



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

EFFECTO DEL CONSUMO DE UN CONCENTRADO DE COCOA RICO EN POLIFENOLES SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES ASOCIADOS A VÍAS DE REGULACIÓN ANTIOXIDANTE

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
PALOMA KARINA BARRERA REYES

DIRECTOR DE TESIS
DRA. MARÍA ELIZABETH TEJERO BARRERA
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

COMITÉ TUTOR
DRA. ANAHÍ CHAVARRÍA KRAUSER
FACULTAD DE MEDICINA
DR. ARMANDO TOVAR PALACIOS
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN “SALVADOR ZUBIRÁN”

CIUDAD DE MÉXICO, JUNIO DE 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Nutrigenómica y Nutrigenética del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) bajo la asesoría de la Dra. María Elizabeth Tejero Barrera. El proyecto tuvo financiamiento parcial de Nestec y la Cátedra de Nutrigenómica Nestlé-INMEGEN. El autor principal del trabajo tuvo beca CONACyT para la realización de estudios de Doctorado y el resto de los estudiantes tuvieron apoyo económico de la Cátedra de Nutrigenómica Nestlé-INMEGEN. Se extiende el agradecimiento al Programa de Doctorado de Ciencias Biomédicas por haber apoyado la elaboración y culminación de esta investigación. Así mismo, extendemos nuestro agradecimiento al Doctor L. Actis-Goretta y al Comité Tutor por su asesoría al presente trabajo.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| GLOSARIO | 6 |
| ORGANIZACIÓN DE LA TESIS | 7 |
| RESUMEN | 8 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 9 |
| 2. MARCO TEÓRICO | 11 |
| 2.1 POLIFENOLES | 11 |
| 2.2 POLIFENOLES DE LA COCOA | 12 |
| 2.2.1 ¿Qué es la cocoa? | 12 |
| 2.2.2 Consumo | 14 |
| 2.2.3 Biodisponibilidad | 15 |
| 2.2.4 Perfil metabólico | 16 |
| 2.3 EFECTOS BIOLÓGICOS DE LOS POLIFENOLES DE COCOA | 19 |
| 2.3.1 Evidencia observacional | 19 |
| 2.3.2 Evidencia experimental | 20 |
| 2.3.2.1 <i>Evidencia experimental en humanos</i> | 21 |
| 2.3.2.1 <i>Evidencia experimental en modelos animales y cultivo celular</i> | 22 |
| 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 25 |
| 4. HIPÓTESIS | 27 |
| 5. OBJETIVO | 27 |
| 5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 27 |
| 6. METODOLOGÍA | 28 |
| 6.1 DISEÑO DEL ESTUDIO | 28 |
| 6.2 SUJETOS DE ESTUDIO | 29 |
| 6.2.1 Criterios de inclusión | 29 |
| 6.2.2 Criterios de exclusión | 29 |
| 6.2.3 Criterios de eliminación | 29 |
| 6.3 INTERVENCIÓN | 29 |
| 6.4 PRODUCTO DE ESTUDIO | 31 |
| 6.5 RUTA DE ADMINISTRACIÓN | 31 |
| 6.6 CEGAMIENTO | 31 |
| 6.7 TAMAÑO DE MUESTRA | 32 |

| | |
|---|-----------|
| 7. MÉTODOS | 33 |
| 7.1 CUANTIFICACIÓN DE METABOLITOS DE EPICATEQUINA EN PLASMA | 33 |
| 7.2 CUANTIFICACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL PLASMA | 34 |
| 7.3 PREPARACIÓN DE RNA | 34 |
| 7.4 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN | 34 |
| 7.4.1 Expresión de <i>SOD2</i> | 34 |
| 7.4.2 <i>Perfil de expresión global</i> | 35 |
| 7.4.2.1 <i>Procesamiento de microarreglos</i> | 35 |
| 7.4.2.2 <i>Perfil de la expresión de genes</i> | 35 |
| 7.4.2.3 <i>Análisis de datos de microarreglo</i> | 36 |
| 7.4.3.4 <i>Análisis de enriquecimiento funcional</i> | 37 |
| 7.5 VALIDACIÓN DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS | 37 |
| 7.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 38 |
| 8. RESULTADOS | 39 |
| 8.1 PARTICIPANTES DEL ESTUDIO | 39 |
| 8.2 PERFIL DE METABOLITOS DE (-)-EPICATEQUINA | 39 |
| 8.3 CAMBIO EN LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL PLASMA | 42 |
| 8.4 EFECTO DEL CONSUMO DE COCOA SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES | 43 |
| 8.4.1 Efecto del consumo de cocoa sobre la expresión de <i>SOD2</i> | 43 |
| 8.4.2 Efecto del consumo de cocoa sobre el perfil de expresión global en PBMCs | 45 |
| 8.4.2.1 <i>Análisis de enriquecimiento de genes diferencialmente expresados</i> | 50 |
| 8.4.2.2 <i>Validación de genes diferencialmente expresados</i> | 52 |
| 9. DISCUSIÓN | 53 |
| 10. CONCLUSIÓN | 58 |
| 11. BIBLIOGRAFÍA | 59 |
| ANEXO 1 | 65 |
| ANEXO 2 | 71 |
| ANEXO 3 | 75 |
| ANEXO 4 | 76 |
| ANEXO 5 | 85 |

FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Clasificación de flavonoides | 12 |
| Figura 2: Estructura química de flavanoles | 13 |
| Figura 3: Fruto del cacao | 14 |
| Figura 4: Metabolismo de flavanoles (flavan-3-oles) | 15 |
| Figura 5: Concentración de metabolitos de (-)-epicatequina en plasma en función del tiempo | 17 |
| Figura 6: Diferencias en el perfil de metabolitos de (-)-epicatequina por especie | 18 |
| Figura 7: Diseño del estudio | 28 |
| Figura 8: Recolección de muestras biológicas y análisis en laboratorio | 30 |
| Figura 9: Perfil de expresión de genes | 36 |
| Figura 10: Diagrama de flujo de los participantes a través del estudio | 40 |
| Figura 11: Perfil de metabolitos identificados por UHPLC-MS/MS | 41 |
| Figura 12: Concentración de metabolitos de (-)-epicatequina en muestras de plasma posterior al consumo agudo y crónico de cocoa | 42 |
| Figura 13: Capacidad antioxidante del plasma posterior al consumo agudo y crónico de cocoa y placebo | 42 |
| Figura 14: Hipótesis estadísticas a evaluar para verificar la confiabilidad de los datos | 44 |
| Figura 15: Cambio en la expresión de SOD2 posterior al consumo agudo y crónico de un concentrado de cocoa | 44 |
| Figura 16: Diagrama de flujo de las muestras de RNA analizadas en microarreglo | 46 |
| Figura 17: Análisis de agrupamiento de las muestras | 47 |
| Figura 18: Mapas de calor de genes diferencialmente expresados posterior al consumo agudo de un concentrado de cocoa y placebo | 47 |
| Figura 19: Análisis de enriquecimiento de los genes diferencialmente expresados posterior al consumo de cocoa | 50 |

TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1: Contenido de polifenoles y capacidad antioxidante de productos de cocoa comercialmente disponibles | 14 |
| Tabla 2: Concentración de metabolitos de (-)-epicatequina posterior al consumo oral | 18 |
| Tabla 3: Caracterización del polvo de cocoa rico en polifenoles | 32 |
| Tabla 4: Validación. Síntesis de cDNA y qPCR en tiempo real | 41 |
| Tabla 5A: Genes diferencialmente expresados posterior al consumo de cocoa | 48 |
| Tabla 5B: Genes diferencialmente expresados posterior al consumo de placebo | 49 |
| Tabla 6A: Análisis de enriquecimiento funcional de genes modulados posterior al consumo de cocoa | 51 |
| Tabla 6B: Análisis de enriquecimiento funcional de genes modulados posterior al consumo de placebo | 51 |

GLOSARIO

| | |
|--------------|---|
| CAP | Capacidad antioxidante del plasma |
| PBMC | Células mononucleares de sangre periférica |
| SOD2 | Superóxido dismutasa dependiente de manganeso |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno, por sus siglas en inglés |
| HDL | Colesterol de alta densidad |
| TG | Triglicéridos |
| PAS | Presión arterial sistólica |
| PAD | Presión arterial diastólica |
| TNF α | Necrosis tumoral alfa |
| NF-kB | Factor de transcripción nuclear kappa-B |
| VCAM | Moléculas de adhesión vascular |
| HPLC-MS/MS | Cromatografía líquida acoplada a masas/masas |
| NO | Óxido nítrico |
| HC | Hidratos de carbono |
| IL | Interleucina |
| IPAQ | Cuestionario Internacional de Actividad Física |
| Tx | Tratamiento |
| EC | (-)-Epicatequina (EC) |
| Cat | (+)-Catequina |
| E3'G | (-)-Epicatequina-3'-O-glucuronido |
| E4'G | (-)-Epicatequina-4'-O-glucuronido |
| C4'G | (+)-Catequina-4'-O- glucuronido |
| E3'S | (-)-Epicatequina-3'-O-sulfato |
| E4'S | (-)-Epicatequina-4'-O-sulfato |
| 3'ME4S | (-)-3'-O- Metilepicatequina-4'-sulfato |
| 4'ME | (-)-4'-O-metilepicatequina |
| 3'ME | (-)-3'-O-metilepicatequina |
| RIN | Número de integridad del RNA , por sus siglas en inglés |

| | |
|-------------|---|
| IPA | Ingenuity Pathway Analysis |
| CXCR2/IL8RB | Receptor beta de interleucina |
| ADRB2 | Adrenoreceptor beta 2 |
| FPR1 | Receptor 1 del peptido formil |
| CXCL8/IL8 | Interleucina 8 |
| TEAC | Trolox equivalent antioxidant capacity |
| SESN3 | Sestrina 3 |
| PTPCR | Proteína tirosina fosfatasa receptor tipo C |

RESUMEN

Introducción: El consumo de polifenoles de cocoa, principalmente el monómero (-)-epicatequina, se ha asociado a efectos positivos en la salud. Resultados de estudios *in vitro* y en modelos animales sugieren que los polifenoles de cocoa son capaces de modular la expresión de genes asociados a vías de regulación antioxidante e inflamación. Sin embargo, su efecto sobre el cambio en el nivel de expresión de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, por sus siglas en inglés) de individuos sanos, aún no se ha evaluado.

Objetivo: Evaluar el efecto del consumo de un concentrado de cocoa de alto contenido en polifenoles sobre el cambio en la transcripción de PBMCs, y analizar los metabolitos de (-)-epicatequina en plasma, lo cual puede estar relacionado al cambio en la respuesta antioxidante del plasma de individuos aparentemente sanos.

Métodos: Ensayo clínico cruzado para la fase aguda (dosis única) y paralelo para la fase crónica (cuatro semanas), aleatorizado, cegado, con grupo control, en individuos aparentemente sanos que consumieron un concentrado de cocoa de alto contenido en polifenoles y maltodextrinas como tratamiento control. Las mediciones de metabolitos de (-)-epicatequina, la capacidad antioxidante del plasma y la expresión de superóxido dismutasa dependiente de manganeso (SOD2) se realizaron en condiciones de ayuno y 2 horas después del consumo de los tratamientos. El cambio en la transcripción de PBMCs posterior al consumo de una dosis única de los tratamientos, se evaluó por microarreglos en un submuestra de individuos. El análisis de vías se realizó utilizando el programa Ingenuity Pathway Analysis (IPA).

Resultados: Veinte voluntarios (9 mujeres) se incluyeron en el estudio. Un aumento en la concentración de metabolitos de (-)-epicatequina posterior al consumo de cocoa se identificó en todos los participantes sin asociarse a cambios en la capacidad antioxidante del plasma. La expresión de SOD2 aumentó posterior al consumo agudo y crónico de cocoa. La respuesta transcripcional en PBMCs fue diferente entre tratamientos; el consumo de cocoa modificó la expresión de 98 genes mientras que el consumo del control modificó la expresión de únicamente 18. Los genes diferencialmente expresados posterior al consumo de cocoa incluyeron citocinas inflamatorias y otras moléculas involucradas en el balance redox. El análisis de redes identificó funciones anotadas como disminución de la producción de especies reactivas de oxígeno ($p=9.58E-04$), disminución de la activación de leucocitos ($p=4E-03$), y movilización de calcio ($p=2.51E-05$).

Conclusión: No se encontró asociación entre los metabolitos de (-)-epicatequina y la capacidad antioxidante del plasma. Los cambios en la expresión de genes en PBMCs sugieren efectos antiinflamatorios y antioxidantes posterior al consumo de cocoa.

1. INTRODUCCIÓN

Los polifenoles son moléculas que participan en la defensa contra radiación ultravioleta y agresión por patógenos. En humanos, el consumo de polifenoles a mostrado efectos en hipertensión, dislipidemias, inflamación, resistencia a la insulina, reactividad vascular y otras patologías asociadas a estrés. Los efectos a la salud que confieren los polifenoles de cocoa se han documentado en diversos estudios epidemiológicos y experimentales, su capacidad para proteger constituyentes celulares en contra del daño oxidativo a través de la captación de radicales libres, ha sido el mecanismo de acción más estudiado en modelos animales e *in vitro*. Sin embargo, investigaciones recientes han cuestionado la plausibilidad de este mecanismo en humanos, la baja biodisponibilidad de los polifenoles y su amplia conjugación en el tracto gastrointestinal, hacen poco probable que estas moléculas actúen como antioxidantes directos en plasma. La hipótesis de un mecanismo de acción fundamentado en la modulación de la expresión de genes asociados a vías de regulación antioxidante ha comenzado a ser aceptada. Probablemente, los polifenoles conjugados sean capaces de interactuar con receptores de membrana y otros componentes de la superficie celular que participan en la transducción de señales y subsecuente modulación del estado redox del organismo.

