de PCR en tiempo real (Tabla 6). Se utilizó β -*Actina* como gen de referencia para realizar la comparación de cambios entre los grupos con su respectivo tratamiento. Para éste análisis se realizaron duplicados de cada tratamiento realizado en éste estudio, pero también se utilizaron muestras de RNA obtenidas bajo las mismas condiciones de tratamiento en experimentos previos teniendo en total de 4 muestras para analizar, por cada tratamiento. El cambio en la expresión se reportó en Fold Changes (Veces de cambio).

El protocolo completo para la realización de PCR en Tiempo real se encuentra en el Anexo 11.

Ensayo de citotoxicidad (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio ó MTT)

Se realizó una serie de ensayos de citotoxicidad de 1, 2 y 4 h para evaluar el posible efecto citotóxico de las distintas dosis de (-) –epicatequina utilizadas en el estudio.

El componente principal del ensayo es (3- [4,5- dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio) o MTT (SIGMA #M-5655); la solución de MTT disuelta en soluciones salinas (PBS) es de color amarillento y cambia de color cuando las células viables escinden el anillo de tetrazolio formando cristales de formazán púrpuras. Estos cristales deben ser diluidos en soluciones acuosas (isopropanol) (#M-8910) para poder cuantificar su concentración mediante un espectrofotómetro a una longitud de

onda de 570 nanómetros (nm). El aumento o disminución en el número de células resulta en la cantidad de cristales de formazán generados, indicando el grado de citotoxicidad causado por el agente de prueba. En éste protocolo, la viabilidad de las células es probada a través de su actividad metabólica evidenciada por la deshidrogenasa mitocondrial (succinato deshidrogenasa).

Para el primer ensayo se utilizaron dosis 0.01 μ M, 0.1 μ M, 1 μ M, 5 μ M y 10 μ M de (-) –epicatequina. En el segundo ensayo se utilizaron las mismas dosis de (-) –epicatequina + LPS; la concentración del LPS fue la misma utilizada para los tratamientos anteriormente descritos. Ambos experimentos se realizaron en los tiempos de 1, 2 y 4 h. Los resultados del análisis se expresaron en % de células vivas.

Para la realización del ensayo de MTT se siguieron los pasos indicados por el proveedor en el Anexo 12.

6.5 Diseño de análisis estadístico

Variables de estudio

- Cuantitativa continua (Variable dependiente)

Expresión de genes (*IL-6*, *IL-8*, *Sele-E* *eNOS*, *NF-kB p50*, *SOD 2* y *β -Actina*)

Porcentaje (%) de células vivas (Ensayo de citotoxicidad)

- Nominal (Tratamiento) (Variable independiente)

Efecto de la estimulación con diferentes dosis de (-) -epicatequina (0.1, 0.01 y 0.001 μ M) durante 2 h

Efecto de la estimulación con LPS durante 2 y 4 h

Efecto de la estimulación con diferentes dosis de (-) -epicatequina (0.1, 0.01 y 0.001 μ M + LPS) durante 2 y 4 h

Efecto de la estimulación con diferentes dosis de (-) -epicatequina (10, 5, 1, 0.1, 0.01 y 0.001 μ M + LPS) durante 1, 2 y 4 h.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se estimaron las medias y desviaciones estándar de la expresión de los genes de estudio en cada tratamiento con el software SPSS Stata 25. Se realizaron pruebas de ANOVA de 1 vía y la prueba POST HOC LSD para comparar los diferentes tratamientos en cada experimento, con su respectivo blanco no estimulado y con el LPS. Los resultados se reportaron en Fold Changes (Veces de cambio). Para analizar el cambio en la expresión de los genes se utilizó el método de cuantificación relativa. Éste método relaciona la expresión de transcritos de un grupo tratado, con un gen de referencia (β -Actina) a través de la ecuación $2^{-\Delta\Delta CT}$.

$$2^{-\Delta\Delta CT} = (CT_{Target} - C_{Gen\ de\ referencia})_{Tiempo\ x} - (CT_{Target} - C_{Gen\ de\ referencia})_{Tiempo\ 0}$$

RESULTADOS

Recolección y cultivo de las células.

Posterior a la recolección y extracción de las muestras, los cultivos celulares se mantuvieron en condiciones óptimas (37°C y 5% CO₂). Las células HUVEC que lograron proliferar adecuadamente mostraron una morfología típica de éste grupo celular formando pequeños "adoquines" como comúnmente se ha descrito su forma

(Figura 19). Al llegar a una confluencia del 80-90% se realizaron los pases correspondientes utilizando tripsina EDTA 0.05% para desprender las células; todos los tratamientos se realizaron en el cuarto pase.

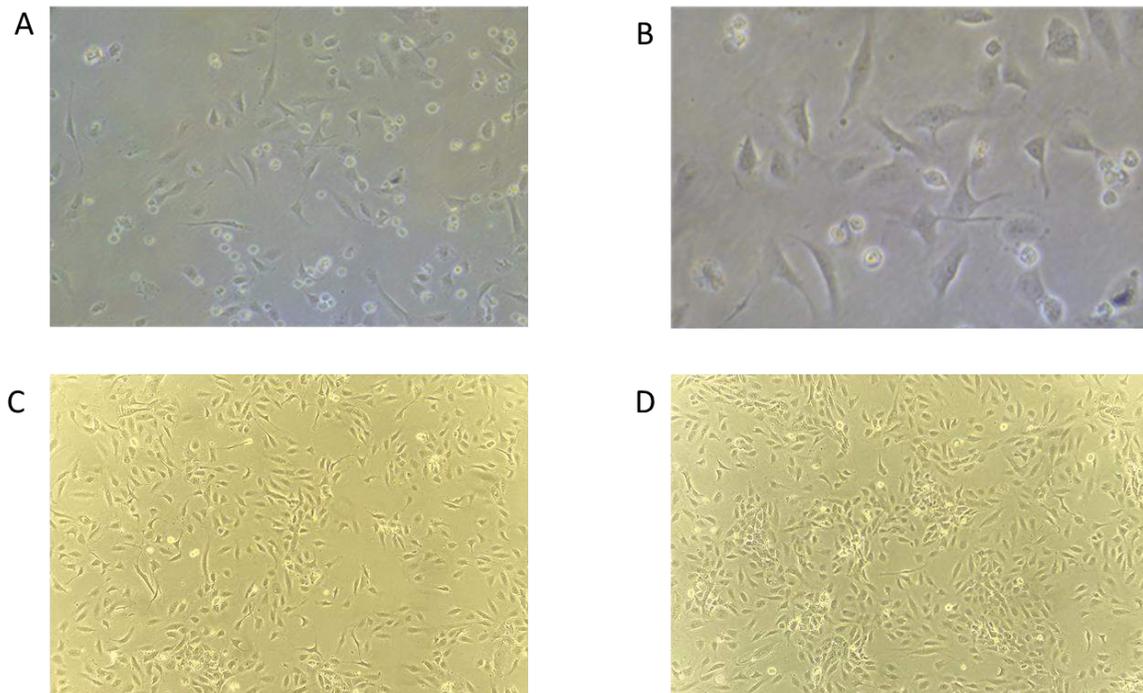


Figura 19. Imagen ilustrativa de HUVECs al microscopio. (A) HUVECs cordón umbilical (CU) 8, cuarto pase, (20X); (B) HUVECs CU 8, cuarto pase, (40X) ambas muestras con confluencia de 60%. (C) HUVECs CU 7 cuarto pase (10X), con confluencia del 60-70%. HUVECs CU 7, confluencia del 90%.

Análisis de pureza mediante citometría de flujo

Se evaluó la pureza de los cultivos celulares mediante pruebas de citometría de flujo. En la Figura 20 se observan los resultados obtenidos con el marcador CD31, en el gráfico (A) se observa el control negativo (sin marcar); en el gráfico (B) se visualizan los resultados de la muestra 1 (células extraídas del CU 1) donde se obtuvo una pureza del 91.3%. En el gráfico (C) (muestra 2, células extraídas del CU 2) se obtuvo una pureza de 89.3% (Figura 20).

Complementando estos resultados se realizó una segunda prueba con células del CU 2 (muestra 2) utilizando el anticuerpo CD62E anti Sele-E, por lo que la muestra tuvo que ser estimulada previamente con LPS durante 4 h para poder activar la Sele-E.

En el gráfico (A) de la Figura 21 se observa en control negativo (sin marcar). En el gráfico (B) se observa la muestra blanco (si estimular con LPS), en el gráfico (C) se observa la muestra 2 estimulada previamente con LPS, donde se obtuvo una pureza de 83.7%

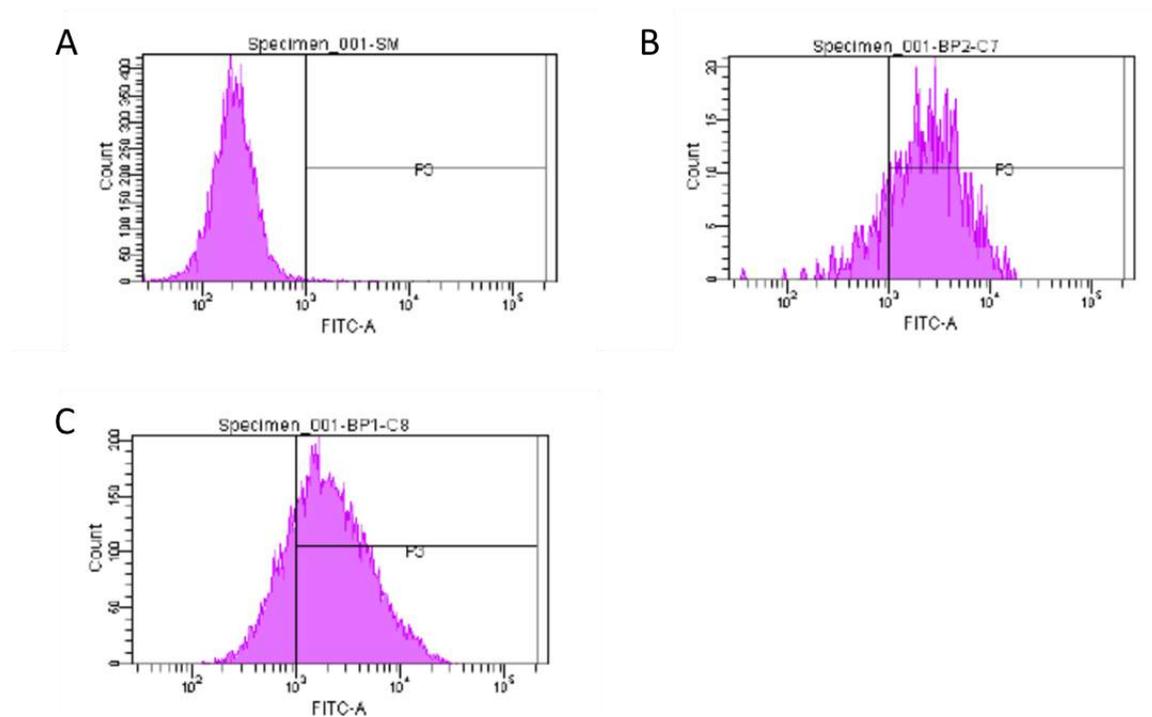


Figura 20. Análisis de citometría de flujo en HUVECs. Anticuerpo CD31. (A) Control negativo. (B) Muestra 1 positiva con una pureza de 91.3%. (C) Muestra 2 positiva con una pureza de 89.3%.