Hallazgos de estudios *in vitro* y en modelos animales han demostrado que los polifenoles de cocoa modulan la concentración de calcio intracelular y previenen la oxidación al inhibir la expresión de moléculas que median la respuesta inflamatoria, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), factor de transcripción nuclear kappa-B (NF-kB), y citocinas proinflamatorias. Efectos similares se observan en estudios *ex vivo* y en modelos animales, en los que se reporta la disminución en la expresión de biomarcadores de disfunción endotelial e inflamación como moléculas de adhesión (VCAM). La extrapolación de estos resultados al modelo humano es compleja debido a: 1) el uso de dosis que exceden las logradas a través de la dieta, 2) la estimulación con polifenoles en su forma nativa, los cuáles no se encuentran en plasma humano, 3) la ausencia de metabolitos conjugados, que son las moléculas bioactivas en la cocoa, y 4) el perfil de metabolitos conjugados no es equivalente entre especies, ninguno de los metabolitos de mayor abundancia en humanos se identificó en ratas y únicamente dos se identificaron en ratones pero en menor concentración. Las diferencias en el grupo (glucurónido, sulfato y metilo) y posición de conjugación (3' y 4') de los metabolitos, puede significar diferencias en el tipo de proteínas con las que interactúan, por lo tanto,

es factible suponer que diferentes metabolitos podrían ejercer diferentes efectos biológicos y que los metabolitos presentes en plasma de roedores, no tienen los mismos efectos que los presentes en plasma humano.

El efecto que tiene el consumo de polifenoles de cocoa sobre cambio transcripcional en PBMCs de humanos, no se ha evaluado. Sin embargo, los hallazgos de estudios con intervenciones similares concuerdan con lo previamente reportado en modelos animales e *in vitro* estimulados con polifenoles de cocoa. Por ello, el presente estudio busca evaluar el efecto que tiene el consumo de un concentrado de cocoa de alto contenido en polifenoles, sobre el cambio en la expresión de genes asociados a vías de regulación antioxidante en PBMCs de humanos aparentemente sanos.

2. MARCO TEÓRICO

Los polifenoles son moléculas muy abundantes en la naturaleza, confieren el sabor amargo, astringencia, color, olor y estabilidad oxidativa a las plantas. Las principales fuentes dietéticas de los polifenoles son frutas y bebidas como el jugo, café, vino tinto y cocoa, aunque las verduras y cereales también contribuyen a consumo de polifenoles [1]. Existen más de 8000 moléculas identificadas como polifenoles y su ingestión se estima en hasta 1 g/día, que es ~10 veces más que el consumo de vitamina C y ~100 veces más que el de vitamina E y carotenoides [2].

2.1 POLIFENOLES

Los polifenoles se clasifican en ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y lignanos dependiendo del número de anillos fenol y el tipo de elementos estructurales que une estos anillos [3]. Los flavonoides son el grupo más abundante de polifenoles y su consumo se estima en 428 ± 49 mg/día [4]. Los flavonoides tienen una estructura química constituida por un esqueleto de 15 carbonos configurados en dos anillos fenol (A y B), unidos por tres carbonos que forman un heterociclo oxigenado (anillo C). Esta estructura puede ser abreviada como C6-C3-C6. La actividad biológica de los flavonoides varía de acuerdo al número de modificaciones y grupos funcionales en el anillo C, sub-dividiéndolos a su vez, en flavonoles, flavones, flavanoles, flavanones, antocianinas e isoflavonas (Figura 1). La unión de dos o más flavanoles entre el C4 y el C8 da origen a las procianidinas, también conocidas como taninos condensados. Las chalconas no se consideran flavonoides pero intervienen en su biosíntesis [5]. Los flavanoles son los polifenoles más abundantes en la cocoa.

Los flavanoles son los flavonoides que mejor se absorben porque son los únicos que no están unidos a azúcares, los flavonoides glucósidos se absorben más fácilmente después de transformarse en aglicón [6]. Otra diferencia entre flavanoles y el resto de flavonoides, es que los flavanoles no tienen doble enlace entre C2 y C3, tampoco tienen grupo carbonil en el C4 del anillo C. Estas características, aunado a la hidroxilación del C3, permite a los flavanoles tener dos centros quirales en la molécula (C2 y C3) y cuatro posibles diastereoisómeros (Figura 2). La configuración trans, da origen al monómero catequina y a los estereoisómeros [(+)-catequina, (-)-catequina], de la configuración cis, se origina el monómero epicatequina y los estereoisómeros [(+)-epicatequina,

(-)-epicatequina]. Los isómeros más abundantes en los alimentos son (+)-catequina y (-)-epicatequina [5]. De ellos, (-)-epicatequina es el isómero más estudiado pues se le atribuyen la mayor cantidad de efectos biológicos.

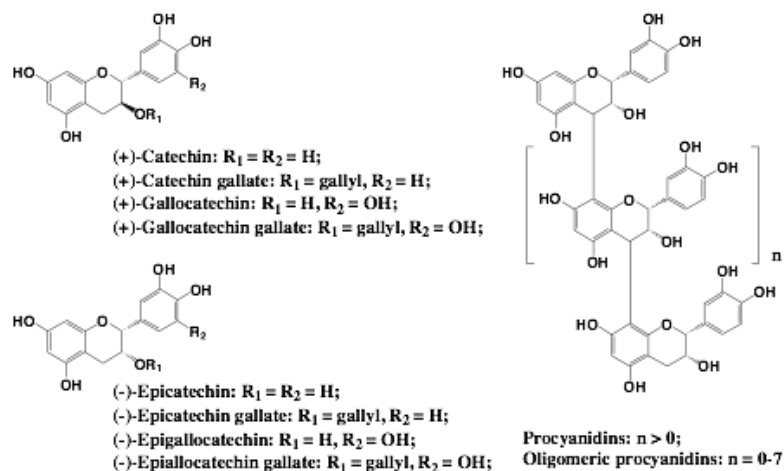


Figura 2: Estructura química de flavanoles

2.2 POLIFENOLES DE COCOA

Los polifenoles más abundantes en la cocoa son los flavanoles, también contiene procianidinas y antiocianinas aunque en menor proporción [7]. Los flavanoles se encuentran en la cáscara de uvas, manzanas, moras y té verde. El alimento que mayor concentración de flavanoles tiene con base a peso seco, es la cocoa [8].

2.2.1 ¿Qué es la cocoa?

La cocoa es un derivado del cacao (*Theobroma Cacao*), árbol originario de México y Centroamérica. El procesamiento del cacao da origen a dos productos principales; la cocoa que es la fracción hidrosoluble, y la manteca de cacao que es la fracción liposoluble. La variedad del árbol (criollo, forastero o trinitario) determina el tamaño de fruto (cacao), su sabor y contenido de polifenoles [9]. Las culturas meso-Americanas consumían el extracto del cacao en agua y la llamaban “bebida de los Dioses”, se le consideraba un alimento mágico y místico al que se le atribuían funciones curativas [10, 11]. Después de la Conquista, el cacao fue exportado a Europa para su industrialización y comercialización [10].

El cacao tiene apariencia de mazorca, la parte externa es fibrosa y recubre las semillas encontradas en el interior (Figura 3). Para la obtención de cocoa, es necesario someter las semillas a un proceso de fermentación enzimática que mejora las características organolépticas. Una vez fermentadas, las semillas se secan por exposición al sol o calor, se descascaran, se tuestan y se trituran para producir

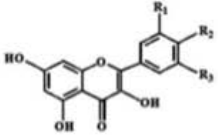
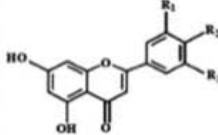
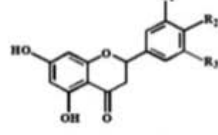
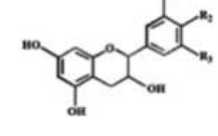
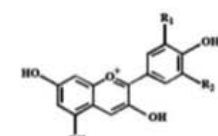
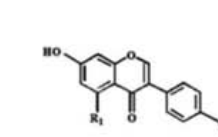
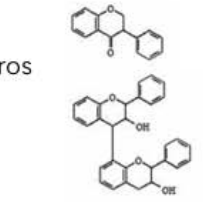
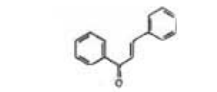
| Sub-clase de flavonoides | Estructura esquemática | Ejemplo de flavanoide | Fuente dietética |
|--|---|--|---|
| Flavonol |  | Quercetin, galangina, fisetina, miricetina | Cebolla, kale, brócoli, manzana, vino, té, moras. |
| Flavona |  | Apigeina, luteonina, tangeritina | Frutas cítricas, perejil, tomillo |
| Flavanona |  | Naringenina, esperetina | Frutas cítricas |
| Flavanol |  | Catequina, epicatequina | Cocoa, manzanas, te, vino tinto |
| Antocianina |  | Cianidina, pelargonidina, mavidina | Guindas, moras, uvas. |
| Isoflavona |  | Danidzeína, genisteína. | Soya, legumbres |
| Procianidina (dimeros, oligomeros y polímeros) |  | Epicatequina-(4β → 8) | Manzanas, uva, cocoa |
| Chalcona (no flavanoide) |  | Phloretina, floridzina | Manzanas |

Figura 1: Clasificación de flavonoides

el licor de cacao [12]. El licor de cacao contiene fracciones liposolubles e hidrosolubles. Los polifenoles del cacao se encuentran en la fracción hidrosoluble o cocoa, que es un polvo de color rojo oscuro. Aunado a los polifenoles, la cocoa contiene proteínas, hidratos de carbono, nutrimentos inorgánicos (Fe, Mg, K, P y Cu) y otros componentes bioactivos como teobromina y cafeína [7]. El procesamiento de las semillas del cacao disminuye la concentración de polifenoles hasta un 14% [9]. La mezcla de cocoa, manteca de cacao y otros componentes como azúcar y leche, da origen al chocolate. Mientras mayor sea la proporción de cocoa en el chocolate, mayor será su contenido de polifenoles (Tabla 1).



Figura 3: Fruto del cacao

Tabla 1: Contenido de polifenoles y capacidad antioxidante de productos de cocoa comercialmente disponibles.

| Tipo de producto | n | %SCNG | % grasa | ORAC (μmol de ET) | Polifenoles totales* | Epicatequina (mg/g) | Catequina mg/g |
|--------------------------------|---|------------|------------|----------------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------|
| Polvo de cocoa | 3 | 81.6 (8.2) | 15.0 (5.8) | 803.7 (78.2) | 52.4 (7.5) | 1.854 (0.849) | 0.578 (0.285) |
| Chocolate para cocinar | 4 | 47.5 (2.2) | 52.6 (0.7) | 456.8 (50.7) | 27.7 (1.3) | 1.142 (0.103) | 0.491 (0.222) |
| Chocolate oscuro | 3 | 23.4 (5.3) | 34.7 (5.5) | 198.0 (47.0) | 13.0 (1.7) | 0.336 (0.031) | 0.164 (0.064) |
| Chispas de chocolate semidulce | 3 | 16.9 (1.7) | 28.9 (1.0) | 180.3 (8.5) | 12.4 (0.6) | 0.483 (0.085) | 0.194 (0.071) |
| Chocolate con leche | 3 | 6.2 (1.2) | 32.6 (4.0) | 62.0 (17.6) | 4.4 (1.1) | 0.099 (0.067) | 0.043 (0.038) |
| Suero de chocolate | 3 | 6.2 (1.3) | 0.9 (0.3) | 63.4 (4.9) | 4.2 (0.6) | 0.074 (0.046) | 0.042 (0.015) |

Adaptado de Miller *et al.*

Los valores totales se presentan como media y desviación estándar

* Polifenoles totales se expresa como equivalentes de ácido galico

SCNG: Solidos de cocoa no grasos

2.2.2 Consumo

El consumo habitual de flavanoles varía por región geográfica. En Europa, la media de consumo se ha estimado en 75.12 mg/d por adulto, de los cuales 24 ± 2 mg/d son epicatequina. El consumo de flavanoles es más alto en los países del centro de Europa (99.5 mg/d; Irlanda, UK, Alemania y Países Bajos) que en los países del sur (35.2 mg/d; República Checa, Italia y España). Las principales fuentes de consumo de flavanoles en Europa son el té (62%), frutas (10.5%), las moras

(3.4%) y los derivados de cocoa (3.1%) [13]. En México, el consumo de flavanoles en mujeres adultas estimado a través de un cuestionario semi-cuantitativo fue de 10 mg/d [14].

2.2.3 Biodisponibilidad

Los efectos biológicos de los polifenoles de cocoa dependen de su biodisponibilidad. Los polifenoles de menor tamaño se absorben en intestino delgado, llegan a hígado vía vena porta y son expulsado a circulación sistémica como metabolitos de (-)-epicatequina relacionados estructuralmente. Los polifenoles de mayor tamaño (trímeros a decámeros), continúan su paso por el tracto digestivo y llegan a intestino grueso, en dónde interactúan con la microbiota colónica y se conjugan con γ -valerolactona, ácido γ -hidroxivalérico y derivados de ácidos hipúrico y fenólico, para ser reabsorbidos a circulación sistémica vía entero-hepática como metabolitos con fisión de anillo de 5 carbonos (5C-RFM, por sus siglas en inglés) (Figura 4 y 5). La interacción de los polifenoles con la microbiota aumenta la abundancia de bifidobacterias y lactobacilos, mientras que disminuye la cantidad de clostridium, lo cuál sugiere un efecto prebiótico [15]. La conjugación de los flavanoles aumenta su polaridad, modifica su función biológica y facilita su eliminación vía renal. Del total de (-)-epicatequina consumida vía oral, el $82 \pm 5\%$ se recupera en orina 48 horas después de su consumo y el $95 \pm 1\%$ se recupera en orina y heces [16].

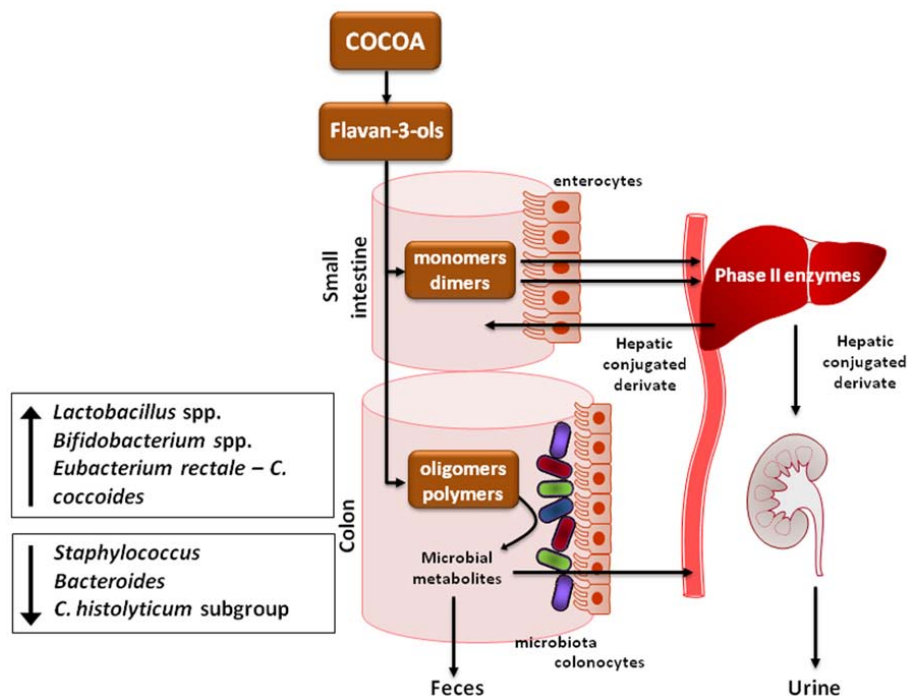


Figura 4: Metabolismo de flavanoles (flavan-3-oles)

Únicamente el 20±2% de la (-)-epicatequina consumida vía oral se absorbe en intestino delgado y es transportada a hígado vía porta (Figura 4). El metabolismo de la (-)-epicatequina se realiza en células intestinales y hepáticas a través de enzimas de fase II (UDP glucuronil transferasa, sulfotransferas y metiltransferasas). Una vez metabolizada, la (-)-epicatequina sale del hígado a circulación sistémica como metabolitos conjugados con grupos glucurónico, sulfato y metil. Estos cambios estructurales disminuyen la probabilidad de que los metabolitos sean reabsorbidos al interior de otras células. Por ende, se sugiere que los efectos biológicos de los polifenoles de la cocoa están mediados por interacciones directas entre los metabolitos circulantes y componentes de membrana plasmática [16]. Se desconoce el efecto que tienen los metabolitos de acuerdo al grupo de conjugación. Tampoco se sabe cómo se modifica el perfil de conjugación de acuerdo a la dosis de polifenoles consumida. Sin embargo, el consumo de dosis altas de polifenoles tiende a favorecer la proporción de metabolitos conjugados con grupos glucuronidos a expensas de sulfatos. El tipo de conjugación depende de la capacidad del tejido y la afinidad de la enzima por el sustrato. En este contexto, la afinidad de las sulfotransferas es mayor que la de la UDP glucuronil transferasa pero la disponibilidad del sustrato es limitante para la primera, el consumo elevado de catequina y epicatequina puede generar competencia enzimática y aumentar la proporción de metabolitos conjugados con grupos glucurónicos que con grupos sulfato [17].

2.2.4 Perfil metabólico

A la fecha, más de 20 metabolitos de epicatequina y catequina se han identificado en plasma y orina de humanos (Figura 5). La concentración de metabolitos relacionados estructuralmente con (-)-epicatequina derivados de metabolismo hepático es mayor que la de metabolitos con fisión de anillo de 5-carbonos derivados de metabolismo colónico. Los metabolitos relacionados estructuralmente con (-)-epicatequina se identifican en plasma 15 minutos después del consumo oral y alcanzan una concentración máxima (T_{max}) entre una y dos horas posterior a su consumo, dependiendo la matriz alimentaria. A las 6 horas, la concentración de metabolitos de (-)-epicatequina en plasma es cercana al basal. Los metabolitos con fisión de anillo de 5-carbonos son detectados en plasma 2 horas después del consumo oral y alcanzan su T_{max} a las 6 horas (Figura 5) [16]. La identificación y cuantificación de metabolitos de (-)-epicatequina en plasma puede variar dependiendo del método y los estándares de referencia utilizados (Tabla 2). El método más citado en la literatura es el de cromatografía líquida acoplada a masas/masas (HPLC-MS/MS) [16, 17].

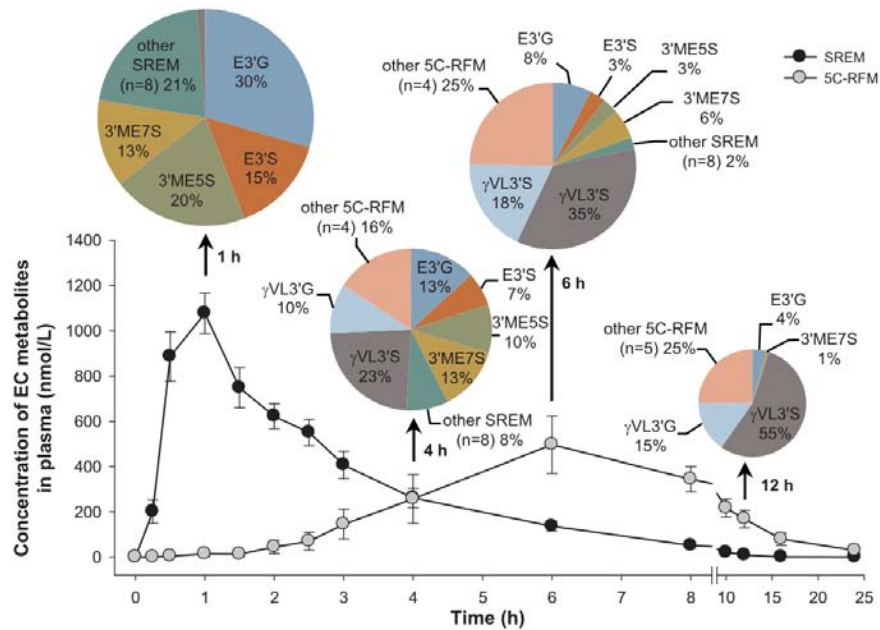


Figura 5: Concentración de metabolitos de (-)-epicatequina en plasma en función del tiempo. SREM: Metabolitos de (-)-epicatequina relacionados estructuralmente. 5C-RFM: Metabolitos con fisión de anillo de 5-carbonos. Los datos se expresan como valores de media en nM ± DE. Inserción: Gráficas de pastel representativas de la cantidad relativa (% del total) de SREM y 5C-RFM individuales presentes en plasma a 1h, 4h, 6h y 12 h después del consumo de EC marcada radioactivamente. Figura modificada con autorización de [16].

El perfil de metabolitos es diferente entre individuos. El vehículo de administración (cocoa, chocolate oscuro y epicatequina libre), la dosis de polifenoles consumida y el tiempo de determinación también influyen en el perfil metabólico (Tabla 2). En humanos, los cuatro metabolitos más abundantes (>80% de concentración total) posterior al consumo de cocoa [60 y 100 mg de (-)-epicatequina] fueron la (-)-epicatequina-3'-O-glucuronido (E3'G), (-)-epicatequina-3'-sulfato (E3'S), 3'-O-metil(-)-epicatequina-5-sulfato (3'ME5S) y 3'-O-metil(-)-epicatequina-7-sulfato (3'ME7S) [16, 18]. Ligeras diferencias se observaron posterior al consumo de chocolate oscuro [79 mg de (-)-epicatequina], en donde tres de los cuatro metabolitos más abundantes fueron los mismos (E3'G, E3'S y 3'ME5S) excepto por 3'-O-metil(-)-epicatequina-4-sulfato (3'ME4S) (Tabla 2) [17]. El consumir 100 mg de (-)-epicatequina aislada aumentó la conjugación de (-)-epicatequina con grupos glucurónidos (Tabla 2) [19].

El perfil de metabolitos no es igual en humanos y especies animales (roedores) (Figura 6). De los cuatro metabolitos de mayor abundancia en plasma humano, ninguno se identificó en ratas y únicamente dos (E3'S y ME5S) se identificaron en ratones aunque en menor concentración (≈25%) (Figura 6) [16]. Aunque no se ha evaluado el efecto biológico de cada metabolito, es probable que sus diferencias estructurales resulten en interacciones y efectos biológicos diferentes. La baja

equivalencia entre especies es un factor a considerar cuándo se busca establecer las dosis de bioseguridad y eficacia para el consumo de flavanoles, así para la extrapolación de resultados para tratar de elucidar el fenómeno humano. [16]. El metabolismo de (-)-epicatequina se evaluó *in vitro* en células de intestino (Caco-2), hígado (HepG2) y endotelio (HUVEC) incubadas a concentraciones de 0.1 μM , 1.0 μM y 10 μM . Únicamente las células Caco-2 formaron mínimas cantidades de E3G posterior a la estimulación con 1.0 μM y 10 μM de (-)-epicatequina. Ninguno de los metabolitos derivados de las células hepáticas y endoteliales coincidió con los identificados en plasma humano, sugiriendo que el modelo *in vitro* no refleja el metabolismo *in vivo* [18].

Tabla 2: Concentración de metabolitos de (-)-epicatequina posterior al consumo oral.

| Autor | Vehículo | Concentración de (-)-EC (mg/kg) | (-)-EC mg/70kg | Tmax (h) | Concentración en plasma (nM) | Proporción Glu:Sulf:Met (%) | Método de cuantificación |
|-------------------------|---------------------------|---------------------------------|----------------|----------|------------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| Actis-Goretta (2012) | Chocolate oscuro | 1.1 | 79 | 3 | 878 | 41:26:33 | UPLC- MS/MS |
| Ottaviani (2012) | Bebida de cocoa | 1.8 | 126 | 2 | 1245 | 47:32:21 | HPLC-MS/MS |
| Rodriguez-Mateos (2014) | Bebida alta en flavanoles | 1.4 | 98 | 1 | 1031 | 52:24:23 | HPLC-MS/MS |
| Barnett (2015) | Epicatequina | 1.4 | 100 | 2 | 1520 | 23:37:39 | HPLC/EC/HR/ESI-MS |
| Ottaviani (2016) | Bebida de cocoa | 0.9 | 60 | 1 | 1223 | 31:20:49 | HPLC-MS/MS |

EC: (-)-Epicatequina; Tmax: tiempo máximo requerido para alcanzar la concentración máxima; nM: nanomolar; Glu: Glucurónido; Sulf: Sulfato; Met: Metilo. HPLC/EC/HR/ESI-MS: High performance liquido chromatography / Electrochemistry / High resolution electrospray ionization mass spectrometry.

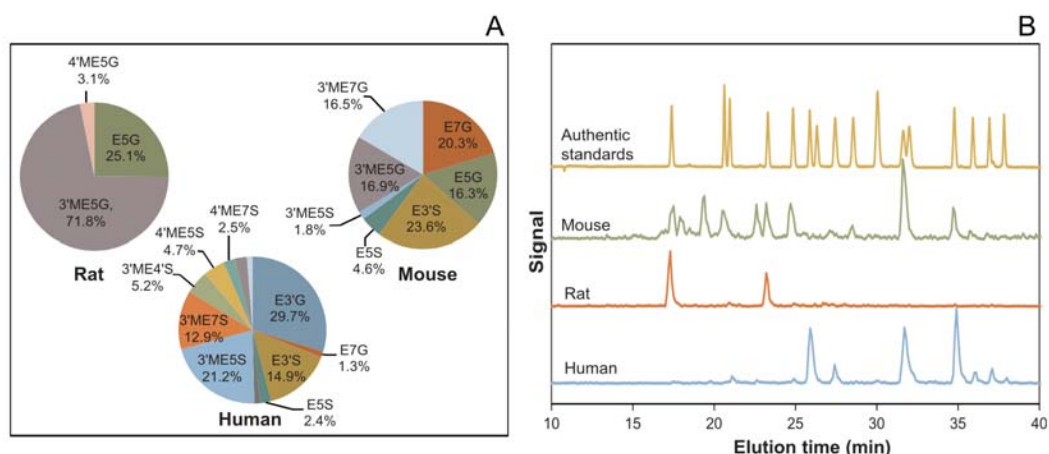


Figura 6: Diferencias en el perfil de metabolitos de (-)-epicatequina por especie. (A) Gráfica de pastel asociada a la abundancia relativa (% del total) de metabolitos de (-)-epicatequina individuales identificados en plasma 30 minutos (ratón y rata) y 1 h después (humano) del consumo de (-)-epicatequina marcada radiactivamente. (B) Cromatograma representativo de estándares auténticos (amarillo), metabolitos en ratón (verde), metabolitos en rata (rojo) y metabolitos en humano (azul).

2.3 EFECTOS BIOLÓGICOS DE LOS POLIFENOLES DE COCOA

En estudios epidemiológicos y experimentales en humanos se ha evaluado la asociación entre el consumo de polifenoles de cocoa y la modulación de variables clínicas asociadas a hipertensión arterial, dislipidemias, inflamación, resistencia a la insulina, reactividad vascular y estrés oxidante, entre otros [20-23]. Los mecanismos moleculares a través de los cuales los polifenoles de la cocoa ejercen dichos beneficios no se han descrito totalmente. Estudios recientes sugieren que los polifenoles de menor tamaño (catequina y epicatequina), atraviesan la membrana plasmática de células intestinales y hepáticas para ser metabolizados por enzimas de fase II en el citosol. Una vez conjugados, los metabolitos son expulsados al torrente sanguíneo y el cambio en su estructura química impide que vuelvan a atravesar la membrana plasmática [18]. La actividad biológica de los polifenoles está determinada, muy probablemente, por la interacción entre metabolitos y componentes de la membrana celular. Dichas interacciones determinan la transducción de señales implicadas en vías de respuesta antioxidante.