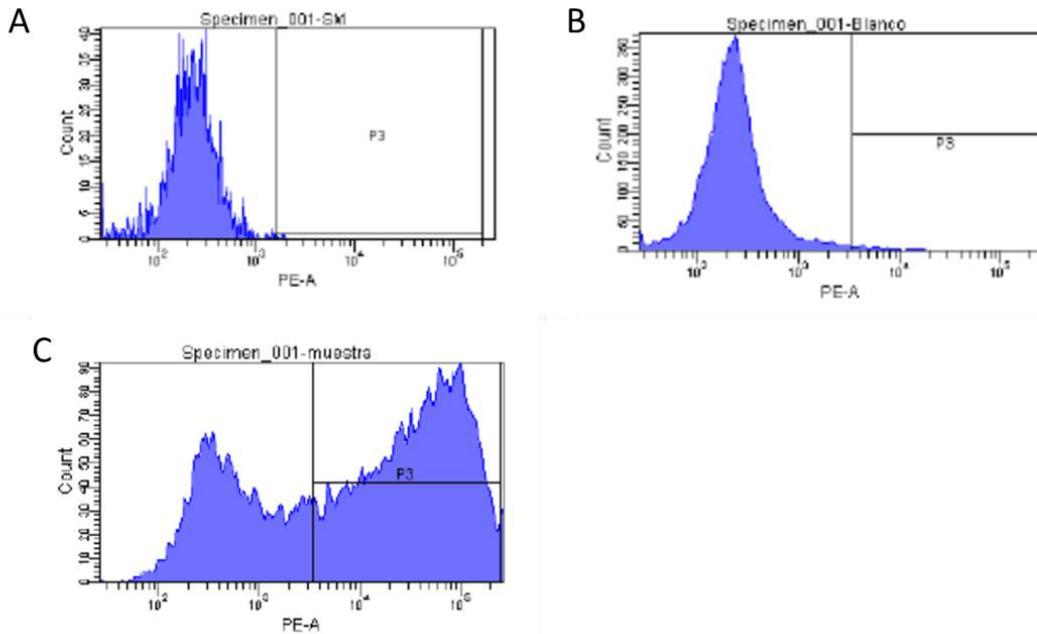


Figura 21. Análisis de citometría de flujo en HUVECs. Anticuerpo CD62E (Sele-E). (A) Control negativo. (B) Blanco, muestra sin estímulo de LPS. (C) Muestra 3 estimulada con LPS 4 h, positiva; con una pureza de 83.7%

Cambios en la expresión de genes

Previo a la realización de los tratamientos, se realizaron pruebas con los transcritos de los genes *GAPDH* y β -*Actina*, siendo ésta el gen constitutivo utilizado para éste estudio ya que β -*Actina* mantuvo su expresión constante sin importar los tratamientos utilizados.

Cambios en la expresión de *IL-6*

En el gráfico A (Figura 22) se observa un aumento en la expresión de *IL-6* tras el estímulo de las HUVECs con LPS a las 2 h, aumentando casi 8 veces con respecto al blanco. Posteriormente, al estimular 1 h con (-) -epicatequina y 1 h con LPS se puede observar una atenuación en la expresión de *IL-6* con el tratamiento de EC 0.001 μ M, aunque no son estadísticamente significativos con respecto al estímulo con LPS únicamente.

En el gráfico B (Figura 22) se observa un aumento en la expresión de *IL-6* en HUVECs posterior al estímulo de 4 h con LPS aumentando 22 veces con respecto al blanco con una $p < 0.05$. En los tratamientos con EC 2 h + LPS 2 h también se observaron cambios en la expresión de *IL-6*. Las dosis 0.01 y 0.1 μM disminuyeron 18 y 13 veces respectivamente la expresión de *IL-6* tras el estímulo con LPS con una $p < 0.05$. Esto podría sugerir que dosis 0.01 y 0.1 μM de EC son suficientes para atenuar el efecto causado por LPS en células HUVECs.

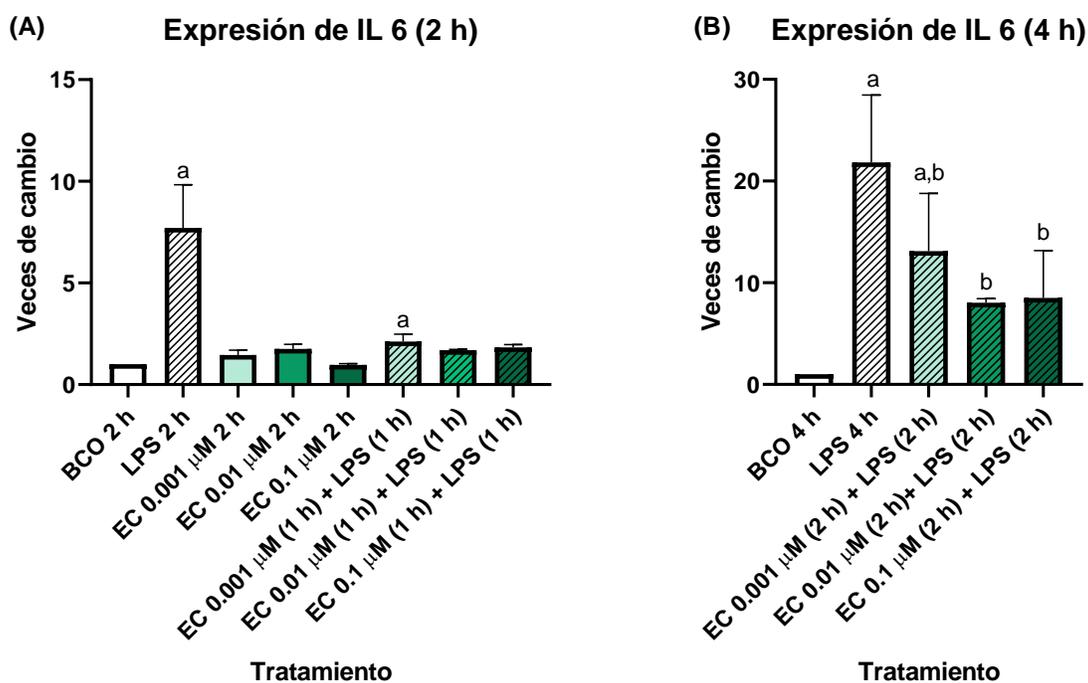


Figura 22. (A) Expresión de *IL-6* en HUVECs al estimular con LPS, EC y distintos tratamientos de EC + LPS durante 2 h. (Los tratamientos de 2 h comprenden el estímulo con EC 1 h + LPS 1 h obteniendo un tiempo total de 2 h). (B) Expresión de *IL-6* en HUVECs al estimular con LPS y distintos tratamientos de EC + LPS durante 4 h. (Los tratamientos de 4 h comprenden el estímulo con EC 2 h + LPS 2 h obteniendo un tiempo total de 4 h. a= $p < 0.05$ comparado contra BCO (con vehículo). b= $p < 0.05$ comparado contra LPS. Prueba de ANOVA de una vía y pruebas comparativas Post-Hoc.

Cambios en la expresión de *IL-8*

En el gráfico A (Figura 23) se observa la expresión de *IL-8* en HUVECs posterior al estímulo con LPS, distintas dosis de EC, y EC + LPS durante 2 h. La expresión de *IL-8* posterior al estímulo con LPS aumentó 94 veces con respecto al blanco de 2 h con una $p < 0.05$. Al estimular con dosis 0.001, 0.01 y 0.1 μM de EC no se observaron cambios significativos en la expresión de este transcrito. Para el tratamiento de EC con las mismas dosis (1 h) y el posterior estímulo con LPS (1 h) se observaron cambios significativos en la expresión de *IL-8* con respecto al estímulo con LPS, lo que podría sugerir que dosis desde 0.001 μM hasta 0.1 μM de EC serían suficientes para atenuar la expresión de *IL-8* generada por estímulos con LPS en un tiempo de 2 h.

Por otro lado, en el gráfico B (Figura 23) se observa la misma tendencia, al comparar con el estímulo de LPS, la expresión de *IL-8* disminuyó con todos los tratamientos de EC, sin embargo, el estímulo con una dosis de 0.1 μM de EC atenuó la expresión de *IL-8* significativamente, disminuyendo hasta 60 veces su expresión con respecto a la expresión observada en el tratamiento con LPS.

Cambios en la expresión de *Sele-E*

En el gráfico A (Figura 24) se observan los cambios en la expresión de *Sele-E* en estímulos con LPS, EC y EC + LPS durante 2 h con respecto al blanco, aunque estos cambios no son estadísticamente significativos. Por otro lado, como es de esperarse, los tratamientos solos con EC no generaron cambios en la expresión de *Sele-E*. En los tratamientos con distintas dosis de EC (1 h) y LPS (1 h) no se observaron cambios significativos en la expresión de *Sele-E* con respecto al blanco; en comparación con el estímulo de LPS sí se observó una disminución en la expresión, sin embargo éstos cambios tampoco fueron estadísticamente significativos.

En el gráfico B (Figura 24) se observan cambios evidentes en la expresión de *Sele-E*. Un estímulo con LPS durante 4 h aumentó la expresión de *Sele-E* en comparación con un blanco similar 1056 veces. Al comparar el efecto de EC en dosis 0.001, 0.01 y 0.1 μM previo al tratamiento con LPS se observó una disminución en la expresión de *Sele-E* de hasta 800 veces con dosis 0.001 y 0.01 μM alcanzando una $p < 0.05$, lo que sugeriría que dosis desde 0.001 y 0.01 μM son suficientes para atenuar expresión de *Sele-E* generada por un estímulo con LPS.

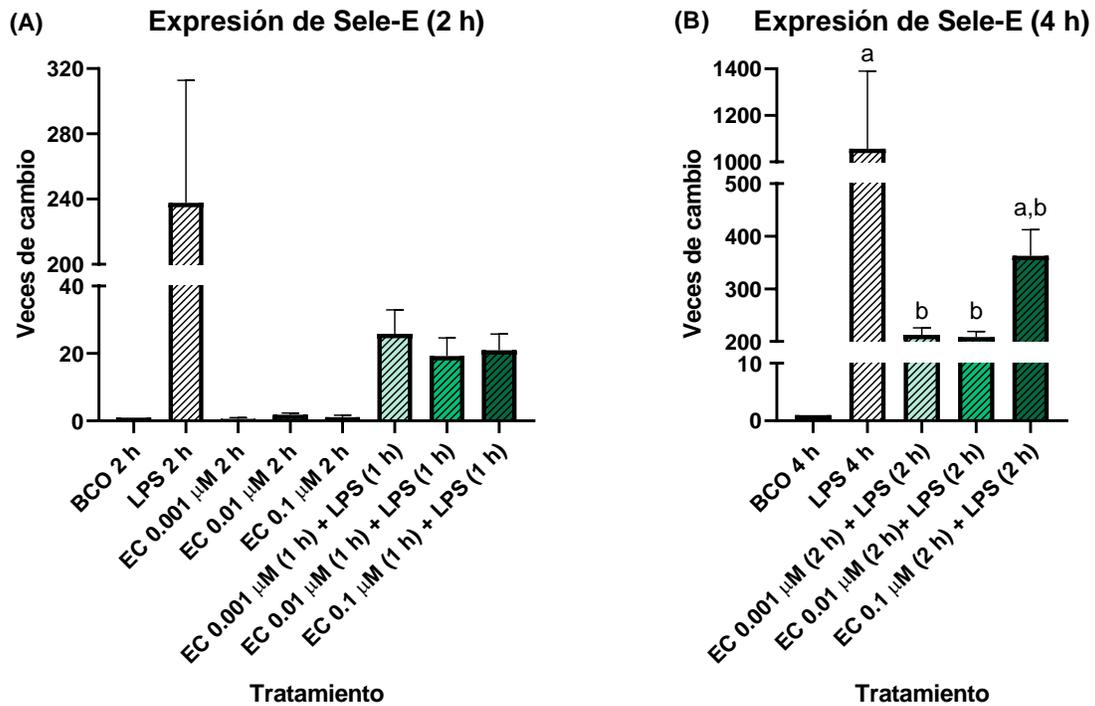


Figura 24. (A) Expresión de *Sele-E* en HUVECs al estimular con LPS, EC y distintos tratamientos de EC + LPS durante 2 h. (Los tratamientos de 2 h comprenden el estímulo con EC 1 h + LPS 1 h obteniendo un tiempo total de 2 h). (B) Expresión de *Sele-E* en HUVECs al estimular con LPS y distintos tratamientos de EC + LPS durante 4 h. (Los tratamientos de 4 h comprenden el estímulo con EC 2 h + LPS 2 h obteniendo un tiempo total de 4 h). a= $p < 0.05$ comparado contra BCO (con vehículo). b= $p < 0.05$ comparado contra LPS. Prueba de ANOVA de una vía y pruebas comparativas Post-Hoc.