2.3.1 Evidencia observacional

La evidencia epidemiológica sugiere que el consumo de polifenoles disminuye la incidencia y prevalencia de patologías cardiovasculares, inflamación y tiene efecto sobre la respuesta cognoscitiva [24-26]. También se han reportado efectos asociados a la disminución del riesgo de desarrollar diabetes y morir por eventos cardiovasculares [27]. Uno de los primeros estudios epidemiológicos asociados al consumo de cocoa y protección cardiometabólica, fue el de los indígenas Kuna residentes de la isla Ailigandi de Panamá [28]. Los indígenas Kuna Ailigandi tienen las más bajas tasas de incidencia de hipertensión, diabetes, enfermedad cardiovascular y muerte asociadas a eventos cardiovasculares en el mundo. Sin embargo, los indígenas Ailigandi que migran a zonas urbanas o sub-urbanas de Panamá pierden estas características. Al evaluar los factores ambientales que podrían conferir protección cardiometabólica, se observó que los Kuna que viven en archipiélagos consumen hasta diez veces más bebidas de cocoa, cuatro veces la cantidad de pescado y dos veces la cantidad de fruta que los Kuna residentes de zonas urbanas. Este reporte puso de manifiesto el efecto cardioprotector del consumo de cocoa para su estudio posterior [29-31].

En 2006, se publicó el primer estudio de cohorte que evaluó el efecto del consumo de cocoa sobre variables cardiovasculares [32]. Este seguimiento de 15 años se realizó en 470 hombres holandeses sin enfermedad crónica diagnosticada al momento del estudio. Los voluntarios clasificados en el tercil más alto de consumo de cocoa (2.30 g/día) tuvieron niveles más bajos de presión arterial, menor riesgo de enfermedad cardiovascular y menor riesgo de mortalidad por cualquier causa, que los voluntarios clasificados en el tercil de menor consumo (0.36 g/día) [32]. Tres años después, se publicaron los resultados de una cohorte en pacientes suecos con infarto agudo al miocardio. Estos pacientes fueron seguidos durante 8.6 años y aquellos que informaron consumir chocolate dos o más veces por semana tuvieron 66% menos riesgo de sufrir muerte cardíaca que los que informaron que nunca consumieron chocolate [33]. En 2010 se publicaron los resultados del seguimiento durante 8 años de 19,357 voluntarios alemanes, encontrando que las personas en el cuartil de mayor de consumo de chocolate (7.5 g/día) tuvieron 39% menos riesgo de infarto al miocardio que las personas en el cuartil más bajo [27].

En otros estudios observacionales se ha descrito que las personas que consumen ≥ 20 g de chocolate oscuro cada tercer día, tienen niveles 26% más bajos de proteína C-reactiva que las personas que no consumen chocolate [34]. En población Japonesa, el riesgo de desarrollar diabetes fue 35% menor en los hombres que consumían “refrigerios de chocolate” una vez por semana que en los que nunca o casi nunca consumían chocolate [35]. Los adultos mayores que gustan de comer chocolate informaron menos sentimientos de soledad o depresión que los que preferían comer otros dulces [36]. Por último, individuos que informaron consumir chocolate dos o más veces por semana fueron 32% menos propensos a desarrollar placa aterosclerótica calcificada en arterias coronarias que los individuos que reportaron nunca consumir chocolate [37].

2.3.2 Evidencia experimental

La evidencia experimental en relación al efecto que tiene el consumo de polifenoles de cocoa es amplia, especialmente en áreas asociadas a sistema cardiovascular, resistencia a la insulina, sistema inmune y sistema nervioso central. [38].

2.3.2.1 Evidencia experimental en humanos

El efecto del consumo de polifenoles de cocoa ha sido evaluada a través de ensayos clínicos de corta y larga duración en individuos sanos y enfermos. La dosis de polifenoles administrada oscila entre los 166 a 2110 mg/d y el periodo de intervención varía de 2 a 52 semanas [39]. A pesar de que los estudios a largo plazo son todavía escasos, los hallazgos sugieren beneficios en marcadores cardiometabólicos de sensibilidad a la insulina [40], aumento en los niveles de colesterol de alta densidad (HDL) [41], disminución de los niveles de triglicéridos (TG) [42, 43] y proteína C reactiva (CRP, por sus siglas en inglés) [44]. También se ha demostrado que el consumo de polifenoles de cocoa disminuye los niveles de presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) en adultos sanos (PAS: 107.5 ± 8.6 vs 113.9 ± 8.4 mmHg) [45]; en pacientes hipertensos con y sin intolerancia a la glucosa (SBP: -4.52 ± 3.94 mmHg; DBP, -4.17 ± 3.29 mmHg y PAS: -11.9 ± 7.7 mmHg; PAD: -8.5 ± 5.0 mmHg, respectivamente) [46]; y se ha asociado a la disminución en el riesgo de desarrollar preclampsia en el primer (OR=0.55, IC_{95%}= 0.32–0.95) y tercer trimestre del embarazo (OR=0.56; IC_{95%}=0.32–0.97) [47]. La disminución de los niveles de presión arterial correlacionan de forma inversa con el aumento en los niveles de óxido nítrico (NO) en plasma y con el aumento en la dilatación mediada por flujo secundaria al consumo de cocoa (PAS $r=-0.547$; PAD $r=-0.488$) [20, 48, 49]. La magnitud de estos efecto es mayor en estudios de corta duración y tiene un comportamiento dosis-respuesta mediado por mecanismos no inflamatorios (vasodilatación, perfil lipídico, resistencia a la insulina) [50, 51].

El efecto de los polifenoles de cocoa sobre mecanismos antiinflamatorios en humanos es escasa. La evidencia proviene principalmente de evaluaciones en células circulantes [52], en donde se observó una disminución en la expresión de biomarcadores inflamatorios como P-selectina y molécula de adhesión intracelular-1 (ICAM-1) posterior a la suplementación con 40 g de cocoa [46.8 mg de (-)-epicatequina] durante cuatro semanas en pacientes con riesgo cardiovascular [52]. En la superficie de monocitos, se observó una disminución en la expresión de moléculas de adhesión VLA-4 (25.17 vs 22.96), CD40 (24.53 vs 23.31) y CD36 (26.01 vs 22.61) que no se observó en la superficie de linfocitos T [53]. La interacción entre monocitos y linfocitos T en el endotelio está mediado por moléculas de adhesión y es el primer evento en la formación de la placa de ateroma. Por ello, se ha propuesto que el consumo de cocoa es capaz de modular fases iniciales del proceso de aterosclerosis en células mononucleares (PBMCs, por sus siglas en inglés) de individuos en riesgo aunque estos resultados son inconsistentes en personas sanas [54, 55]. Los efectos antiinflamatorios

de los polifenoles de cocoa también podrían estar mediados por el factor de transcripción nuclear kappa B (NF-kB), cuya activación disminuyó posterior al consumo agudo (6h) de 40g de cocoa en leucocitos de individuos sanos [-28.8% (95%CI: -157.9% a -25.9%)]. En este estudio también se observó una disminución en la concentración de ICAM-1 [-12.18% (95%CI: -2.14% a -22.21%)] y E-selectina [-8.47% (95%CI: -1.01% a -15.93%)] posterior al consumo de cocoa [52]. Al parecer, el consumo de cocoa contribuye a la inhibición o resolución de la respuesta inflamatoria al modular la activación endotelial en individuos sanos y enfermos.

2.3.2.2 Evidencia experimental en modelos animales y cultivo celular

El efecto antioxidante, inmunomodulador y cardioprotector de la cocoa, así como el efecto sobre el metabolismo de hidratos de carbono, cáncer, resistencia a la insulina y actividad cognitiva ha sido evaluado en modelos animales [56-58]. Los mecanismos moleculares adyacentes a los efectos antes mencionados han sido estudiados en cultivo utilizando diferentes líneas celulares incubadas con extracto de cocoa o polifenoles aislados (monómero a decámero) [59-61].

En ratas, el consumo de una dieta suplementada con 10% cocoa durante tres semanas incrementó la capacidad antioxidante en plasma, en hígado y en órganos del sistema linfático como el timo, influenciado la diferenciación de los timocitos y promoviendo la expresión dosis dependiente de las enzimas antioxidantes catalasa y superóxido dismutasa (sod) [62]. En el bazo de ratas jóvenes, la suplementación 10% cocoa moduló la respuesta inmune al disminuir la secreción de Ig y moléculas inflamatorias TNF- α y proteína quimioatrayente de monocitos-1 en macrófagos, así como la producción de citocinas en células cooperadoras 2 (Th2, por sus siglas en inglés) [63]. En ratas con inflamación crónica (artritis por adyuvante), el consumo durante diez días de una dieta suplementada con 5% cocoa y quercetin fue capaz de modular el estrés oxidante al disminuir la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y normalizar la actividad de las enzimas antioxidantes sod y catalasa [64]. En tejido linfático asociado a intestino, el consumo de cocoa moduló la respuesta inmune al disminuir la secreción de IgA y aumentar la proporción de células gamma/delta con receptor de antígeno de linfocitos T [65].

En modelos *ex vivo* de inflamación inducida, la incubación de linfocitos, PBMCs y leucocitos con polifenoles de cocoa, particularmente epicatequina, suprimieron la expresión de moléculas citocinas

pro-inflamatorias como interleucina-8 (IL-8), interleucina-6 (IL-6), interleucina-2 (IL-2), y aumentaron la expresión de citocinas anti-inflamatorias interleucina-10 (IL-10) e interleucina-4 (IL-4), la cual promueve la diferenciación de Th0 a Th2 [59, 66, 67]. La activación de células Th es uno de los primeros eventos en la respuesta adaptativa del organismo previamente asociada al consumo de cocoa en modelos animales [26]. Esta activación surge de la unión antígeno-receptor en las células T, y de la co-estimulación de moléculas secundarias a la producción de la citoquina inflamatoria IL-2. Las PBMCs extraídas de voluntarios sanos, activadas con fitohemaglutinina (PHA, por sus siglas en inglés) e incubadas con epicatequina, catequina y polifenoles de mayor tamaño a concentraciones superiores a las farmacológicas (10 μ M), aumentaron la producción de moléculas inflamatorias TNF- α , IL-1 β e IL-6 [59, 60]. El TNF- α es una citoquina proinflamatoria multifuncional que pertenece a la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF) y que promueve la activación del factor de transcripción nuclear kappa B (NF- κ B) [68].

In vitro, los polifenoles de cocoa son antioxidantes capaces de modular la respuesta inflamatoria. El estrés y la inflamación son condiciones que contribuyen a la etiología y desarrollo de múltiples patologías y se caracterizan por aumentar la producción de ROS a través de procesos orquestados por la expresión de citocinas, quimiocinas y moléculas inflamatorias, entre otros (69). En este sentido, macrófagos incubados con un extracto de flavonoides y expuestos a 12-miristato 13-acetato (PMA) disminuyeron la respuesta inflamatoria al inhibir hasta en un 75% la expresión de IL-2 y hasta en un 50% la su receptor alfa (IL2R α o CD25), además de aumentar hasta 4.5 la expresión de IL-4 [69]. En células T Jurkat activadas con PMA y pre-tratadas con epicatequina, catequina y fracciones diméricas, se inhibió la unión de NF- κ B a los sitios de reconocimiento en la cadena de ADN con la subsecuente transactivación de IL-2. NF- κ B es un factor de transcripción inducido por TNF- α y su expresión promueve la transcripción de genes que codifican para citocinas inflamatorias (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α , etc.), moléculas de adhesión (moléculas de adhesión intracelular-1, moléculas de adhesión de células vasculares-1, moléculas de adhesión de leucocitos endoteliales-1), proteínas de fase aguda, enzimas inducibles [sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS), ciclooxigenasa 2 (COX-2)], etc [70]. La inhibición de NF- κ B por polifenoles de cocoa puede ocurrir en diferentes etapas; de forma temprana al regular los niveles de oxidación y activación de IKK, o de forma tardía al inhibir la unión de NF κ B al DNA [68].

Aunque el mecanismo de acción de la epicatequina y el resto de los polifenoles de cocoa no está completamente descrito, sus efectos convergen en vías asociadas a la proteincinasa activada por mitógeno (MAPK), la cinasa de Janus en la vía de transductor de señales y activador de la transcripción (JAK-STAT), así como la vía de fosfatidil inositol cinasa-3 (PI3K)/Akt [26, 71]. Estas vías median procesos biológicos que involucran el crecimiento y diferenciación celular, la respuesta antioxidante y la respuesta inflamatoria [70]. Otros mecanismos de acción propuestos son la modulación de concentración de calcio intracelular [71] y la inhibición de la NADPH oxidasa [72]. Como se mencionó anteriormente, los resultados de modelos *in vitro* o *ex vivo* no son totalmente extrapolables al modelo *in vivo*, los resultados de informes previos parecieran ser concordantes.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El efecto que tiene el consumo de polifenoles cocoa ha sido evaluado en fenotipos asociados a salud cardiovascular, modulación del sistema inmune e inflamación pero los mecanismos moleculares subyacentes a dichos efectos aún están poco descritos. Los resultados de estudios *in vitro* sugieren que los polifenoles de cocoa exhiben capacidad antioxidante y son capaces de modular la expresión de factores de transcripción, citocinas inflamatorias, moléculas de adhesión celular, y otras moléculas de respuesta inflamatoria. Los resultados de estos estudios concuerdan con los observados en ensayos *ex vivo* y en modelos animales, por lo que se ha propuesto que los efectos de los polifenoles de cocoa en la salud humana deriva de su capacidad antioxidante. Sin embargo, los resultados de estos estudios no son completamente extrapolares al fenómeno humano debido a las diferencias en vehículos utilizados, dosis administradas y las discrepancias en el perfil de metabolitos entre especies.

In vitro, los linajes celulares son frecuentemente incubados con fracciones de polifenoles aislados en su forma natural (aglicón), a dosis que superan las alcanzables a través de la dieta, mientras que en plasma humano la abundancia de aglicones es prácticamente nula. Esto se debe a que los polifenoles son metabolizados durante su paso por el tracto gastrointestinal y las formas presentes en plasma son metabolitos conjugados con grupos glucuronido, sulfato y metilo, no aglicones. El metabolismo de los aglicones se lleva a cabo en el interior de la célula, una vez metabolizados, los metabolitos son expulsados al torrente sanguíneo y las modificaciones en su estructura química derivadas de la conjugación impide que puedan volver a atravesar la membrana plasmática. Por ende, es factible pensar que los aglicones ejercen efectos intracelulares mientras que las funciones de los metabolitos están limitadas a interacciones con componentes de la membrana extracelular y la subsecuente modulación de señales de transducción.