Cambios en la expresión de eNOS

En el gráfico A (Figura 25) se observa la expresión de eNOS ante el estímulo con tratamientos de EC, LPS y EC + LPS durante 2 h. Ninguno de los estímulos generó algún cambio significativo en la expresión de eNOS. Si bien se observó un aumento en la expresión de eNOS al estimular con dosis 0.01 μ M de EC, éste no es significativo y probablemente se deba a algún error metodológico al momento de realizar los tratamientos, o a la variación del método de medición.

En el gráfico B (Figura 25) no se observan cambios significativos en la expresión de eNOS ante el estímulo con LPS de 4 h, lo que sugeriría que probablemente se necesite más tiempo de exposición de las HUVECs a estímulos con LPS para generar cambios en la expresión. Por otro lado, se observó una tendencia a aumentar la expresión de eNOS al tratar las HUVECs con distintas dosis de EC previas al estímulo con LPS durante 4 h sólo una dosis 0.1 μ M de EC alcanzó un cambio significativo con una $p \leq 0.05$.

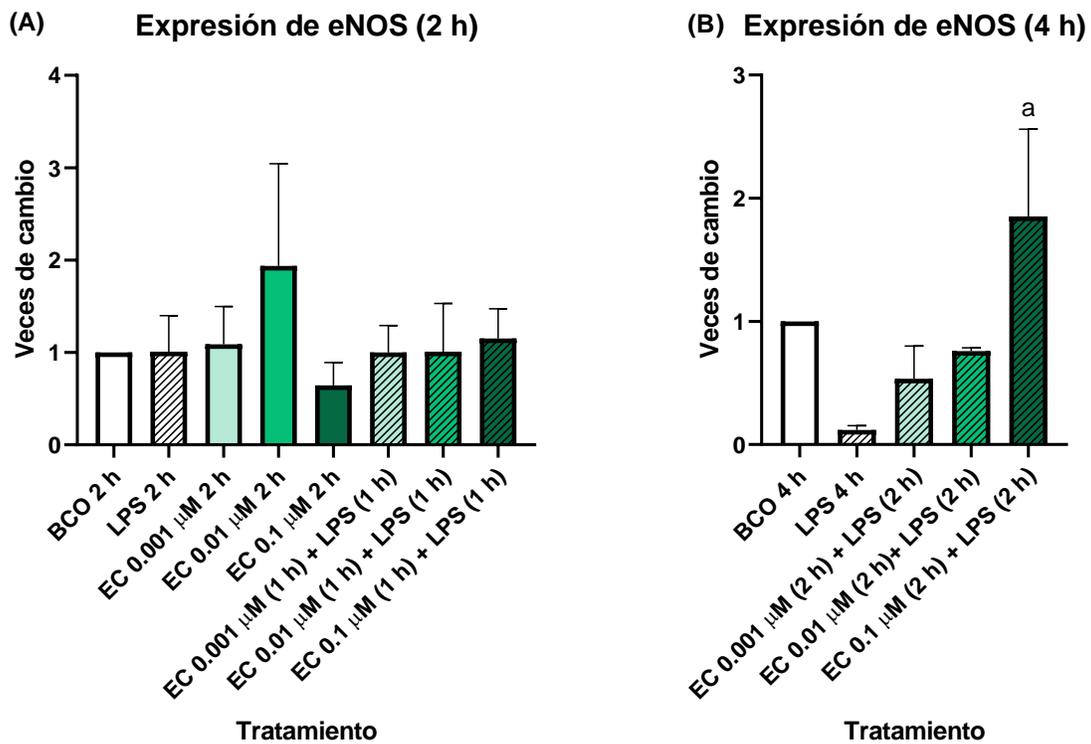


Figura 25. (A) Expresión de eNOS en HUVECs al estimular con LPS, EC y distintos tratamientos de EC + LPS durante 2 h. (Los tratamientos de 2 h comprenden el estímulo con EC 1 h + LPS 1 h obteniendo un tiempo total de 2 h). (B) Expresión de eNOS en HUVECs al estimular con LPS y distintos tratamientos de EC + LPS durante 4 h. (Los tratamientos de 4 h comprenden el estímulo con EC 2 h + LPS 2 h obteniendo un tiempo total de 4 h). a= $p < 0.05$ comparado contra BCO (con vehículo). Prueba de ANOVA de una vía y pruebas comparativas Post-Hoc.

Cambios en la expresión de *NF-kB p50*

En el gráfico A (Figura 26) se observa la expresión de *NF-kB p50* al estimular con LPS, EC en distintas dosis y distintos tratamientos de EC + LPS durante 2 h. Una exposición a LPS durante 2 h fue suficiente para generar un aumento en la expresión de *NF-kB p50* de hasta 4 veces con respecto al blanco sin estimular, aunque no alcanzó una $p < 0.05$. Distintas dosis de EC no parecen haber generado cambios en la expresión de *NF-kB p50* al igual que tratamientos de EC en distintas dosis + LPS durante 2 h.

En el gráfico B (Figura 26) se observan los cambios en la expresión de *NF-kB p50* ante un estímulo con LPS de 4 h y tratamientos de EC + LPS de 4 h. Un estímulo con LPS sugiere aumentar la expresión de *NF-kB p50* al igual que un estímulo de LPS (2 h) pues aumentó 4 veces con respecto al blanco sin estimular, éstos cambios no son estadísticamente significativos. Al realizar tratamientos de EC + LPS durante 4 h tampoco se observaron cambios significativos en la expresión de *NF-kB p50* ante un estímulo con LPS. Por otro lado, una dosis 0.1 μM parece haber aumentado la expresión de *NF-kB p50* de manera significativa con respecto al blanco sin estimular y al estímulo con LPS de 4 h.

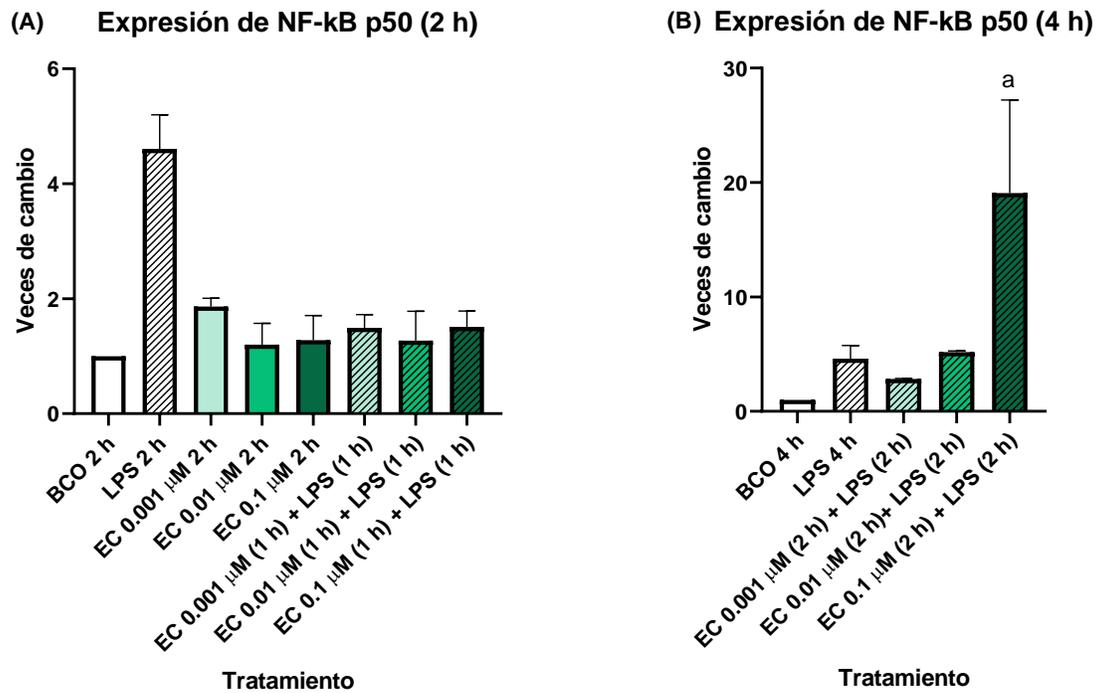


Figura 26. (A) Expresión de *NF-kB p50* en HUVECs al estimular con LPS, EC y distintos tratamientos de EC + LPS durante 2 h. (Los tratamientos de 2 h comprenden el estímulo con EC 1 h + LPS 1 h obteniendo un tiempo total de 2 h). (B) Expresión de *NF-kB p50* en HUVECs al estimular con LPS y distintos tratamientos de EC + LPS durante 4 h. (Los tratamientos de 4 h comprenden el estímulo con EC 2 h + LPS 2 h obteniendo un tiempo total de 4 h). a= $p < 0.05$ comparado contra blanco sin estimular b= $p < 0.05$ comparado contra LPS. Prueba de ANOVA de una vía y pruebas comparativas Post-Hoc.

Cambios en la expresión de *SOD 2*

En el gráfico A (Figura 27) se observan los cambios en la expresión de *SOD 2* ante un estímulo con LPS, EC y tratamientos de EC + LPS durante 2 h. Un estímulo con LPS 2 h generó cambios en la expresión de *SOD 2* de aproximadamente 3 veces con respecto al blanco sin estimular aunque no alcanzó una $p < 0.05$. Dosis distintas de EC no parecen inducir cambios en la expresión de *SOD 2* al igual que los tratamientos de EC + LPS durante 2 h.

En el gráfico B (Figura 27) se observa un aumento en la expresión de *SOD 2* ante un estímulo con LPS durante 4 h; lo que podría sugerir que 2 h no fueron suficientes para inducir cambios en la expresión de este gen. En cuanto a los tratamientos de EC + LPS durante 4 h se observó una tendencia a disminuir la expresión de *SOD 2* en comparación con un estímulo de LPS. Con esto podría sugerirse que dosis desde $0.001 \mu\text{M}$ de EC serían suficientes para atenuar de manera significativa el aumento en la expresión de *SOD 2* generado por un estímulo con LPS.

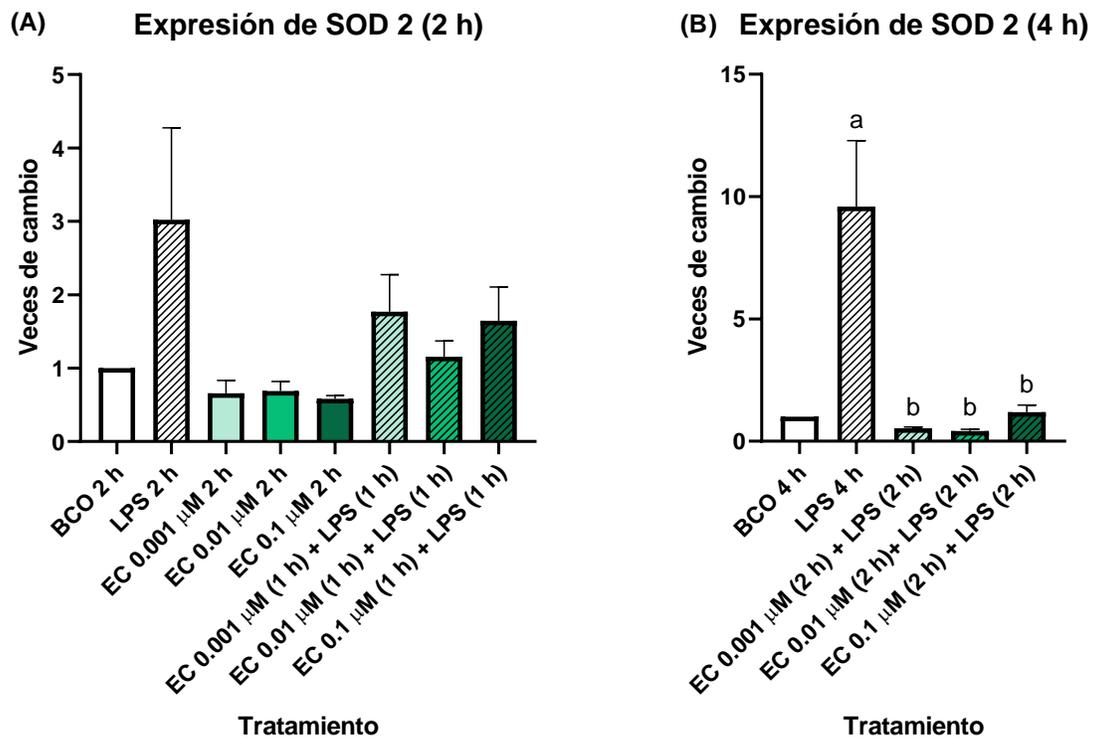


Figura 27. (A) Expresión de SOD 2 en HUVECs al estimular con LPS, EC y distintos tratamientos de EC + LPS durante 2 h. (Los tratamientos de 2 h comprenden el estímulo con EC 1 h + LPS 1 h obteniendo un tiempo total de 2 h). (B) Expresión de SOD 2 en HUVECs al estimular con LPS y distintos tratamientos de EC + LPS durante 4 h. (Los tratamientos de 4 h comprenden el estímulo con EC 2 h + LPS 2 h obteniendo un tiempo total de 4 h). a= $p < 0.05$ comparado contra BCO (con vehículo). b= $p < 0.05$ comparado contra LPS. Prueba de ANOVA de una vía y pruebas comparativas Post-Hoc.

Pruebas de citotoxicidad de EC mediante ensayo de MTT.

Se realizaron pruebas de citotoxicidad de EC en tiempos de 1, y 4 h.

En el tratamiento de 1 h de estímulo se observó que dosis fisiológicas de EC (0.01 – 0.1 μM) no generan ningún efecto citotóxico, pues los porcentajes de células vivas se mantuvieron dentro del 90% - 100% (Tabla 7), una disminución en el porcentaje de células vivas se observó hasta dosis 10 μM .

Por otro lado, en los tratamientos de EC + LPS tampoco se observó un efecto citotóxico en el uso de dosis fisiológicas, ya que el porcentaje de células vivas se mantuvo en rangos de 90% - 100%. A partir de dosis 5 μM se observó una disminución en el porcentaje de células vivas.

Tabla 7. Prueba de MTT 1 h en células HUVECs. Viabilidad de las células representada en % de células vivas.

TX	EC + LPS	EC
	% Células Vivas	% Células vivas
CTRL +	88.44	82.15
CTRL -	100.00	100
0.01 μM	104.29	119.93
0.1 μM	96.05	160.08
1 μM	106.99	115.47
5 μM	70.48	96.63
10 μM	73.88	80.21

En los tratamientos realizados durante 4 h no se observaron alteraciones en la viabilidad de las células al utilizar dosis fisiológicas de EC, el porcentaje de células vivas se mantuvo por arriba del 90%. Una ligera disminución en el porcentaje de células vivas se observó a partir de dosis 10 μM (Tabla 8).

En los tratamientos de EC + LPS se observa el mismo fenómeno, no parece existir un efecto citotóxico, el porcentaje de células vivas se mantuvo por arriba del 90%, y al igual que en el tratamiento de sólo EC, se registró una ligera disminución en el porcentaje de células vivas a partir de dosis 10 μM .

Tabla 8. Prueba de MTT 4 h en células HUVECs. Para el ensayo de EC + LPS se realizaron los estímulos 2 h con EC y 2 h con LPS. Para el ensayo de EC se realizó un solo estímulo de 4 h. La viabilidad de las células está representada en % de células vivas.

Tx	EC + LPS	EC
	% Células vivas	% Células Vivas
CTRL+	95.76	95.76
CTRL -	100	100
0.01 μM	102.00	104.43
0.1 μM	106.39	104.90
1 μM	101.26	103.00
5 μM	91.74	90.21
10 μM	89.91	89.15

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

A través de las pruebas de citometría de flujo se determinó que la pureza de los cultivos celulares utilizados en el estudio era la adecuada. Esto permitió asegurar que el cultivo primario utilizado como modelo de estudio fue el correcto y que los efectos en la expresión de genes observados (inducidos por los tratamientos con EC y LPS) son propios de las células endoteliales.

Algunos autores como Hu (83) y Zerón (84) han realizado evaluaciones de pureza similares en cultivos primarios de HUVECs. Este análisis, resultan de gran importancia para asegurar que se está trabajando con el modelo deseado, pues debido al proceso de extracción de las HUVECs es probable el arrastre de otras células como fibroblastos y eritrocitos; lo que podría resultar en un sesgo dentro del estudio si se evaluara la expresión de genes de éstos grupos celulares, y no del modelo esperado.

Cambios en la expresión inducidos por el estímulo con LPS.

Se observó una tendencia clara en la activación de *IL-6* e *IL-8*, así como de *Sele-E* como parte de una respuesta inflamatoria inducida por LPS en HUVECs; es de esperarse que éstas moléculas se activen ante éste estímulo inflamatorio tratándose de citoquinas pro inflamatorias (*IL-6*), quimiocinas (*IL-8*) y factores de adhesión (*Sele-E*) característicos de una respuesta inflamatoria aguda (50,55,63), y que se ha podido corroborar encontrando su pico de acción a las 4 h. Este modelo ha sido utilizado previamente por otros autores como Noratto (85) en 2011 y Zhang (86) en 2019 para inducir una respuesta inflamatoria en HUVECs donde también se

ha observado la expresión de TLR4, PECAM-1 e ICAM-1 inducida por LPS. Por otro lado *NF-kB p50* también es activada por el LPS, pero en éste estudio sólo se observó un aumento discreto en su expresión. Este efecto podría atribuirse al hecho de que la proteína ya se encuentra formada, por lo que la expresión del mRNA podría hacerse más evidente tiempo después, tal como se observa en los ensayos de Noratto (85) cuyos tiempos de estimulación con LPS de hasta 24 h lograron inducir una expresión evidente de *NF-kB p65* en HUVECs.

Se evaluó también el cambio en la expresión de *SOD 2* y *eNOS* inducido por LPS; si bien éstas enzimas participan en el proceso inflamatorio, no lo hacen de manera conjunta en la vía que involucra las *IL-6* e *IL-8*, así como la *Sele-E*, pues *SOD 2* y *eNOS* actúan como agentes antioxidantes (11,68), lo que explicaría la ausencia en los cambios de expresión inducidos por LPS.

La EC es capaz de atenuar la expresión de IL-6, IL-8, y Sele-E inducida por LPS.

Si bien en la literatura se reportan los efectos antioxidantes de algunos flavanoles, flavonoles, antocianinas y otros polifenoles, su rol como agentes moduladores en el proceso inflamatorio de la disfunción endotelial también llama la atención, por lo que se les ha considerado agentes protectores de la salud cardiovascular. En éste estudio se encontró que dosis fisiológicamente alcanzables de EC fueron capaces de atenuar la expresión de *IL-6*, *IL-8*, y *Sele-E* inducida por LPS en HUVECs desde las 2 h y con dosis 0.001 μM de EC, sin embargo los cambios fueron aún más evidentes con dosis medias (0.01 μM) en tiempos de 4 h. Este hallazgo se asimila con resultados presentados por Noratto (85) donde se demostró que polifenoles de uva muscadine y acaí fueron capaces de “proteger” a las células HUVECs ante un

estrés inflamatorio inducido por LPS y glucosa, atenuando la expresión de *IL-6*, *IL-8* y *NF-κB p65*, incluso con tiempos de estímulo con tratamientos con polifenoles de 30 min.

Comparando éste estudio con la evidencia mostrada por Zhang (86) también se encontró similitud ante el efecto antiinflamatorio generado por algunos polifenoles como el resveratrol, siendo capaz de atenuar la expresión de TLR4, MMP3, y MMP9 HUVECs tratadas con LPS y ox-LDL con dosis de polifenoles desde 1 μM.

No obstante, como se ha revisado en la literatura, pocos (o nulos) son los estudios que han empleado dosis fisiológicas de polifenoles para evaluar su potencial efecto antiinflamatorio; éste aspecto resulta de gran importancia para el presente estudio demostrando que incluso dosis fisiológicas podrían inducir efectos antiinflamatorios y que impactan directamente la salud cardiovascular. Sin embargo, algunos estudios en humanos han sido realizados en torno a la EC y podrían apoyar el hecho de que el consumo de éste polifenol vía oral muestra evidencia similar a estudios *in vitro* (como los realizados en HUVECs); Barrera-Reyes (87) en un ensayo clínico aleatorizado, demostró que el consumo de un suplemento de cocoa rico en polifenoles fue capaz de modificar la expresión de algunos genes incluyendo citoquinas proinflamatorias (como *IL-8*) y otras moléculas involucradas en el balance redox en células mononucleares periféricas, sugiriendo efectos antiinflamatorios inducidos por el consumo de la cocoa a las 2 h, hallazgo que se compara con los resultados del presente estudio, donde también se observaron dichos efectos antiinflamatorios a partir de las 2 h (que incluso fue más evidente a las 4 h).

La respuesta de *SOD 2* también fue evidente ante los tratamientos con EC y LPS comportándose de manera similar que *IL-6*, *IL-8*, y *Sele-E*, actuando como agente antioxidante. Pocos estudios se han realizado en torno a los cambios en la expresión de *SOD 2* y su relación con polifenoles; evidencia similar fue presentada por Zhu (88) en 2016, donde demostró que dosis 1 μM de salidroside (compuesto antioxidante de *Rhodiola rosea*) logró modificar la expresión de *SOD 2* ante un estímulo pro oxidante generado por H_2O_2 en HUVECs, de la misma manera que lo hizo la EC. Por otro lado, Curti (89) en 2019, utilizó un extracto de propóleo rico en polifenoles (galangina y crisina) en un modelo murino, donde la ingesta de dicho extracto fue de hasta 500 mg/kg; ésta dosis logró aumentar la producción de *SOD 1* y otras enzimas antioxidantes en 30 días, reforzando así la evidencia del poder antioxidante de algunos compuestos fenólicos como la EC.