El metabolismo de los aglicones en modelos animales es similar al humano, sin embargo, el perfil de metabolitos no es equivalente entre especies. De los cuatro metabolitos de mayor abundancia en plasma humano, ninguno se identificó en ratas y únicamente dos se identificaron en ratones aunque en menor concentración. Las discrepancias en el perfil de conjugación de los metabolitos puede

resultar en diferentes interacciones con proteínas objetivo, y por lo tanto, en diversos efectos biológicos.

El perfil de metabolitos posterior al consumo de chocolate, cocoa y epicatequina aislada ha sido caracterizado en un pequeño número de estudios en humanos con variaciones en los resultados atribuidas a diferencias en el vehículo, la dosis, los métodos de identificación y las condiciones basales de los sujetos de estudio. La presencia de los metabolitos en plasma humano ha sido asociada a modulación de vías implicadas en la respuesta antioxidante e inflamación *in vitro* y en modelos animales. Este efecto no ha sido descrito en humanos. Sin embargo, estudios realizados con otros flavonoides en células circulantes sugieren que son capaces de modular el nivel de transcripción de moléculas asociadas a respuesta inflamatoria, factores de transcripción y moléculas de adhesión celular de individuos sanos. Por ello, nos preguntamos, ¿cuál es el efecto que tiene el consumo de un concentrado de cocoa de alto contenido en polifenoles sobre la expresión de genes en células mononucleares de sangre periférica? Para tratar de contestar a la pregunta de investigación, se llevó a cabo un ensayo clínico cruzado para evaluar el efecto del consumo de una dosis única de un concentrado de cocoa de alto contenido en polifenoles, y paralelo para evaluar el consumo diario durante cuatro semanas, en individuos aparentemente sanos. Los sujetos incluidos en el estudio consumieron los tratamientos de forma aleatoria. Los voluntarios, investigadores y analistas estuvieron cegados durante todo el estudio.

4. HIPÓTESIS

El consumo de un concentrado de cocoa de alto contenido en polifenoles modulará la expresión de genes asociados a respuesta antioxidante e inflamación en células circulantes de individuos aparentemente sanos.

5. OBJETIVO

Evaluar el efecto que tiene el consumo de un concentrado de cocoa de alto contenido en polifenoles sobre el cambio en el nivel de transcripción de PBMCs en individuos aparentemente sanos.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar el cambio en la expresión de un gen objetivo posterior al consumo agudo (dosis única) y consumo crónico (28 días) de un concentrado de cocoa.
- de alto contenido en polifenoles en individuos aparentemente sanos.
- Verificar la biodisponibilidad del producto de intervención a través de la identificación de metabolitos derivados del consumo agudo y crónico de un concentrado de cocoa de alto contenido en polifenoles y placebo.
- Analizar el cambio en la capacidad antioxidante del plasma posterior al consumo agudo y crónico de un concentrado de cocoa de alto contenido en polifenoles y compararlo con el cambio producido por el consumo de placebo.
- Contrastar el efecto agudo (2 h) que tiene el consumo de un concentrado de cocoa de alto contenido en polifenoles y placebo sobre el cambio en la expresión de genes de PBMCs en el mismo individuo a través de un diseño cruzado.
- Identificar las vías funcionales asociadas a los genes diferencialmente expresados posterior al consumo de un concentrado de cocoa y placebo.

6. METODOLOGÍA

6.1 DISEÑO DE ESTUDIO

Se llevó a cabo un ensayo clínico cruzado para el consumo de una sola toma (referido subsecuentemente como fase aguda) y paralelo para el consumo diario durante cuatro semanas (referido subsecuentemente como fase crónica), aleatorizado, cegado, con grupo control en individuos aparentemente sanos (Figura 7). El estudio se realizó de acuerdo a los principios establecidos en las Buenas Prácticas Clínicas, fue registrado como ensayo clínico en la Comisión Federal Contra Riesgos Sanitarios en concordancia con las normas de regulación federal (número de registro: 133300CT190199) y cuenta con aprobación del Comité de Ética del Instituto Nacional de Medicina Genómica. La recolección de muestras biológicas se llevó a cabo en la Clínica de Nutrición de la Universidad Iberoamericana en la Ciudad de México. Todos los participantes fueron informados sobre los objetivos y procedimientos del estudio, y se les entregó una copia del consentimiento informado escrito (ANEXO 1).

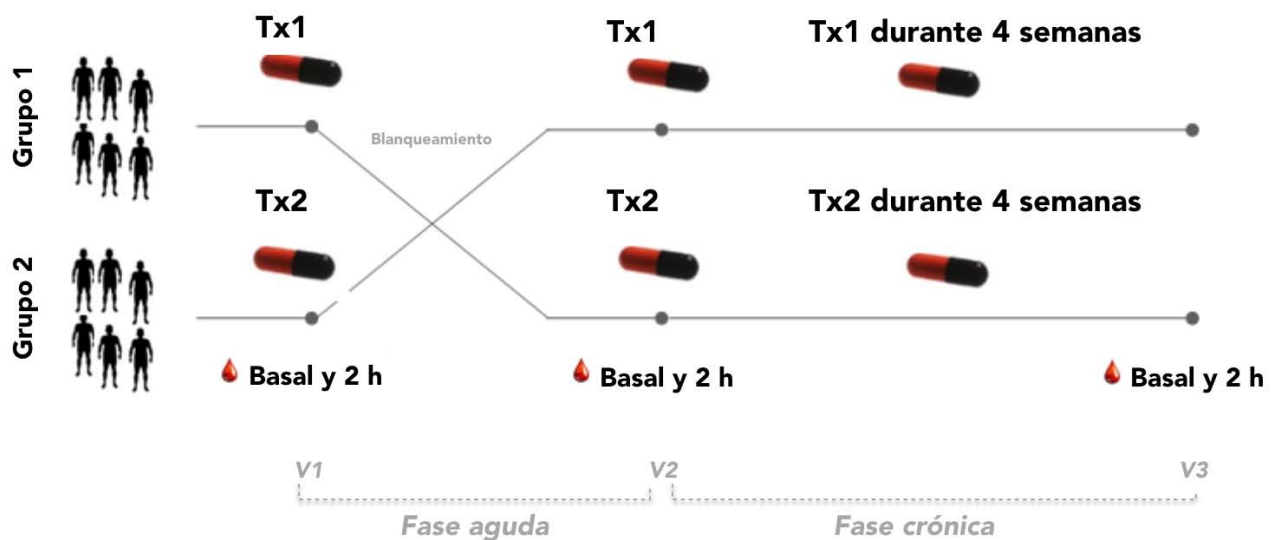


Fig. 7 Diseño de estudio. Ensayo clínico cruzado para fase aguda y paralelo para fase crónica, controlado con placebo, doble ciego. Los participantes asignados al Grupo 1 consumieron los tratamientos en una secuencia cocoa-placebo, mientras que los participantes asignados al Grupo 2 lo hicieron en la secuencia opuesta (placebo-cocoa). Durante todo el estudio se tomaron seis muestras de sangre de los participantes; tres en estado basal y tres muestras 2 h después del consumo de los tratamientos.

6.2 SUJETOS DE ESTUDIO

6.2.1 Criterios de inclusión:

Sujetos entre 18-40 años de edad que tuvieran un índice de masa corporal (IMC) de entre 18.5 y 30 kg/m², no fumadores, sedentarios o que realizaran actividad física moderada de acuerdo al Cuestionario Internacional de Actividad Física (IPAQ) [73]. La dieta no se modificó durante el estudio pero se instruyó a los voluntarios de no consumir alimentos ricos en polifenoles como el vino tinto, el té verde y productos derivados de cocoa al menos 24 horas previas al estudio.

6.2.2 Criterios de exclusión:

Se excluyeron todos aquellos sujetos que tuvieran alguna enfermedad diagnosticada al momento del estudio y a los que hubieran consumido suplementos, antioxidantes o medicamentos al menos un mes del inicio del estudio.

6.2.3 Criterios de eliminación:

Se eliminaron las personas que tuvieran muestras o datos incompletos, así como a los que quisieran declinar su participación durante el estudio.

6.3 INTERVENCIÓN

La intervención consistió en el consumo agudo y crónico de un concentrado de cocoa de alto contenido en polifenoles (referida subsecuentemente como cocoa) y maltodextrinas como tratamiento control (referida subsecuentemente como placebo). La dosis y el tiempo de recolección de muestras se definieron de acuerdo a estudios previos que sugieren un pico máximo de concentración de los metabolitos en plasma 2 h después del consumo de 390-746 mg de polifenoles al día, de los cuales entre 60-203 mg fueron de (-)-epicatequina [16-18]. Todos los participantes incluidos en el estudio fueron asignados aleatoriamente al Grupo-1 o Grupo-2. El Grupo-1 consumió los tratamientos en una secuencia Tx1-Tx2 y el Grupo-2 lo hizo en el orden opuesto (Figura 7). Los códigos de los tratamientos permanecieron cegados hasta el final del análisis estadístico. Los participantes fueron citados en tres ocasiones a la Clínica de Nutrición de la Universidad Iberoamericana. La primera (V1) y la segunda visita (V2) se hicieron con una semana de separación (periodo de blanqueamiento) y consistieron en mediciones agudas (basal y 2 h). Durante la segunda visita se entregó a los partici-

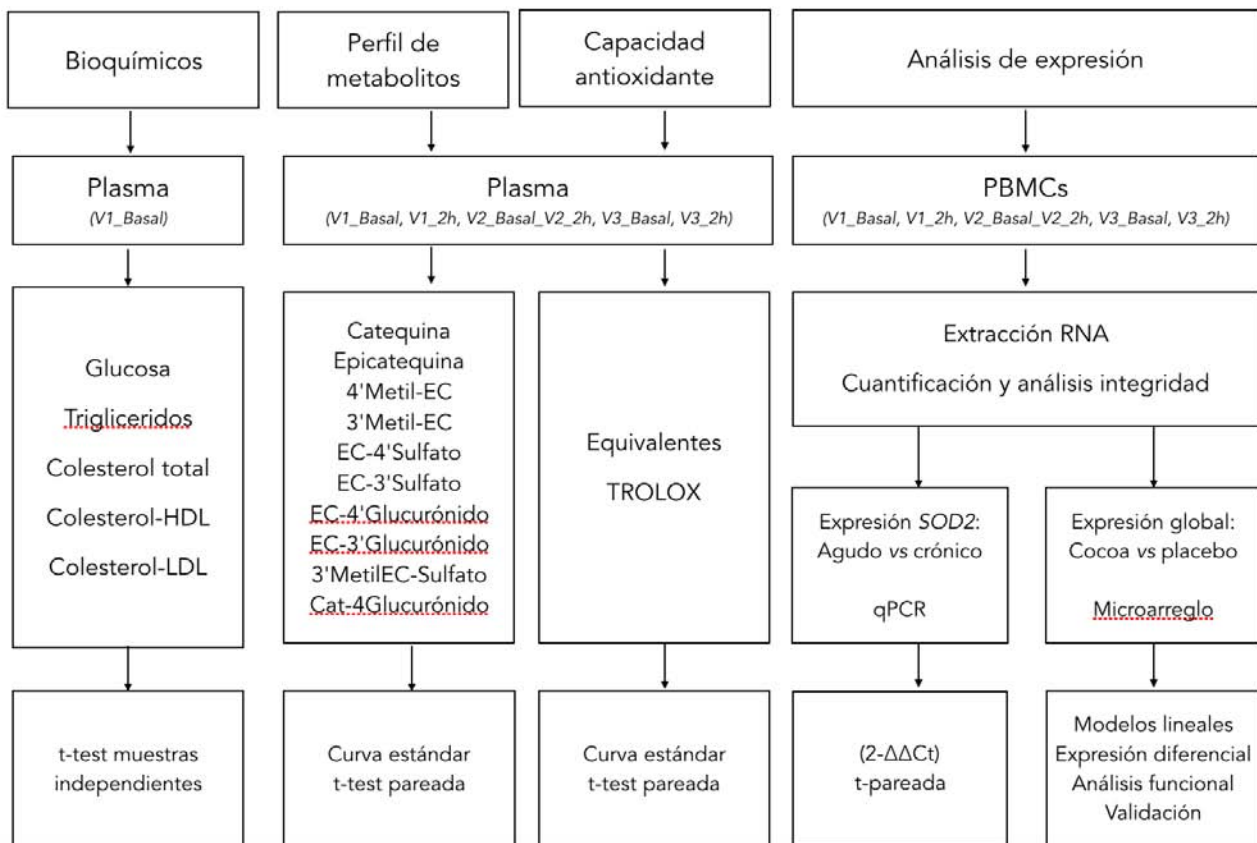


Fig. 8 Manejo de muestras biológicas y análisis en laboratorio.

pantes un diario de consumo (ANEXO 2) y un frasco con cápsulas suficientes para consumir una dosis diaria durante 28±3 días.

Al término de este tiempo se citó a los participantes por tercera ocasión (V3) para llevar a cabo la medición crónica (Figura 8). El apego al tratamiento se evaluó a través del diario de consumo y del conteo de cápsulas sobrantes, mismas que fueron entregadas por todos los participantes en la tercer visita. El consumo de alimentos previo a la intervención se evaluó a través de un recordatorio de 24 horas (R24H) (ANEXO 3) y un cuestionario de frecuencia de consumo validado en población mexicana (SNUT) (ANEXO 4). El nivel de actividad física se evaluó a través del Cuestionario Internacional de Actividad Física (IPAQ) validado en población mexicana (ANEXO 5). Las mediciones antropométricas (peso, altura y circunferencia de cintura) se hicieron siguiendo la técnica de Lohman et al. [74]. Los análisis basales de composición corporal (masa grasa, masa muscular, agua corporal) se realizaron utilizando el equipo de bioimpedancia InBody 250. Las muestras de sangre se obtuvieron en condiciones de ayuno de ocho horas y dos horas después del consumo de los tratamientos en la V1, V2 y V3. Durante este tiempo no se permitió el consumo de alimentos o bebidas azucaradas a los participantes, únicamente agua. Los análisis de expresión de genes se realizaron en PBMCs

aisladas a partir de 8 mL de sangre utilizando tubos con citrato de sodio (Cell Preparation Tubes, Cat. 362761, BD, Franklin Lakes, USA). Estos análisis se hicieron se realizaron con dos objetivos. En el primero fue comparar el cambio en la expresión de un gen objetivo, en este caso SOD2, posterior al consumo agudo y crónico de los tratamientos. El segundo objetivo fue evaluar el cambio en el perfil expresión individual, posterior al consumo agudo (2 h) de un concentrado de cocoa y placebo. La cuantificación de metabolitos y las determinaciones de capacidad antioxidante se hicieron en plasma extraído en tubos con heparina de litio de 6 mL (Ref. 367884, BD, Franklin Lakes, USA). Las determinaciones bioquímicas se realizaron en plasma extraído de tubos EDTA de 6 mL (BD, Franklin Lakes, USA) (Figura 8).