Por otro lado, en éste estudio se encontraron cambios discretos en la expresión de *NF-kB p50* que no fueron significativos tras el estímulo con EC y LPS. Sin embargo algunos autores como Xia (90) han evidenciado el efecto antiinflamatorio de polifenoles y catequinas a través de mecanismos dependientes de *NF-kB*; inhibiendo directamente la activación de *NF-kB p50* y que resultaría en la disminución de moléculas de adhesión, quimiocinas y algunas interleucinas; ésta evidencia se compara con la disminución de *IL-6*, *IL-8* y *Sele-E* reportada en el presente estudio.

Se sugiere que el no encontrar cambios significativos en la expresión de mRNA de *NF-kB p50* se debe a que el complejo proteico ya se encuentra conformado; por lo que la expresión de mRNA podría ser evidente en un tiempo mayor de tratamiento.

Los cambios en la expresión de *IL-6*, *IL-8* y *Sele-E* demuestran que efectivamente existe una activación de *NF-kB*, que podría explicarse por la activación río abajo, producto de la translocación del heterodímero p50/p65 al núcleo. Éstos hallazgos podrían compararse con el estudio de Noratto (85) cuyos tratamientos fueron de 24 h con LPS y las dosis de polifenoles utilizadas fueron de entre 5 – 40 mg de equivalentes de ácido gálico/L, tiempo y dosis suficientes para hacer evidente cambios en la expresión de mRNA *NF-kB p65*.

Un hallazgo no esperado dentro del experimento fue el aumento en la expresión de *NF-kB p50* en el tratamiento de 4 h al estimular con EC 0.1 μ M, sugiriendo que esta dosis es capaz de promover la expresión de *NF-kB p50*. Este efecto también fue observado en el reporte de investigación de González M en 2017 (39) donde se utilizó el mismo modelo celular y las mismas dosis tanto de EC como de LPS, encontrando que una dosis 0.1 μ M fue capaz de aumentar la expresión de *NF-kB p50* con respecto al blanco. Resulta limitante poder hacer una comparación específica de éste efecto con otros hallazgos en la literatura, pues los estudios actuales en torno a la EC y su efecto sobre la expresión de genes de respuesta inflamatoria (específicamente *NF-kB p50*) tienen mucha variación entre sí (dosis, tiempos, modelos) lo que representa una limitante para poder comparar éste fenómeno.

Por otro lado, existe evidencia de que los polifenoles inducen un aumento en la expresión de eNOS ante un proceso inflamatorio en el endotelio. En éste estudio no se observaron cambios relevantes en su expresión. Wallerath (91) reportó en 2002 un aumento en la expresión de eNOS promovido por tratamientos con dosis desde

10 μM de resveratrol; a pesar de que se trata de un polifenol distinto, esto podría sugerir que las dosis utilizadas en el presente estudio, no son suficientes para promover cambios en la expresión de eNOS, o bien, que se necesita más tiempo para hacer evidentes los cambios en su expresión.

Ensayo de citotoxicidad MTT

Los datos de los tratamientos de 1 y 4 h son consistentes entre sí, sugiriendo que dosis fisiológicas de EC no generan efectos citotóxicos en las células HUVEC, tal como otros autores lo han evidenciado con dosis similares como Posadino (92), y dosis hasta 30 μM de polifenoles similares como la epigallocatequina galato; Liu (93).

8. CONCLUSIONES

Existe evidencia del efecto protector en la salud cardiovascular otorgado por algunos polifenoles como la EC; éste estudio complementa la evidencia demostrando su potencial efecto como agente antioxidante al regular la expresión de *SOD 2*, y como agente antiinflamatorio, regulando la expresión de citoquinas proinflamatorias como *IL-6*, quimiocinas como *IL-8* y factores de adhesión como *Sele-E*, todas mediadas por la activación del complejo NF- κ B.

El uso de dosis fisiológicas de EC es un aspecto relevante dentro del estudio, pues sugiere que podrían ser suficientes para atenuar la expresión de dichos genes de respuesta inflamatoria inducida en el endotelio. Al obtenerse a través de la dieta tendrían un impacto positivo al evitar el desarrollo de la disfunción endotelial, factor inicial en el desarrollo de aterosclerosis y ECV. Se necesitan más estudios en

humanos para poder respaldar éstos beneficios en la salud cardiovascular y determinar su importancia clínica.

10. PERSPECTIVAS Y/O RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar ensayos de citotoxicidad (MTT) con duración de 6 h para evaluar el efecto de dosis fisiológicas de EC sobre HUVECs.

Una recomendación es realizar los experimentos de manera inversa, es decir, estimular previamente con LPS y luego realizar los estímulos de EC para evaluar de ésta manera el posible efecto terapéutico de dosis fisiológicas de EC y su influencia en la reversión en la expresión de genes de respuesta inflamatoria; esto respondería a otra hipótesis.

11. REFERENCIAS

1. UN General Assembly. Political Declaration of the High-level Meeting of the General Assembly on the Prevention and Control of Non-communicable Diseases. A/RES/66/2. UN. 2012.
2. Yeates K, Lohfeld L, Sleeth J, Morales F, Rajkotia Y, Ogedegbe O. A Global Perspective on Cardiovascular Disease in Vulnerable Populations. *Canadian Journal of Cardiology*. 2015.
3. INEGI Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Características De Las Defunciones Registradas En México Durante 2017. *Comun Prensa Núm 525/18*. 2018;
4. Soto-Estrada G, Moreno-Altamirano L, Pahua Díaz D. Panorama epidemiológico de México, principales causas de morbilidad y mortalidad. *Rev la Fac Med*. 2016;
5. Kuri-Morales PA. La transición en salud y su impacto en la demanda de servicios. *Gac Med Mex*. 2011;
6. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Características de las defunciones registradas en México durante 2017. *Estadísticas de Mortalidad*. 2018.
7. World Heart Federation. Factsheet: Enfermedades Cardiovasculares en México. *World Hear Fed*. 2017;2010(Gbd 2010):4–5.
8. Organización Mundial de la Salud. Enfermedades cardiovasculares: ¿Qué

son las enfermedades cardiovasculares? Who. 2016;

9. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000.
10. Ardies CM, Roberts CK. Atherosclerosis. In: *Diet, Exercise, and Chronic Disease: The Biological Basis of Prevention*. 2014.
11. Rafieian-Kopaei M, Setorki M, Douidi M, Baradaran A, Nasri H. Atherosclerosis: Process, indicators, risk factors and new hopes. *Int J Prev Med*. 2014;5(8):927–46.
12. Visioli F, Poli A. Dietary advice to cardiovascular patients. A brief update for physicians. *Monaldi Archives for Chest Disease*. 2019.
13. Li AN, Li S, Zhang YJ, Xu XR, Chen YM, Li H Bin. Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients*. 2014.
14. Cipolletti M, Fernandez VS, Montalesi E, Marino M, Fiocchetti M. Beyond the antioxidant activity of dietary polyphenols in cancer: The modulation of estrogen receptors (ERs) signaling. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018.
15. Singh A, Holvoet S, Mercenier A. Dietary polyphenols in the prevention and treatment of allergic diseases. *Clin Exp Allergy*. 2011;41(10):1346–59.
16. Dwivedi S, Malik C, Chhokar V. Molecular structure, biological functions, and metabolic regulation of flavonoids. In: *Plant Biotechnology: Recent Advancements and Developments*. 2017.
17. Ohishi T, Goto S, Monira P, Isemura M, Nakamura Y. Anti-inflammatory

- Action of Green Tea. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem*. 2016;
18. Martin MA, Goya L, Ramos S. Potential for preventive effects of cocoa and cocoa polyphenols in cancer. *Food and Chemical Toxicology*. 2013.
 19. Cao J, Han J, Xiao H, Qiao J, Han M. Effect of tea polyphenol compounds on anticancer drugs in terms of anti-tumor activity, toxicology, and pharmacokinetics. *Nutrients*. 2016.
 20. Quiñones M, Miguel M, Aleixandre A. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr Hosp organo Of la Soc Espa??ola Nutr Parenter y Enter*. 2012;
 21. Rothwell JA, Perez-Jimenez J, Neveu V, Medina-Remón A, M'Hiri N, García-Lobato P, et al. Phenol-Explorer 3.0: A major update of the Phenol-Explorer database to incorporate data on the effects of food processing on polyphenol content. *Database*. 2013;
 22. Argout X, Salse J, Aury JM, Guiltinan MJ, Droc G, Gouzy J, et al. The genome of *Theobroma cacao*. *Nat Genet*. 2011;
 23. Codini M, Díaz Vélez F, Ghirardi M, Villavicencio I. Obtención y utilización de la manteca de cacao. *Inven Rev Investig académica*. 2004;(12):143–8.
 24. Powis TG, Hurst WJ, Del M, Rodríguez C, Ponciano OC, Blake M, et al. Mexican The Origins of Cacao Use in Mesoamerica. *Source Mex*. 2008;
 25. Powis TG, Cyphers A, Gaikwad NW, Grivetti L, Cheong K. Cacao use and the San Lorenzo Olmec. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(21):8595–600.

26. Crown PL, Hurst WJ. Evidence of cacao use in the Prehispanic American Southwest. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(7):2110–3.
27. Waizel S, Waizel J, Magaña JA, Campos P, San Esteban JE. Cacao y chocolate : seducción y terapéutica. *An médicos*. 2012;
28. Magrone T, Russo MA, Jirillo E. Cocoa and dark chocolate polyphenols: From biology to clinical applications. *Frontiers in Immunology*. 2017.
29. Council of Scientific & Industrial Research (CSIR). In: *The Grants Register 2019*. 2019.
30. Rimbach G, Melchin M, Moehring J, Wagner AE. Polyphenols from cocoa and vascular health - A critical review. *Int J Mol Sci*. 2009;10(10):4290–309.
31. Bohn T. Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. *Nutr Rev*. 2014;
32. Schramm DD, Wang JF, Holt RR, Ensunsa JL, Gonsalves JL, Lazarus SA, et al. Chocolate procyanidins decrease the leukotriene-prostacyclin ratio in humans and human aortic endothelial cells. *Am J Clin Nutr*. 2001;
33. Holt RR, Lazarus SA, Cameron Sullards M, Zhu QY, Schramm DD, Hammerstone JF, et al. Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4 β -8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa. *Am J Clin Nutr*. 2002;
34. Bernatova I. Biological activities of (-)-epicatechin and (-)-epicatechin-containing foods: Focus on cardiovascular and neuropsychological health. *Biotechnol Adv [Internet]*. 2018;36(3):666–81. Available from:

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.01.009>

35. Rein D, Lotito S, Holt RR, Keen CL, Schmitz HH, Fraga CG. Epicatechin in Human Plasma: In Vivo Determination and Effect of Chocolate Consumption on Plasma Oxidation Status. *J Nutr.* 2000;
36. Ottaviani JI, Momma TY, Kuhnle GK, Keen CL, Schroeter H. Structurally related (-)-epicatechin metabolites in humans: Assessment using de novo chemically synthesized authentic standards. *Free Radic Biol Med.* 2012;
37. Actis-Goretta L, Lévèques A, Giuffrida F, Romanov-Michailidis F, Viton F, Barron D, et al. Elucidation of (-)-epicatechin metabolites after ingestion of chocolate by healthy humans. *Free Radic Biol Med.* 2012;
38. Ponce de León SS, Tejero Barrera ME. Efecto de la estimulación con (-)-Epicatequina aislada sobre la expresión de genes involucrados en vías antioxidantes e inflamatorias en células endoteliales humanas. Ciudad de México; 2008.
39. González Soto M, Tejero Barrera ME. Efecto de la epicatequina de la cocoa sobre la respuesta inflamatoria inducida por lipopolisacárido (LPS) en células endoteliales aisladas de cordón umbilical humano (HUVEC). Ciudad de México; 2017.
40. Laurent C, Besançon P, Caporiccio B. Flavonoids from a grape seed extract interact with digestive secretions and intestinal cells as assessed in an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. *Food Chem.* 2007;
41. Borges G, Ottaviani JI, van der Hooft JJJ, Schroeter H, Crozier A.