6.4 PRODUCTO DE ESTUDIO

La cocoa y el placebo fueron administrados en cápsulas de apariencia idéntica. Las cápsulas de cocoa contenían aproximadamente ~1.3 g de un producto de cocoa de alto contenido en polifenoles comercialmente disponible y distribuido por la compañía Naturex™. La cocoa tenía un color rojo oscuro y contenía ~50% de polifenoles de los cuáles ~94 mg eran (-)-epicatequina. Además de polifenoles, la cocoa contenía alcaloides (cafeína y teobromina), minerales y otros componentes (Tabla 3). Las cápsulas de placebo contenían ~1.3 g de un polisacárido parcialmente hidrolizado (malto-dextrina) distribuido por la misma compañía. Los análisis bromatológicos de ambos productos fueron realizados y cedidos por Naturex™.

6.5 RUTA DE ADMINISTRACIÓN

El producto fue consumido por vía oral con agua.

6.6 CEGAMIENTO

El Laboratorio de Farmacia de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de México fue el responsable de encapsular el producto y llevar a cabo el cegamiento del mismo mediante la asignación de doble códigos; T1 o “yellow” y Tx2 u “orange”. La aleatorización se hizo por bloques de cuatro.

6.7 TAMAÑO DE MUESTRA

El tamaño de la muestra se calculó en el programa G*Power utilizando una fórmula para diferencia entre dos medias dependientes [75]. Los datos que alimentaron la fórmula fueron obtenidos de un estudio previo realizado en nuestro laboratorio que identificó un tamaño del efecto moderado (delta de Cohen $d=0.6$) sobre el cambio en la expresión de genes en PBMCs posterior al consumo de una dosis única de cocoa (datos no publicados). Una muestra total de 20 participantes fue suficiente para un poder del 80% y una confianza de $\alpha < 0.05$.

Tabla 3 Caracterización del polvo de cocoa rico en polifenoles

| Compuesto | mg/g |
|---------------------------------------|-------------|
| Contenido de polifenoles ¹ | 500 |
| Epicatequina | 78 |
| Flavanoles totales ² | 200 |
| Flavan-3-ols ³ | 100 |
| Teobromina | 50 |

Los valores están determinados en mg/g de polvo de cocoa. Las determinaciones se llevaron a cabo como: ¹Folin-Ciocalteu como catequina; como catequina; ²como catequina, epicatequina, B1 y B2.

7. MÉTODOS

7.1 CUANTIFICACIÓN DE METABOLITOS DE EPICATEQUINA EN PLASMA

La identificación y cuantificación de los metabolitos de (-)-epicatequina en muestras de plasma se realizó a través de cromatografía líquida acoplada a masas/masas (UHPLC-MS/MS) en el Laboratorio de Vitaminas y Fitoquímicos del Instituto de Investigación de Nestlé, Suiza. El método se realizó siguiendo las instrucciones describas por Actis-Goretta et al. [17]. Brevemente, el plasma se obtuvo a partir de la centrifugación de un tubo de 6 mL de sangre total con heparina de litio a 1500 x g durante 10 min a 10°C. Para su estabilización, se agregaron 20 µL de amortiguador (ácido ascórbico, 1.136 M, EDTA 3.43 mM, pH=3.6) por cada mL de plasma recolectado, el cual se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C hasta su cuantificación. Posteriormente, el plasma se descongeló en hielo durante tres horas y se homogeneizo por inversión. Las proteínas y fosfolipidos se removieron al transferir 200 µL de plasma a una placa Ostro de 96-pozos (Ref. 186005518, Waters, Baden, Switzerland) y mezclar con 600 µL de acetonitrilo para finalmente filtrar durante 5 minutos utilizando vacío (Ref. 186001831, Switzerland). La muestra de plasma filtrada se recolectó en una segunda placa de 96-pozos (Waters, Ref. WAT058957, Baden, Switzerland) a la que se le agregaron 200 µL de metanol para concluir el procedimiento de limpieza. Después, la muestra se secó utilizando nitrógeno a temperatura ambiente y se almacenó a -20 °C hasta su posterior análisis. La muestra seca se resuspendió en 100 µL de agua con acetonitrilo al 8% y se inyectaron 5 µL en el sistema de UHPLC-MS/MS (Waters Acquity hyphenated to an AB Sciex QTRAP5500, operado en electrospray modo ionización negativa) para la detección y cuantificación de los metabolitos de (-)-epicatequina. La cuantificación de los metabolitos se llevó a cabo por curvas de calibración construidas con ocho estándares (10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000 nM). Tres estándares internos (umbeliferol sulfato, umbeliferol glucuronido y (+)-metilcatequina) se agregaron a las muestras de plasma al principio de la preparación para asegurar la exactitud de la cuantificación. Los metabolitos de (-)-epicatequina y los estándares internos fueron un regalo del Dr. Lucas Actis Goretta, del Centro de Investigación de Nestlé (NRC, Lausanne, Switzerland). Los metabolitos identificados y cuantificados fueron (-)-epicatequina (EC), (+)-catequina (cat), (-)-epicatequina-3'-O-glucuronido (E3'G), (-)-epicatequina-4'-O-glucuronido (E4'G), (+)-catequina-4'-O-glucuronido (C4'G), (-)-epicatequina-3'-O-sulfato (E3'S), (-)-epicatequina-4'-O-sulfato (E4'S), (-)-3'-O-metilepicatequina-4'-sulfato (3'ME4S), (-)-4'-O-metilepicatequina (4'ME) and (-)-3'-O-

metilepicatequina (3'ME). Todas las muestras se procesaron en duplicado y se analizaron utilizando el programa Analyst, versión 1.6.

7.2 CUANTIFICACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL PLASMA

Las muestras de plasma se obtuvieron por centrifugación (1500 x g durante 10 min a temperatura ambiente) de 6 mL de sangre total colectada en tubos con heparina de sodio. El plasma se analizó con el Antioxidant Assay Kit de Sigma-Aldrich siguiendo las instrucciones del fabricante. El método estima la capacidad antioxidante del plasma a través de la formación del radical ferril-mioglobina a partir de metmioglobina y peróxido de hidrógeno, que oxida el ABTS para producir el ion radical ABTS^{•+}, un cromógeno de color verde que se puede determinar por espectrofotometría a 405 nm. Los antioxidantes suprimen la producción del ion radical de manera dependiente a la concentración, y la intensidad del color decrece proporcionalmente. TroloxTM, un análogo de vitamina E soluble en agua, sirve como estándar o control antioxidante. La cuantificación de la capacidad antioxidante se hizo a través de curvas de calibración construidas con seis estándares (0, 0.015, 0.045, 0.105, 0.21, 0.42 mM) y se utilizó TroloxTM (análogo de vitamina E soluble en agua) como control antioxidante. Todas las muestras se procesaron en duplicado.

7.3 PREPARACIÓN DE RNA

El RNA se extrajo de PBMCs. Las PBMCs se aislaron con tubos de preparación celular siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA se extrajo utilizando el método del TRIzol (Ambion, Carlsbad, CA, USA) y se eluyó en 40 µl de agua libre de RNasa. La cuantificación e integridad del RNA se evaluó con el bioanalizador 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA).

7.4 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN

El cambio en la expresión génica aguda y crónica de SOD2 se evaluó a través de qPCR en tiempo real. El cambio agudo en el perfil de expresión global posterior al consumo de cocoa y placebo se evaluó a través de microarreglos.

7.4.1 Expresión de SOD2

El efecto del consumo agudo de los tratamientos sobre la expresión de SOD2 se estimó en muestras colectadas en condición basal vs 2h, en la V1 y la V2. El efecto del consumo agudo de los trata-

mientos sobre la expresión de SOD2 se evaluó en la muestra basal de la V2 vs la muestra basal de la V3. El análisis de SOD2 se realizó aquellos participantes que tuvieron: i. muestras completas (n=6; dos tratamientos bajo condiciones basales y 2 h después en la V1, V2 y V3), ii. RNA integro en las cuatro muestras (RIN >8), y iii. concentración suficiente de RNA en las seis muestras (>500 µg). El nivel de expresión se determinó a través de qPCR en tiempo real utilizando el equipo Quantum (Applied Biosystems). La retrotranscripción del RNA para producir DNA complementario se realizó a partir de 500 ng de RNA utilizando oligo-dT y el ensayo First Strand Synthesis (Fermentas). La amplificación del cDNA por qPCR se hizo utilizando sondas Taqman y siguiendo las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems). Las cuantificaciones de SOD2 se realizaron por el método del $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (cuantificación relativa) utilizando los genes 18S, GAPDH y beta-actina como controles endógenos.

7.4.2 Perfil de expresión global

El efecto del consumo agudo de los tratamientos sobre el perfil de expresión de PBMCs se evaluó en muestras basales vs 2 h. Estas determinaciones se realizaron en un subgrupo de cuyas muestras estuvieron completas y cumplieron con los criterios de calidad.

7.4.2.1 Procesamiento de microarreglos

El perfil de transcripción de las PBMCs se evaluó por tecnología de microarreglos utilizando el HumanV4GEX Expression BeadChip de Illumina. El procesamiento de las muestras de RNA se realizó de acuerdo a los protocolos de Illumina utilizando el kit de amplificación TotalPrep™ RNA (Illumina, Carlsbad, USA) para generar copias de RNA antisentido (aRNA) biotinilado de cada mRNA en la muestra. El último paso en la amplificación de RNA fue la purificación de aRNA para eliminar compuestos no deseados. Finalmente, el aRNA fue utilizado en el microarreglo para medir la expresión genética.

7.4.2.2 Perfil de la expresión de genes

El perfil de la expresión de genes se realizó en un subgrupo de participantes que tuvieron: i. muestras completas (n=4; dos tratamientos bajo condiciones basales y 2 h después del consumo de los tratamientos), ii. RNA integro en las cuatro muestras (RIN >9), y iii. concentración suficiente de RNA en las cuatro muestras (>1 µg). El efecto del tratamiento sobre el transcriptoma de PBMCs se evaluó utilizando células recolectadas en condición basal y a las 2 h del consumo de ambos trata-

mientos. Las muestras de baja integridad (RIN <9) se eliminaron ya que pueden afectar los resultados de expresión porque acarrean factores contaminantes como sales, alcohol y fenol [76]. Todas las posibles comparaciones entre tratamientos y condiciones (basal vs 2 h) se analizaron aunque los resultados del presente estudio se enfocan en la descripción de los genes diferencialmente expresados posterior al consumo de los tratamientos (Figura 9).

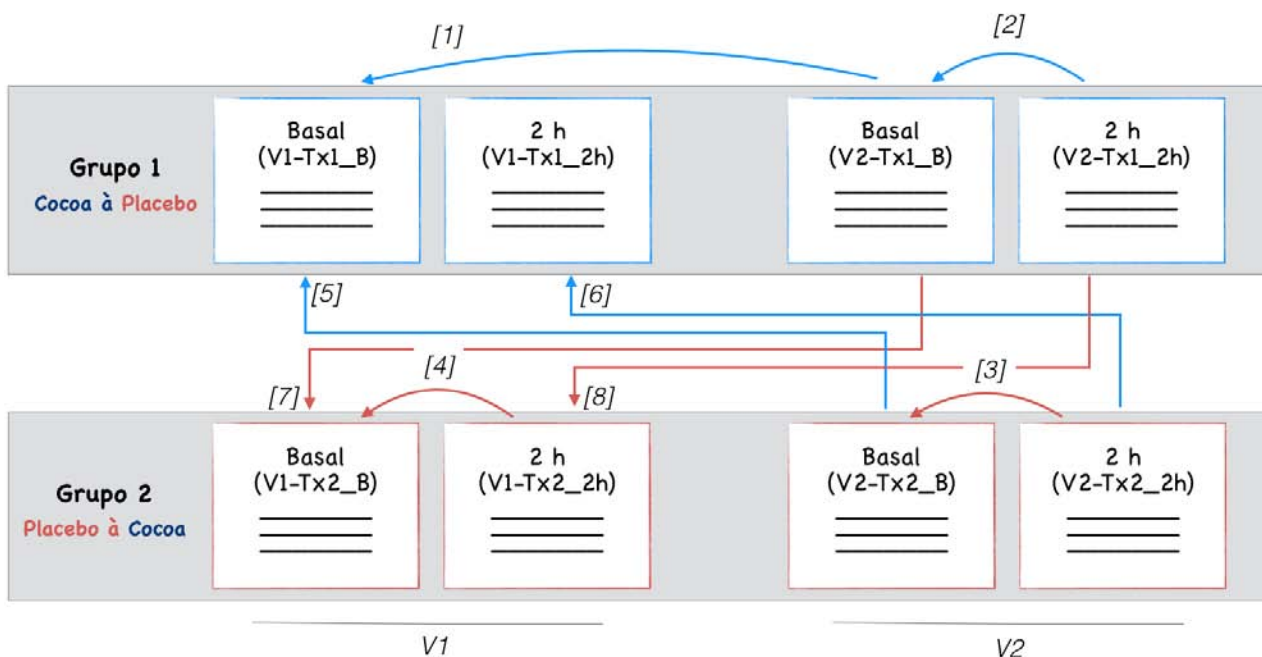


Fig. 9: Perfil de expresión de genes. El perfil se realizó en muestras de RNA de un subgrupo de participantes aleatoriamente seleccionado para evaluar el efecto agudo del consumo de los tratamientos sobre la expresión de genes en PBMCs. Las muestras incluidas en el análisis fueron colectadas en estado basal y 2 horas después del consumo de cocoa y placebo. Las muestras de RNA fueron clasificadas por grupo para su análisis. Todos los contrastes entre grupos fueron analizando creando ocho contrastes de interés. Los contrastes evaluados para este estudio corresponden al efecto agudo derivado del consumo de cocoa {[1] y [4]}, y al efecto agudo derivado del consumo de placebo {[2] y [3]}. Las etiquetas se definen de la siguiente forma: V1: Visita-1; V2: Visita-2; Tx1: Tratamiento 1; Tx2: Tratamiento 2; B: Basal; 2 h: 2 h después del consumo de los tratamientos}.