Absorption, metabolism, distribution and excretion of (-)-epicatechin: A review of recent findings. *Mol Aspects Med* [Internet]. 2018;61:18–30. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.11.002>

42. Chow HHS, Hakim IA. Pharmacokinetic and chemoprevention studies on tea in humans. *Pharmacol Res*. 2011;
43. Cai ZY, Li XM, Liang JP, Xiang LP, Wang KR, Shi YL, et al. Bioavailability of tea catechins and its improvement. *Molecules*. 2018;23(9):10–3.
44. Bernatova I. Endothelial dysfunction in experimental models of arterial hypertension: Cause or consequence? *BioMed Research International*. 2014.
45. Hadi HAR, Carr CS, Al Suwaidi J. t5. *Vasc Health Risk Manag*. 2005;1(3):183–98.
46. Endemann DH, Schiffrin EL. Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(8):1983–92.
47. Rani V, Deep G, Singh RK, Palle K, Yadav UCS. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life Sciences*. 2016.
48. The umbilical cord: What it is and how it works | BabyCenter [Internet]. [cited 2021 Jan 11]. Available from: https://www.babycenter.com/pregnancy/your-baby/fetal-development-the-umbilical-cord_40007754
49. Baudin B, Bruneel A, Bosselut N, Vaubourdolle M. A protocol for isolation

- and culture of human umbilical vein endothelial cells. *Nat Protoc.* 2007;2(3):481–5.
50. Hunter CA, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol* [Internet]. 2015;16(5):448–57. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ni.3153>
 51. Filella A, Molina R, Ballesta A. Estructura y función de las citocinas | *Medicina Integral. Med Integr* [Internet]. 2002;39(2):63–71. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-estructura-funcion-citocinas-13026682>
 52. Marin V, Montero-Julian FA, Grès S, Boulay V, Bongrand P, Farnarier C, et al. The IL-6-Soluble IL-6R α Autocrine Loop of Endothelial Activation as an Intermediate Between Acute and Chronic Inflammation: an Experimental Model Involving Thrombin. *J Immunol.* 2001;167(6):3435–42.
 53. Hou T, Tieu B, Ray S, Recinos III A, Cui R, Tilton R, et al. Roles of IL-6-gp130 Signaling in Vascular Inflammation. *Curr Cardiol Rev.* 2008;4(3):179–92.
 54. Wassmann S, Stumpf M, Strehlow K, Schmid A, Schieffer B, Böhm M, et al. Interleukin-6 Induces Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction by Overexpression of the Angiotensin II Type 1 Receptor. *Circ Res.* 2004;
 55. Baggiolini M, Clark-Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett.* 1992;307(1):97–101.
 56. Noebels JL. The Biology of Epilepsy Genes. *Annu Rev Neurosci.*

- 2003;26(1):599–625.
57. Russo RC, Garcia CC, Teixeira MM, Amaral FA. The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. *Expert Rev Clin Immunol.* 2014;10(5):593–619.
 58. Breland UM, Halvorsen B, Hol J, Øie E, Paulsson-Berne G, Yndestad A, et al. A potential role of the CXC chemokine GRO α in atherosclerosis and plaque destabilization: Downregulatory effects of statins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(5):1005–11.
 59. Qin Y, Fan F, Zhao Y, Cui Y, Wei X, Kohama K, et al. Recombinant human CXCL8(3-72)K11R/G31P regulates smooth muscle cell proliferation and migration through blockage of interleukin-8 receptor. *IUBMB Life.* 2013;65(1):67–75.
 60. Database G. GeneCards - Human Genes | Gene Database | Gene Search. Genecards.org. 2017.
 61. Wilcox JN, Subramanian RR, Sundell CL, Ross Tracey W, Pollock JS, Harrison DG, et al. Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;
 62. Kawashima S, Yokoyama M. Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis. Vol. 24, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2004. p. 998–1005.
 63. Srivastava K, Chandra S, Narang R, Bhatia J, Saluja D. E-selectin gene in essential hypertension: a case-control study. *Eur J Clin Invest.* 2018;48(1):1–

- 8.
64. Auvinen K, Jalkanen S, Salmi M. Expression and function of endothelial selectins during human development. *Immunology*. 2014;143(3):406–15.
65. Tsoref O, Tyomkin D, Amit U, Landa N, Cohen-Rosenboim O, Kain D, et al. E-selectin-targeted copolymer reduces atherosclerotic lesions, adverse cardiac remodeling, and dysfunction. *J Control Release* [Internet]. 2018;288(August):136–47. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.08.029>
66. Gholizadeh S, Visweswaran GRR, Storm G, Hennink WE, Kamps JAAM, Kok RJ. E-selectin targeted immunoliposomes for rapamycin delivery to activated endothelial cells. *Int J Pharm*. 2018;
67. Del Bo C, Marino M, Riso P, Møller P, Porrini M. Anthocyanins and metabolites resolve TNF- α -mediated production of E-selectin and adhesion of monocytes to endothelial cells. *Chem Biol Interact* [Internet]. 2019;300(January):49–55. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.01.002>
68. Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: Role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxidants and Redox Signaling*. 2011.
69. Souiden Y, Mallouli H, Meskhi S, Chaabouni Y, Rebai A, Chéour F, et al. MnSOD and GPx1 polymorphism relationship with coronary heart disease risk and severity. *Biol Res*. 2016;49(1):1–12.
70. Pamukcu B, Lip GYH, Shantsila E. The nuclear factor - Kappa B pathway in

atherosclerosis: A potential therapeutic target for atherothrombotic vascular disease. Vol. 128, *Thrombosis Research*. 2011. p. 117–23.

71. Echeverri R. NP, Mockus S. I. Nuclear factor κ B (NF- κ B): Signalosoma and its importance in cancer and inflammatory diseases. *Rev Fac Med*. 2008;56(2):133–46.
72. De Winther MPJ, Kanters E, Kraal G, Hofker MH. Nuclear factor κ B signaling in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(5):904–14.
73. Heusinger E, Kirchhoff F. Primate lentiviruses modulate NF-HIV, SIV, NF- κ B, Nef, Vpu, Tat, LTRB activity by multiple mechanisms to fine-tune viral and cellular gene expression. *Front Microbiol*. 2017;8(FEB):1–12.
74. Brasier AR. The nuclear factor- κ B-interleukin-6 signalling pathway mediating vascular inflammation. *Cardiovasc Res*. 2010;86(2):211–8.
75. Farhana A, Khan YS. Biochemistry, Lipopolysaccharide. *StatPearls*. 2020.
76. Méndez Fandiño YR, Barrera C. MC. Fisiopatología de la sepsis por bacterias gram negativas: bases moleculares. *Rev Cuarzo*. 2015;
77. Steimle A, Autenrieth IB, Frick JS. Structure and function: Lipid A modifications in commensals and pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*. 2016.
78. Xiao Q, Zhu X, Yang S, Wang J, Yin R, Song J, et al. LPS induces CXCL16 expression in HUVECs through the miR-146a-mediated TLR4 pathway. *Int Immunopharmacol [Internet]*. 2019;69(59):143–9. Available from:

<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.01.011>

79. Noratto GD, Angel-Morales G, Talcott ST, Mertens-Talcott SU. Polyphenolics from Açai (*Euterpe o11*. Noratto GD, Angel-Morales G, Talcott ST, Mertens-Talcott SU. Polyphenolics from Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) and red muscadine grape (*Vitis rotundifolia*) protect human umbilical vascular endothelial cells (HUVEC) fro. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011.
80. Liu CW, Sung HC, Lin SR, Wu CW, Lee CW, Lee IT, et al. Resveratrol attenuates ICAM-1 expression and monocyte adhesiveness to TNF- α -treated endothelial cells: Evidence for an anti-inflammatory cascade mediated by the MIR-221/222/AMPK/p38/NF-7kappa;B pathway. *Sci Rep*. 2017;7(February):1–14.
81. González-Garrido Chem JA, Olivares-Corichi IM, Tovar-Rodriguez JM, Hernández-Santana NA, Méndez-Bolaina E, Ceballos-Reyes GM, et al. Influence of the at 2 receptor on the L-arginine-nitric oxide pathway and effects of (-)-epicatechin on HUVECs from women with preeclampsia. *J Hum Hypertens*. 2013;27(6):355–61.
82. Milenkovic D, Berghe W Vanden, Morand C, Claude S, van de Sandt A, Gorressen S, et al. A systems biology network analysis of nutri(epi)genomic changes in endothelial cells exposed to epicatechin metabolites. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–17.
83. Hu C, Huang S, Wu F, Ding H. MiR-98 inhibits cell proliferation and induces

- cell apoptosis by targeting MAPK6 in HUVECs. *Exp Ther Med*. 2018;15(3):2755–60.
84. Zerón HM, Páez A, Zapata E, Massó F, Montañó LF. HUVECs from newborns with a strong family history of diabetes show increased apoptosis by flow cytometry with annexin v. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev*. 2010;
85. Noratto GD, Angel-Morales G, Talcott ST, Mertens-Talcott SU. Polyphenolics from Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) and red muscadine grape (*Vitis rotundifolia*) protect human umbilical vascular endothelial cells (HUVEC) from glucose- and lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation and target microRNA-126. *J Agric Food Chem*. 2011;59(14):7999–8012.
86. Zhang M, Xue Y, Chen H, Meng L, Chen B, Gong H, et al. Resveratrol inhibits MMP3 and MMP9 expression and secretion by suppressing TLR4/NF- κ B/STAT3 activation in Ox-LDL-treated HUVECs. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019.
87. Barrera-Reyes PK, Hernández-Ramírez N, Cortés J, Poquet L, Redeuil K, Rangel-Escareño C, et al. Gene expression changes by high-polyphenols cocoa powder intake: a randomized crossover clinical study. *Eur J Nutr* [Internet]. 2019;58(5):1887–98. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00394-018-1736-8>
88. Zhu Y, Zhang YJ, Liu WW, Shi AW, Gu N. Salidroside suppresses HUVECs cell injury induced by oxidative stress through activating the Nrf2 signaling pathway. *Molecules*. 2016;21(8).

89. Curti V, Zaccaria V, Sokeng AJT, Dacrema M, Masiello I, Mascaro A, et al. Bioavailability and in vivo antioxidant activity of a standardized polyphenol mixture extracted from brown propolis. *Int J Mol Sci.* 2019;20(5):1–14.
90. Xia EQ, Deng GF, Guo YJ, Li H Bin. Biological activities of polyphenols from grapes. *International Journal of Molecular Sciences.* 2010.
91. Wallerath T, Deckert G, Ternes T, Anderson H, Li H, Witte K, et al. Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation.* 2002;
92. Posadino AM, Biossa G, Zayed H, Abou-Saleh H, Cossu A, Nasrallah GK, et al. Protective effect of cyclically pressurized solid–liquid extraction polyphenols from cagnulari grape pomace on oxidative endothelial cell death. *Molecules.* 2018;23(9):1–12.
93. Liu S, Sun Z, Chu P, Li H, Ahsan A, Zhou Z, et al. EGCG protects against homocysteine-induced human umbilical vein endothelial cells apoptosis by modulating mitochondrial-dependent apoptotic signaling and PI3K/Akt/eNOS signaling pathways. *Apoptosis.* 2017;22(5):672–80.

12. ANEXOS

Anexo 1



CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO V2

HOSPITAL MATERNO INFANTIL INGUARÁN E
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA.

Num. ID: _____

Por favor, lea completamente esta carta antes de decidir si desea ingresar al estudio. De antemano, le informamos que usted puede o no dar su consentimiento para participar en él sin ninguna consecuencia. Tome todo el tiempo que sea necesario para leer este formato, pregunte y hable de este proyecto a familiares y amigos.

Esta carta tiene como objetivo explicarle en qué consistirá su participación en el protocolo.

Investigación: “Comparación del efecto de un extracto de cocoa versus polifenoles biotransformados sobre la expresión génica en células mononucleares y endoteliales ”

Responsable: Dra. María Elizabeth Tejero Barrera

Teléfono: 5350-1145

Correo electrónico: etejero@inmegen.gob.mx

INVITACIÓN DE PARTICIPACIÓN: Se le invita a participar en un estudio de investigación realizado por el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) y con participación del Hospital Materno Infantil Inguarán (HMII) de la Secretaría de Salud del Gobierno del D.F., que tiene por objeto conocer el efecto que tienen los polifenoles de cocoa sobre las de células del cordón umbilical. Los polifenoles son sustancias antioxidantes encontradas en frutas y verduras, y su consumo se ha relacionado con beneficios a la salud. La cocoa tiene una alta concentración de polifenoles activos y sus beneficios se han asociado a la protección en contra de sustancias oxidativas, por ejemplo las originarias por el consumo de tabaco, alcohol y estrés. Además de polifenoles, la cocoa contiene otras sustancias como cafeína y teobromina. Los mecanismos a través de los cuales la cocoa actúa en el organismo aún están siendo investigados. También se desconoce si es el conjunto de componentes de cocoa, o únicamente sus polifenoles, los que confieren beneficios a la salud.

Propósito: Este estudio propone estudiar durante los próximos dos años, muestras de cordones umbilicales de mujeres embarazadas que acudan para la atención de su trabajo de parto en el HMII. El objetivo es estudiar cómo responden las células de cordón umbilical al ser estimuladas con todos los componentes de la cocoa; y si esta respuesta es diferente cuando se estimulan únicamente con los polifenoles. Ésta carta de consentimiento le dará información importante acerca del proyecto de investigación mencionado y de manera adicional, un miembro de nuestro equipo de investigación le hablará acerca de su participación en este proyecto. Si usted decide formar parte de este proyecto de investigación, deberá firmar esta carta de consentimiento y recibirá una copia de la misma.

¿Por qué se esta haciendo esta investigación? Este proyecto de investigación se está llevando a cabo para entender si los benéficos asociados a la cocoa se deben al efecto aditivo de todos sus componentes, o si son ocasionados únicamente por los polifenoles. Se pretende utilizar células de cordón umbilical como un modelo reflejo del efecto que tiene la cocoa y sus polifenoles sobre el sistema endotelial.

¿Por cuánto tiempo voy a participar en este estudio de investigación? Su participación en éste estudio se limita a otorgarnos permiso para disponer de su placenta y cordón umbilical una vez que hayan sido expulsada durante el parto. La placenta y sus anexos son normalmente desechados e incinerados.

¿Qué pasará en este estudio de investigación? Si usted acepta participar en este estudio, se le pedirá que nos firme ésta carta, autorizándonos a utilizar la placenta y sus anexos, una vez que hayan sido expulsados. Nosotros procesaremos estos tejidos en el laboratorio, para obtener células y analizar cómo responden al estímulo con cocoa y con polifenoles de cocoa aislados. Para esto se analizará el ADN (ácido desoxirribonucleico), el ARN (ácido ribonucleico) y se identificarán otras moléculas en plasma. Los resultados de estos análisis podrán ser utilizados en estudio similares a este.

¿Cuáles son los riesgos o posibles molestias por participar en este estudio?

No existe ningún riesgo extra para usted o para su hijo. Toda la información recopilada durante el estudio será manejada con estricta confidencialidad hasta donde es permitido por las leyes federales, estatales y locales. Solo las personas que están directamente relacionadas con el estudio tendrán la información que permite identificarlo, esta información no será otorgada a nadie más y estará protegida bajo llave y por una contraseña. La información y los expedientes pueden ser revisados por el Comité de Ética y probablemente por otras Autoridades Regulatorias. Consecuentemente, usted deberá autorizarnos a entregar sus registros médicos a las Autoridades de Salud Regulatorias Nacionales y y al Comité de Ética en caso de ser requerido. Estos registros serán utilizados por ellos únicamente en relación al cumplimiento de las obligaciones concernientes a este estudio.

¿Cuáles son los posibles beneficios de participar en este estudio?

Dado el tipo de estudio de que se trata, no esperamos que usted se beneficie de forma directa con los estudios que haremos, pero la información que obtendremos puede resultar en el futuro de gran utilidad para otras personas.

¿Se me pagará por participar en este estudio?

No habrá ningún pago en efectivo por su participación en este estudio.

¿Tendré que pagar por mi participación en este estudio?

Todos los estudios se harán sin costo alguno para usted. Usted deberá pagar los demás procedimientos relacionados con la resolución de su embarazo en el HMII, como cualquier otra paciente perteneciente al mismo.

¿Si tengo preguntas o preocupaciones acerca de este estudio, a quién puedo llamar?

Si usted quiere informarse sobre sus derechos como participante de este proyecto de investigación, o tiene alguna queja concerniente a este estudio, puede contactar a la Mtra. Garbiñe Saruwatari Zavala en el tel. 5350-1900 ext. 1157. Ella es la Presidente del Comité de Ética Investigación, establecida para ayudar a proteger los derechos de los participantes en proyectos de investigación.

Para información relacionada a la investigación, se puede contactar a la Investigadora Principal del estudio en el INMEGEN, la Dra. María Elizabeth Tejero Barrera en el teléfono y correo que se encuentran al inicio de esta carta.

Restricciones Regulatorias

El estudio se ha estructurado en concordancia con la Declaración de Helsinki.

FORMA DE CONSENTIMIENTO

Título del estudio: “Comparación del efecto de un extracto de cocoa versus polifenoles biotransformados sobre la expresión génica en células mononucleares y endoteliales ”

Investigador Responsable: Dra. María Elizabeth Tejero Barrera

Institución: INMEGEN, México DF.

Participante

Apellidos:

Nombre _____ (s):

Fecha _____ de _____ nacimiento:

Dirección:

—

—

En este documento yo confirmo que (favor de seleccionar en caso de ser verdadero)

- He leído el consentimiento informado de este estudio.
- Se me ha explicado la naturaleza, propósito, duración, efecto y riesgos relacionados con el estudio. Se me ha informado qué hacer durante el estudio.
- Todas mis preguntas relacionadas con el estudio han sido satisfactoriamente contestadas.
- Estoy de acuerdo en participar en este estudio. Cooperaré con los investigadores y los contactaré en caso de ser necesario.
- Entiendo que mi participación en este estudio es voluntaria y que puedo rehusar a participar en él.
- Comprendo que si durante el estudio se dispusiera de alguna información que pudiera influir en mi voluntad de proseguir mi participación, me sería revelada lo antes posible.
- Estoy de acuerdo en que se revelarán los resultados del estudio, no obstante, mi nombre y dirección serán siempre confidenciales.
- Estoy de acuerdo en que el material genético (ADN) que se obtenga de mi sangre pueda ser almacenado y utilizado para investigaciones similares a esta.
- Estoy de acuerdo en que los investigadores principales conserven mis datos para invitarme a participar en futuros proyectos de investigación.

Yo, _____ he leído la hoja de información. Se me ha explicado el procedimiento del estudio, he podido hacer preguntas al respecto, y he comprendido el contenido del estudio.

Acepto voluntariamente participar en este estudio.

FIRMA:

Nombre del participante

Firma y fecha de la participante

Nombre y dirección del testigo y relación con la paciente

Firma y fecha del testigo

Nombre y dirección del testigo 2 y relación con la paciente

Firma y fecha del testigo

Declaración del investigador o persona que obtiene el consentimiento/asentimiento:

He explicado la investigación al participante del estudio y he respondido lo mejor que he podido a todas las preguntas acerca de esta investigación.

Investigador que obtiene el Consentimiento (Letra de Molde)

Fecha/Hora

Firma del Investigador que obtiene el Consentimiento

Fecha/Hora

Anexo 2. Reactivos utilizados

Reactivo	Denominación	Marca	No. Cat
Antibiótico – Antimicótico	Anti-Anti (100x) (100 mL)	GIBCO	15240-062
Colagenasa	Collagenase Type II (1 g)	GIBCO	17101-015
Epicatequina	(-) – Epicatechin (5 mg)	SIGMA	E4018-5mg
Factor de crecimiento endotelial	Endothelial cell growth (15 mg)	SIGMA	E0760-15 MG
M199	Medium 199 powder (9.5 g)	GIBCO	31100-035
PBS	Phosphate Buffered Saline	GIBCO	70013-032
Suero fetal bovino	Fetal Bovine Serum (500 mL)	BIOWEST	S1650-500
Tripsina	Trypsin EDTA Solution 10x	SIGMA	T4174
Tripsina	0.05% Trypsin-EDTA (1X) (500 mL)	GIBCO	25300-062
Water Cell Culture	Water for cell Culture Applications	BioThittaker	17-724F
Penicilina-Streptomcina	Penicillin-Streptomycin	SIGMA	P4333-100ml
LPS	Lipopolisacárido	SIGMA	297-473-0

Anexo 3. Composición de medios de cultivo

Nombre del medio	Composición
Medio Basal (M199)	Medio 199 1L – GIBCO #31100-035 2.2 g NaHCO ₃ 5.5 g HEPES
Medio de transporte	M199 (Basal) 1% Antibiótico Antimicótico – GIBCO #15240-062
Medio completo	M199 (Basal) 1% Antibiótico Antimicótico – GIBCO #15240-062 20% SFB – BIOWEST #S1650-500 500 µL x 100 ml M199 de Factor de crecimiento endotelial – SIGMA #E0760-15 MG
Medio de estimulación Medio para inactivar	M199 (Basal) 1% Antibiótico Antimicótico – GIBCO #15240-062 10% SFB – BIOWEST #S1650-500
Medio de congelación	40% M199 (Basal) 50% SFB – BIOWEST #S1650-500 10% DMSO

NOTA. El SFB tuvo que inactivarse para ser utilizado en los experimentos, sometiéndolo a 56°C durante 30 min.