7.4.2.3 Análisis de datos de microarreglo

Los datos crudos obtenidos del microarreglo tuvieron corrección de fondo utilizando el método Robust Multiarray Average (RMA) [77] y se normalizaron utilizando Cuantiles [78]. La expresión diferencial se determinó utilizando modelos lineales con coeficientes arbitrarios, los contrastes de interés se hicieron utilizando la librería Limma de Bioconductor [79, 80]. Los datos normalizados se corrigieron por pruebas múltiples de Benjamini y Hochberg para conocer la proporción de falsos positivos (FDR) [81]. Los genes seleccionados fueron aquellos que mantuvieron un valor-p <0.05

posterior a la corrección. Finalmente, se implementó un muestreo bootstrap multiescala utilizando el paquete “pvclust” para evaluar la incertidumbre en el análisis de agrupamiento jerárquico [82].

7.4.3.4 Análisis de enriquecimiento funcional

El análisis de enriquecimiento funcional se realizó en el programa Ingenuity Pathway Analysis (IPA, QIAGEN Redwood City, CA, USA). IPA evalúa el enriquecimiento utilizando la prueba exacta de Fisher. Adicionalmente, IPA estima un puntaje-Z que permite identificar funciones que se espera estén enriquecidas al comparar la concordancia entre patrones de regulación observados y esperados. Los patrones de regulación predichos se basan en relaciones causales previamente reportadas entre funciones y genes relevantes [83].

7.5 VALIDACIÓN DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS

El nivel de expresión de cinco genes diferencialmente expresados [receptor beta de interleucina (CXCR2 referido como IL8RB), adrenoreceptor beta 2 (ADRB2), receptor 1 del péptido formilo (FPR1), CD36 e interleucina 8 CXCL8 referido como IL8)] se validó en un subgrupo de participantes que cumplieron con los criterios de selección a través de PCR cuantitativa en tiempo real utilizando el equipo Quantum (Applied Biosystems). Las muestras utilizadas para la validación cumplieron los siguientes criterios: i. tener muestras completas (n=4; dos tratamientos bajo condiciones basales y 2 h después del consumo de los tratamientos), ii. RNA íntegro en las cuatro muestras (RIN >8), y iii. concentración suficiente de RNA en las cuatro muestras (>500 ng). Los genes sobre-expresados (ILRB y ADRB2) y los genes sub-expresados (FPR1, CD36, IL8) se seleccionaron con base en la magnitud del cambio y relevancia para el proyecto de estudio. El cDNA para la validación se sintetizó a partir de 500 ng de RNA total usando un oligo-dT y la enzima M-MuLV (#K1216, Thermo Scientific), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La amplificación del cDNA por PCR en tiempo real se hizo utilizando sondas Taqman y siguiendo las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems). Los productos de PCR fueron cuantificados a través del método de cuantificación absoluta usando curvas estándar construidas con seis estándares (0.32, 1.6, 6, 40, 200, 1000 nM).

7.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El objetivo principal del estudio fue evaluar el efecto que tiene el consumo de un concentrado de cocoa rico en polifenoles sobre el cambio en la expresión de genes en PBMCs. La terminología empleada en el análisis y descripción de resultados fue la siguiente:

- Tratamientos, con niveles: Tx1 y Tx2,
- Periodos, con niveles: Visita 1 (V1), Visita 2 (V2) y Visita 3 (V3),
- Secuencia, con niveles: Grupo 1 (Tx1-Tx2) y Grupo 2 (Tx2-Tx1),
- Fases, con niveles: Fase aguda (dosis única) y fase crónica (28±3 días).

La descripción de variables de estudio se estableció a través de medias y desviaciones estándar. La presencia de un probable efecto de acarreo se evaluó por diferencias de medias por periodos entre voluntarios que consumieron el tratamiento en el Grupo-1 y Grupo-2. El efecto de los tratamientos se evaluó por prueba t-Student para muestras relacionadas. La relación entre el consumo de los tratamientos y la concentración de metabolitos de (-)-epicatequina y la capacidad antioxidante en plasma se evaluó a través de una correlación de Spearman. La presencia de un efecto sexo-dependiente e interacciones entre variables asociadas al cambio en la expresión de genes se evaluaron por modelos lineales. La confiabilidad de la metodología propuesta se verificó durante la revisión de datos cegados. Las diferencias estadísticas se establecieron a $p < 0.05$. El análisis de datos de microarreglo se realizó utilizando la paquetería R (3.3.2) (<http://www.r-project.org/>). El efecto mínimo detectado se evaluó utilizando la delta de Cohen y el cambio en la expresión de IL-8 posterior al consumo de cocoa [84]. Finalmente, se realizó un análisis de poder post-hoc para evaluar los cambios en la expresión de genes utilizando el programa G*Power.

8. RESULTADOS

8.1 PARTICIPANTES DEL ESTUDIO

El estudio se promovió a través de posters y trípticos. Los voluntarios interesados (n=28) se evaluaron de acuerdo a los criterios de inclusión, ocho voluntarios fueron excluidos y 20 iniciaron el estudio (Figura 10). La mitad de los voluntarios fue asignado al Grupo-1 y consumieron los tratamientos en secuencia Tx1-Tx.2, la otra mitad lo hizo en el orden opuesto. Todos los voluntarios concluyeron la fase aguda del estudio y únicamente 19 concluyeron la fase crónica (Figura 10). El cegamiento de los tratamientos se rompió una vez concluido el análisis estadístico, el Tx1 se identificó como cocoa y el Tx2 se identificó como placebo. No se encontraron eventos adversos durante el estudio. Las características descriptivas de los participantes muestran diferencias por sexo en variables antropométricas de peso y talla, así como en los niveles de colesterol-HDL, cuyos valores fueron 38% más altos en las mujeres que los hombres (Tabla 4). El efecto de acarreo se evaluó al comparar la concentración media de metabolitos de (-)-epicatequina por periodo, con un valor de $p > 0.05$ se concluye que la concentración de metabolitos de (-)-epicatequina es similar entre los voluntarios que la tomaron en la V1 que en la V2.

8.2 PERFIL DE METABOLITOS DE (-)-EPICATEQUINA

Los metabolitos de (-)-epicatequina se identificaron y cuantificaron en condiciones basales y 2 horas después del consumo agudo (Grupo-1 y Grupo-2) y crónico (Grupo-2) de un concentrado de cocoa y placebo en muestras de plasma a través de UHPLC-MS/MS (Figura 11). La concentración de metabolitos se mantuvo debajo del límite de detección en condiciones basales y aumentó posterior al consumo de cocoa pero no de placebo ($p < 0.01$). La concentración de metabolitos tuvo variaciones inter-individuales y fue ligeramente mayor en mujeres que en hombres. La suplementación crónica no aumentó la concentración de metabolitos circulantes, por el contrario, la concentración fue 10% menor en la suplementación aguda aunque el perfil de metabolitos permaneció constante (Figura 12). Los cuatro metabolitos de mayor abundancia en plasma fueron E3G, E3S, E4G y 3'ME4S, la sumatoria de los cuatro constituyó el 90% de la concentración total. El metabolito más abundante en el 75% de los sujetos fue E3G. La concentración de (+)-catequina, 4ME y 3ME no aumentó posterior al consumo de cocoa.

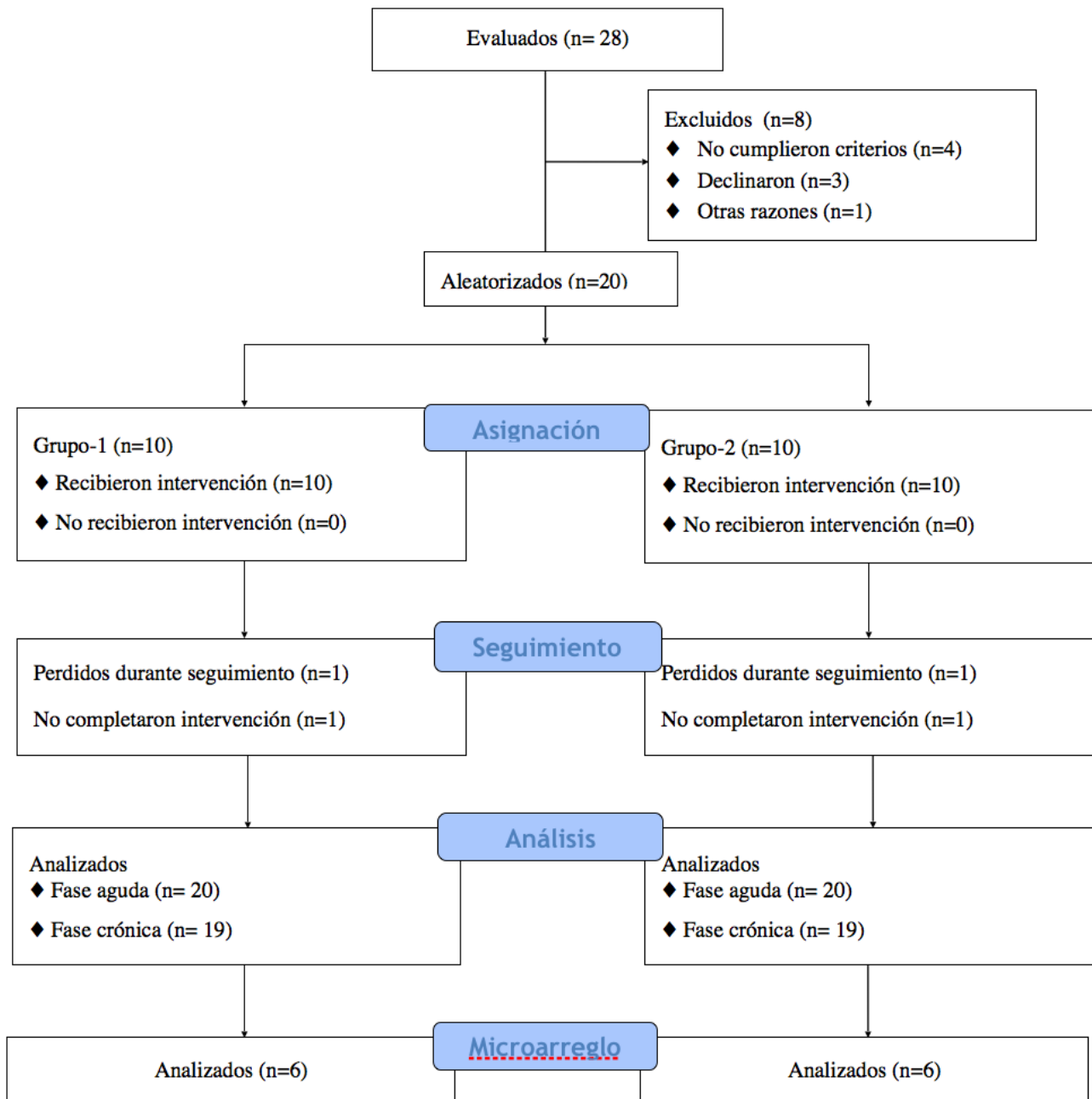


Figura 10: Diagrama de flujo de los participantes a través del estudio. Los participantes se asignaron aleatoriamente a Grupo-1 (Cocoa-Placebo) o Grupo-2 (Placebo-Cocoa) y fueron citados durante tres ocasiones con una semana de periodo de blanqueamiento entre la visita 1 y la visita 2. Durante la exposición, los participantes fueron instruidos de no consumieron ningún alimento o bebida endulzada. Los tratamientos consistieron en cocoa {600 mg de polifenoles de los cuales 97 fueron (-)-epicatequina} y placebo (mal-todextrinas).

Tabla 4: Características descriptivas de la muestra de estudio

| | Sexo | media ± SD | Sig. | 95% CI | |
|--------------------------|------|-------------|--------|-----------------|-----------------|
| | | | | Límite inferior | Límite superior |
| Edad (años) | F | 28 ± 4.1 | 0.9 | -3.96 | 4.32 |
| | M | 28 ± 4.6 | | | |
| Peso (kg) | F | 57 ± 5.2 | <0.01* | -19.10 | -5.59 |
| | M | 69 ± 8.4 | | | |
| Talla (cm) | F | 163 ± 5.8 | 0.01* | -15.38 | -2.77 |
| | M | 172 ± 7.4 | | | |
| IMC (kg/m ²) | F | 21 ± 1.6 | 0.5 | -3.91 | -0.03 |
| | M | 23 ± 2.3 | | | |
| AF (METs/sem) | F | 1910 ± 1222 | 0.7 | -917 | 1297 |
| | M | 1729 ± 1131 | | | |
| Glucosa (mg/dL) | F | 87 ± 6.6 | 0.8 | -8.65 | 6.62 |
| | M | 88 ± 9.1 | | | |
| Triglicéridos (mg/dL) | F | 97 ± 49.3 | 0.5 | -59.1 | 32.66 |
| | M | 110 ± 48.0 | | | |
| Colesterol total (mg/dL) | F | 185 ± 38.4 | 0.4 | -27 | 58.9 |
| | M | 169 ± 50.1 | | | |
| Colesterol-HDL (mg/dL) | F | 80 ± 38.2 | 0.05* | 0.13 | 62.4 |
| | M | 49 ± 28.1 | | | |
| Colesterol-LDL (mg/dL) | F | 86 ± 46.3 | 0.6 | -58.7 | 33.1 |
| | M | 99 ± 50.4 | | | |

F: Femenino (n=9); M: Masculino (n=11); AF: Actividad física; sem: semana; IMC: Índice de masa corporal.; METs: Equivalentes metabólicos, por sus siglas en inglés; 95% CI: Intervalo de confianza al 95%; *p<0.05

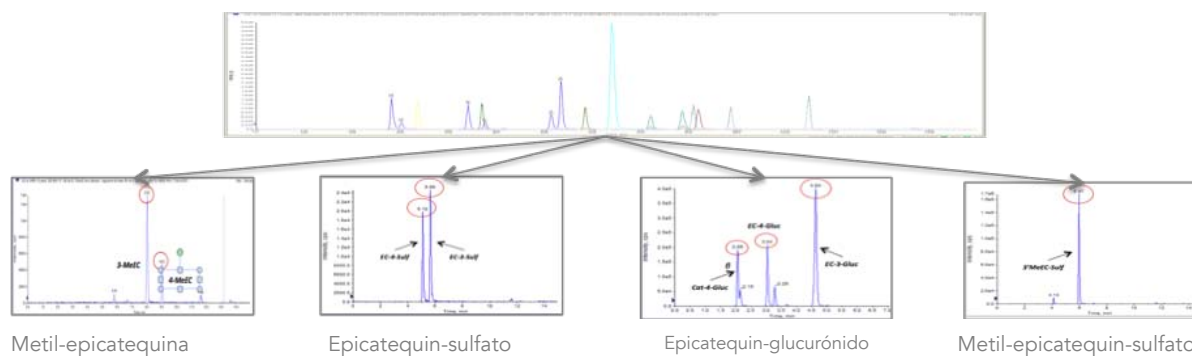


Figura 11: Perfil de metabolitos identificados por UHPLC-MS/MS. Diez metabolitos se identificaron y cuantificaron en muestras de plasma a través de UHPLC-MS/MS. (-)-Epicatequina (EC), (+)-catequina (Cat) fueron identificados como aglicones. Los metabolitos conjugados con grupos glucuronido fueron: (-)-epicatequina-3'-O-glucuronido (E3'G), (-)-epicatequina-4'-O-glucuronido (E4'G), (+)-catequina-4'-O-glucuronido (C4'G). Los metabolitos conjugados con grupos sulfato fueron: (-)-epicatequina-3'-O-sulfato (E3'S), (-)-epicatequina-4'-O-sulfato (E4'S), (-)-3'-O-metilepicatequina-4'-sulfato (3'ME4S). Los metabolitos conjugados con grupos metilo fueron: (-)-4'-O-metilepicatequina (4'ME) y (-)-3'-O-metilepicatequina (3'ME). Las pesos moleculares y los tiempos de retención utilizados para cada metabolismo coinciden con los publicados previamente por Actis-Goretta [17].

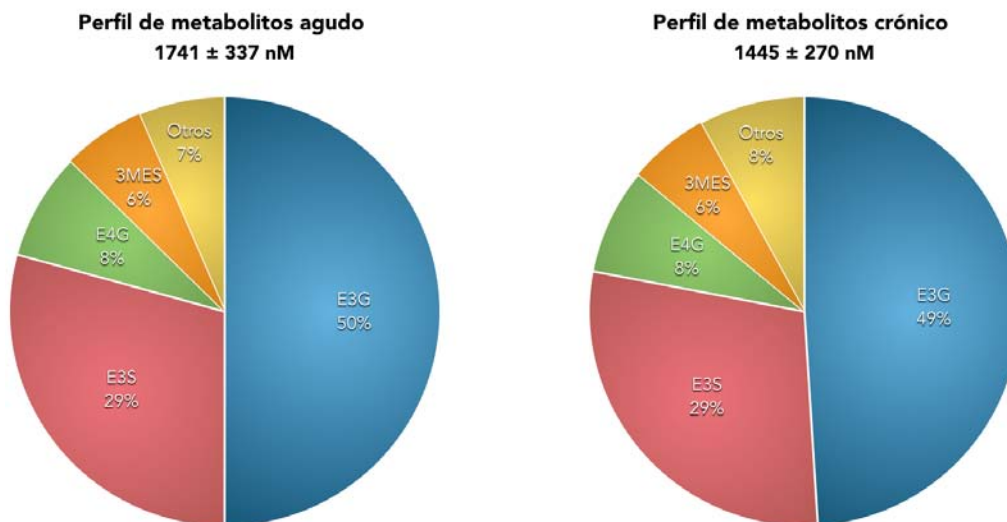


Fig. 12 Concentración de metabolitos de (-)-epicatequina en muestras de plasma posterior al consumo agudo y crónico de cocoa. Diez metabolitos se identificaron y cuantificaron en muestras de plasma a través de UHPLC-MS/MS. Únicamente siete metabolitos aumentaron sus concentración posterior a la intervención ($p < 0.05$). Los datos se presentan como proporciones posterior al consumo de cocoa por grupo.

8.2 CAMBIO EN LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL PLASMA

El efecto del consumo de cocoa sobre la capacidad antioxidante en plasma se evaluó a través del método de Trolox (TEAC). En el presente estudio no se observaron diferencias en la capacidad antioxidante del plasma posterior al consumo de cocoa y placebo (Figura 13).

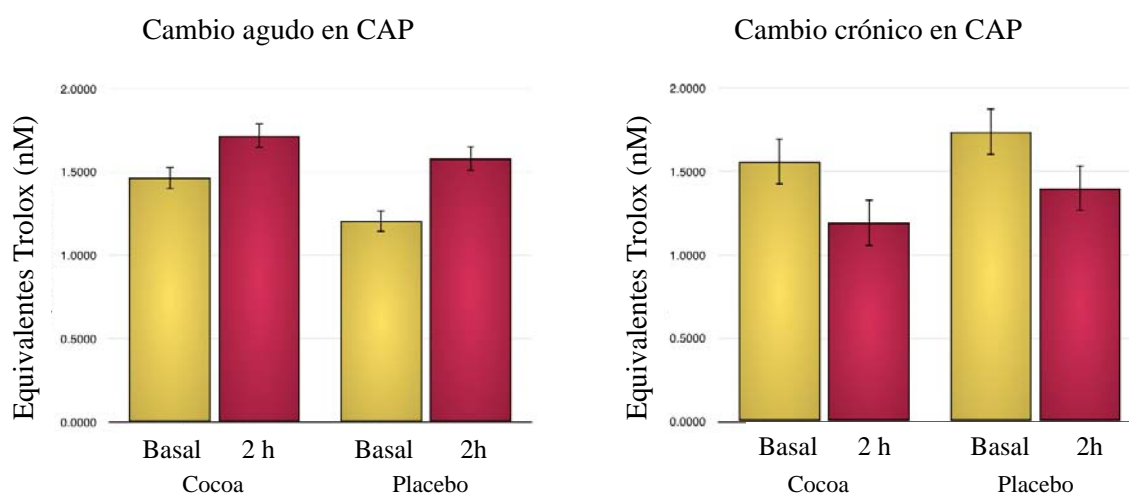


Figura 13: Capacidad antioxidante del plasma (CAP) posterior al consumo agudo y crónico de cocoa y placebo. La capacidad antioxidante del plasma se evaluó utilizando un kit comercial. No se observaron diferencias posterior al consumo agudo y crónico de un concentrado de cocoa. La capacidad antioxidante del plasma se calculó a través de curvas de calibración. Los datos se analizaron a través de un prueba-t para muestras relacionadas. Los datos se expresan como medias y desviaciones errores estándar de la media ($n=20$ para la fase aguda y $n=10$ para la fase crónica).

8.4 EFECTO DEL CONSUMO DE COCOA SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES

Los análisis de expresión se evaluaron en dos fases (Figura 9). La primera evaluó el cambio en la expresión de SOD2 posterior al consumo agudo vs crónico de un concentrado de cocoa. La segunda comparó el cambio individual en la expresión de genes en PBMCs posterior al consumo agudo de cocoa y placebo.

8.4.1 Efecto del consumo de cocoa sobre la expresión de SOD2

El efecto del consumo agudo vs crónico de un concentrado de cocoa sobre el cambio en la expresión de SOD2 en PBMCs se analizó en 120 muestras de RNA pertenecientes a 20 participantes a través de qPCR y el método de cuantificación relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Cada participante contó con seis muestras de sangre, tres fueron recolectadas en periodo de ayuno (Basal) y tres fueron colectadas a las 2 h de haber consumido los tratamientos. De los tres genes endógenos evaluados, GAPDH fue el que presentó mayor estabilidad entre condiciones (coeficiente de variación: 1.81%), por lo que se utilizó como gen endógeno para la estimación del ΔCt . La expresión relativa de SOD2 en la fase aguda se estimó al comparar la expresión del $\Delta Ct_{2\text{ h}}$ vs la expresión ΔCt_{basal} como calibrador; para la fase crónica se comparó la expresión basal de la ΔCt_{V3} vs la expresión basal de la ΔCt_{V2} como calibrador. A partir de estas comparaciones se obtuvieron los valores de $\Delta\Delta Ct$ que fueron posteriormente elevados a la $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Figura 14).

El aumento en la expresión de SOD2 fue mayor posterior al consumo agudo de un concentrado de cocoa, que posterior al consumo crónico. Este aumento fue variable entre grupos e individuos ($p < 0.05$). En la fase aguda, los participantes que consumieron cocoa en la V2 tuvieron una respuesta 44% veces más alta que los participantes que consumieron cocoa en la V1 ($p < 0.05$) (Figura 15). Dado que no se comprobó la existencia de un efecto acarreo, se asume que esta variación está asociada a factores individuales. Contrario a lo que se pensaba, la suplementación diaria durante cuatro semanas disminuyó 19% la expresión de SOD2 ($p > 0.05$) (Figura 15). Finalmente, el tamaño del efecto posterior a la suplementación aguda a través de la Δ de Cohen, fue 0.7 que es considerado moderado.

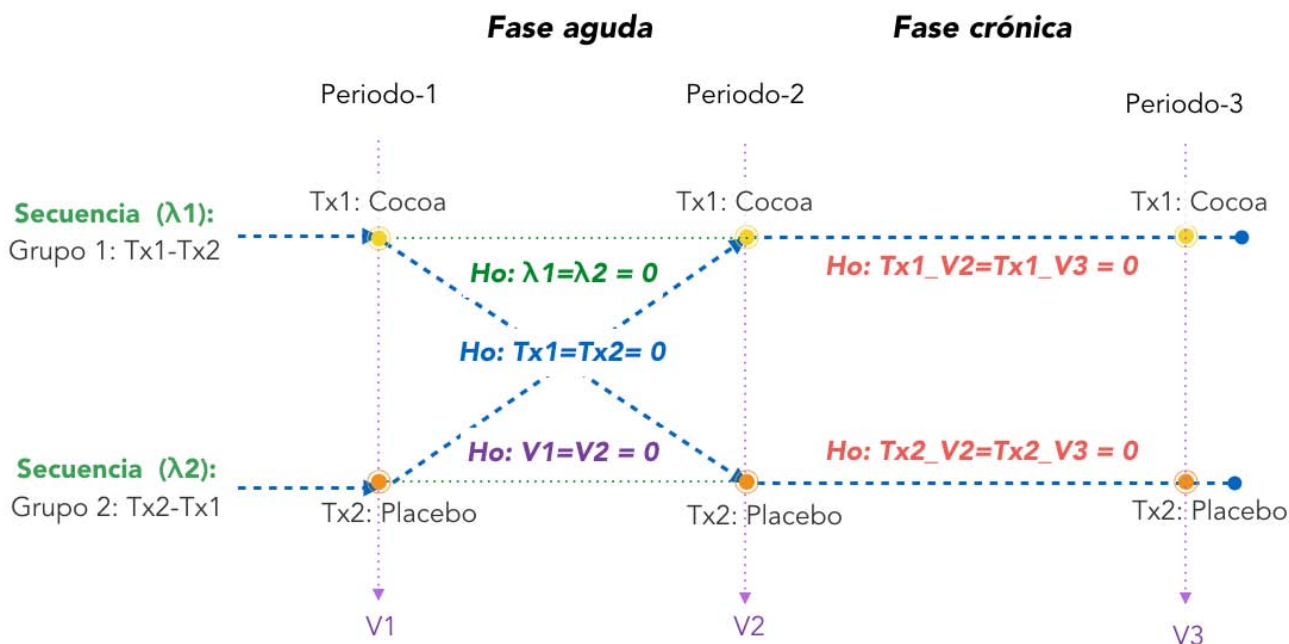


Figura 14: Hipótesis estadísticas a evaluar para verificar la confiabilidad de los datos. Para evaluar si la secuencia de consumo influyó en los resultados del estudio (efecto de acarreo), se utilizó una prueba-t para muestras independientes estratificada por secuencia ($H_0: \lambda_1 = \lambda_2 = 0$). Para evaluar el efecto del periodo sobre los resultados del estudio, se utilizó una prueba-t para muestras independientes estratificada por visita ($H_0: V_1 = V_2 = 0$). Finalmente, se evaluó el efecto del consumo agudo ($H_0: Tx_1 = Tx_2 = 0$) y crónico ($H_0: Tx_?_V_2 = Tx_?_V_3 = 0$) de los tratamientos a través de una prueba-t pareada. Valores- $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos. La confiabilidad de los resultados de expresión se probó mediante tres hipótesis: i. el efecto que tuvo la secuencia del consumo de los tratamientos ($H_0: \lambda_1 = \lambda_2 = 0$), ii. el efecto que tuvo el periodo ($H_0: V_1 = V_2 = 0$), y iii. el efecto que tuvo el tratamiento sobre el cambio en la expresión de SOD2 tanto en la fase aguda ($H_0: Tx_1 = Tx_2 = 0$), como en la fase crónica ($H_0: Tx_?_V_2 = Tx_?_V_3 = 0$) (Figura 13). La secuencia y el periodo no afectaron los resultados del estudio ($p > 0.05$) por lo que se descartó un posible efecto de acarreo.