Anexo 4. Protocolo para la extracción de HUVECs

Adaptado de B. Baudin

1. Previo a la recepción del cordón, colocar en la campana de flujo laminar todo el material a utilizar expuesto a luz UV durante 15 min. **(Verificar que el cordón no se encuentre expuesto en lo más mínimo a la luz UV.)**
2. Una vez que se cuente con el cordón y el material esterilizado, se retira el cordón del medio de transporte y se coloca sobre una cama de gasas y papel aluminio.
3. Se limpia el cordón con las gasas, se retiran restos de medio, sangre y coágulos.
4. Con ayuda de las pinzas de disección, buscar la vena en uno de los extremos del cordón; puede distinguirse por debajo de las arterias, siendo el orificio más grande (puede sentirse más blando, las arterias se perciben un poco más rígidas). En caso de no distinguir la vena, puede hacerse un pequeño corte con el bisturí.
5. Una vez que se encuentra la vena, colocar un adaptador dentro. Con ayuda de las pinzas, subir el cordón de manera que la parte inferior del adaptador quede totalmente cubierta (evitará que se generen fugas).
6. Realizar un primer nudo con el hilo estéril; se le da una vuelta al cordón y al adaptador; puede anudarse nuevamente para dar más seguridad. Éste nudo evita fugas.
7. Realizar un segundo nudo en forma de "mariposa" cruzándolo en la parte superior del adaptador y bajándolo por la parte trasera cruzándolo nuevamente. Amarrar a la misma altura del nudo anterior. Éste nudo evitará que se resbale el cordón del adaptador. Hacer otro nudo sencillo para asegurar.
8. Colocar en ese extremo una jeringa con aproximadamente 15 ml de PBS 1X. De esta manera se enjuaga la vena de manera interna, retirando coágulos y restos de sangre. Procurar que los restos de sangre caigan en el vaso de precipitados con cloro y benzal (para desinfectar). Repetir el proceso 3 veces o hasta que no salgan restos de sangre.
9. Colocar el segundo adaptador en el otro extremo del cordón, realizar el primer y segundo nudo como se describió en los dos puntos anteriores.
10. Colocar la otra jeringa cargada con aproximadamente 15 ml de PBS 1X y pasarla hasta que "se bote" el émbolo de la otra jeringa. Esto servirá para verificar que no haya fugas en ningún extremo y que el cordón no esté picado. Retirar el PBS y desechar.
11. Una vez que se haya asegurado la ausencia de fugas, colocar en la jeringa aproximadamente 10 ml de colagenasa 0.02% (la cantidad de colagenasa debe variar

- dependiendo del tamaño y longitud del cordón) o hasta que “se bote” el émbolo del otro extremo y el cordón se vea ligeramente hinchado.
12. Envolver el cordón, retirando la gasa y que sólo quede el aluminio. Debe hacerse una especie de “tamal”; posteriormente se incuba a 37°C durante 15 min.
 13. Al minuto 15, se revisa que no haya fugas y se da un ligero masaje al cordón. Si quedó un poco de colagenasa en la jeringa, se intenta meterla. Se regresa a la incubadora otros 15 min.
 14. Mientras el cordón se incuba, colocar en un tubo Falcon de 15 ml la misma cantidad de M199 para inactivar, que de colagenasa utilizada.
 15. Transcurrida la media hora en total, el cordón se retira de la incubadora, se absorbe toda la colagenasa en una sola jeringa y se deposita en el tubo Falcon con M199 para inactivar.
 16. Centrifugar 7 min a 1200 RPM.
 17. Decantar sobrenadante, resuspender el pellet con 1 ml de M199 completo 20% SFB.
 18. Tomar 10 µl para contabilizar en BioRad-Cell Counter.
 19. Sembrar el pellet directo en una botella Corning de 25 cm² y agregar el medio restante para que sean 5 ó 6 ml, dependiendo la cantidad de células recuperadas.
 20. Incubar a 37°C, 5% CO₂. El medio debe ser cambiado 24 hrs después de que haya sido realizada la extracción.

Anexo 5. Protocolo para la realización de pases de HUVECs

1. Realizar los pases cuando exista una confluencia celular de aproximadamente 80%-90%.
2. Retirar el medio en el que se encuentran las células y realizar 1 ó 2 lavados con 2 ml de PBS 1X a 37°C.
3. Agregar 3-4 ml de Tripsina-EDTA 0.05%, dejar incubar la muestra por aproximadamente 3-4 min a 37°C y 5% CO₂ hasta que se observen en el microscopio las células despegadas.
4. Inactivar la tripsina añadiendo la misma cantidad de M199 para inactivar que de tripsina utilizada (3-4 ml).
5. Centrifugar la muestra a 1200 RPM por 5 min para obtener el pellet.
6. Resuspender el pellet en 1 ml de M199 completo + SFB 10% para poder sembrar las células en otros frascos.
7. Sembrar las células en los nuevos frascos y ajustar con la cantidad suficiente de M199 completo + SFB.
8. Incubar las células a 37°C y 5% CO₂.

Anexo 6. Protocolo para la congelación de HUVECs

1. Retirar el medio en el que se encuentran las células y realizar 1 ó 2 lavados con 2 ml de PBS 1X a 37°C.
2. Agregar 3-4 ml de Tripsina-EDTA 0.05%, dejar incubar la muestra por aproximadamente 3-4 min a 37°C y 5% CO₂ hasta que se observen en el microscopio las células despegadas.
3. Inactivar la tripsina añadiendo la misma cantidad de M199 para inactivar que de tripsina utilizada (3-4 ml).
4. Centrifugar la muestra a 1200 RPM por 5 min para obtener el pellet.
5. Resuspender el pellet en 1 ml de M199 completo + SFB 10% para poder cuantificar.
6. Repartir la cantidad requerida en tubos especiales para congelar; se recomienda 1×10^6 células en 1 – 1.5 ml de medio de congelación.

Anexo 7. Protocolo para la descongelación de HUVECs

1. Mantener las muestras durante 5 min en hielo.
2. Posteriormente mantener las muestras durante 5 min a temperatura ambiente.
3. Mantener la temperatura de las células a 37°C durante 5 min.
4. Centrifugar de 1,000 a 2,000 RPM, retirar el medio de congelación.
5. Realizar 3 lavados con PBS 1X para retirar restos del medio.
6. Resuspender en 1 ml de M199 + SFB 10%. Se pueden volver a contar en caso de ser necesario para verificar el número de células vivas.

Anexo 8. Protocolo para ensayo de citometría de flujo.

Adaptado de Biotechnology Santa Cruz

Preparación de muestra

1. Lavar la muestra 2 veces con PBS 1X
2. Agregar 3-4 tripsina EDTA 0.05%, esperar 4 min a que las células se despeguen.
3. Inactivar la acción de la tripsina con 5 ml de M199 para inactivar.
4. Centrifugar la muestra a 1200 RPM por 2 min; decantar el sobrenadante.
5. Resuspender el pellet en 1 ml de PBS 1X y cuantificar la muestra.

Fijación

(Protocolo A)

1. Agregar 1 ml de PFA 4% e incubar a 4°C 10 min.
2. Lavar 3 veces con PBS frío y centrifugar por 5 min.
3. Bloquear con SFB al 5% en PBS por 10 min.
4. Lavar 3 veces con PBS frío y centrifugar por 5 min.
5. Incubar con anticuerpo 2.5 μ l disuelto en 250 μ l de SFB al 2% en PBS frío cubierto de la luz durante toda la noche. (desde 1 ó 2 h es suficiente).
6. Lavar 2 veces con PBS y resuspender en 1 ml de PBS frío, mantenerse a 4°C hasta su lectura en el citómetro.

(Protocolo B)

1. Bloquear con SFB al 5% durante 10 min a 4°C.
2. Lavar 3 veces con PBS y centrifugar por 5 min.
3. Incubar con anticuerpo 2.5 μ l disuelto en 250 μ l de SFB 2% en PBS frío, cubrir de la luz por 30 min a 1 h.
4. Lavar 2 veces con PBS y centrifugar por 5 min.
5. Fijar con PFA 4% por 10 min a 4°C
6. Lavar 3 veces con PBS y centrifugar por 5 min.
7. Resuspender n 1 ml de PBS y mantener a 4°C hasta su lectura en el citómetro.

Anexo 9. Protocolo para la Extracción de RNA Método de TRIzol

Células cultivadas o adheridas en monocapa

1. Retirar el medio de cultivo
2. Agregar 1 ml del reactivo de trizol por cada 10 cm² de caja de cultivo.
3. Desprender y Lisar las células mediante pipeteo; transferir a un tubo Eppendorf de 1.5 ml. (Las muestras pueden almacenarse en TRIzol por meses a -80°C.

Separación de fases

4. Mantener la muestra a temperatura ambiente por 5 min, colocar en hielo para evitar la degradación.
5. Agregar 0.2 ml de cloroformo por cada ml de TRIzol utilizado. Tapar y agitar durante 15 segundos.
6. Incubar 2-3 min a temperatura ambiente.
7. Centrifugar a 12,000 Xg durante 15 min a 4°C, (se observarán 3 fases, la fase acuosa donde se encuentra el RNA, una interfase y la fase fenólica.
8. Separar delicadamente la fase acuosa con una pipeta y depositarla en otro tubo.

Purificación

9. Agregar 0.5 ml de isopropanol al 100% a la fase acuosa por cada 1 ml de TRIzol utilizado, agitar. Incubar 10 min a temperatura ambiente.
10. Centrifugar a 12,000 Xg durante 10 min a 4°C, al término de la centrifugación se observará un botón ó pellet blanquecino.
11. Realizar lavados de etanol; de 2 a 5 con etanol 75% por cada ml de TRIzol utilizado. (Se puede almacenar en ésta fase hasta 1 año a -20°C)
12. Agitar en vortex 5 segundos, centrifugar a 7500 Xg durante 5 min. Eliminar el sobrante.
13. Repetir los lavados de 2 a 5 veces. Secar al aire libre de 5 a 10 min.
14. Resuspender el pellet en 30 agua libre de nucleasas/RNAsas. Cuantificar la concentración en espectrofotómetro Nanodrop.
15. Almacenar a -80°C hasta su uso.

Anexo 10. Protocolo para retrotranscripción (RT-PCR)

First Strand cDNA Synthesis Kit (#K1612)

1. Cuantificar muestra de RNA (90 ng/ μ l -100 ng/ μ l)

2. Colocar en un tubo:

- 5 μ l de RNA (500 ng/ μ l)
- 1 μ l de Random Primers

Ajustar volumen a 11 μ l con H₂O

- 1 μ l de Ribolock RNAsa
- 4 μ l Buffer 5X
- 2 μ l dNTPS Mix
- 2 μ l MMulv transcriptasa R

3. Termociclar a las siguientes condiciones:

- 25°C – 5 min
- 37°C – 60 min
- 70°C – 5 min
- 4°C – ∞

Anexo 11. Protocolo para PCR en tiempo real

Para realizar los ensayos de expresión de genes se utilizaron las siguientes sondas:

Gen de Interés	Sonda
<i>IL-6</i>	HS00985639_m1
<i>IL-8</i>	HS00174103_m1
<i>Sele-E</i>	HS00174057_m1
<i>eNOS</i>	HS01574659_m1
<i>NF-kB (p50)</i>	Hs00765730_m1
<i>SOD2</i>	Hs00167309_m1

1. Colocar en un pozo (placas de 96 pozos):

- 2 µl cDNA
- 2.5 µl H₂O
- 5 µl MM Maxima Probe
- 0.5 µl Sonda

NOTA: Realizar los cálculos necesarios para el número de muestras que se necesite.

2. Sellar las placas y centrifugar a 3,200 RPM durante 2-3 min. Asegurarse de que las muestras no tengan burbujas.

3. Termociclar a las siguientes condiciones:

- 50°C – 2 min
- 95°C – 10 min
- 95°C – 15 seg
- 60°C – 1 min

Anexo 12. Protocolo para ensayo de citotoxicidad (SIGMA KIT)**(3-[4,5- dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) ó MTT**

1. Llevar los cultivos a un área estéril como la campana de flujo laminar.
2. Reconstituir cada vial de MTT [M-5655] a usar con 3 ml de solución salina sin rojo fenol ni SFB. (PBS 1X).
3. Agregar el MTT reconstituido en una proporción equivalente al 10% del volumen del medio de cultivo.
4. Regresar los cultivos a la incubadora de 2-4 h, dependiendo del cultivo celular y su densidad.
5. Luego del periodo de incubación, disolver los cristales de formazano formados agregando solución solubilizante de MTT [M-8910] en la misma cantidad original de medio de cultivo.
6. Agitar durante 10-15 min en un shaker; en caso de que exista una gran densidad de cristales de formazano, se puede pipetear para diluir mejor los cristales.
7. Medir la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm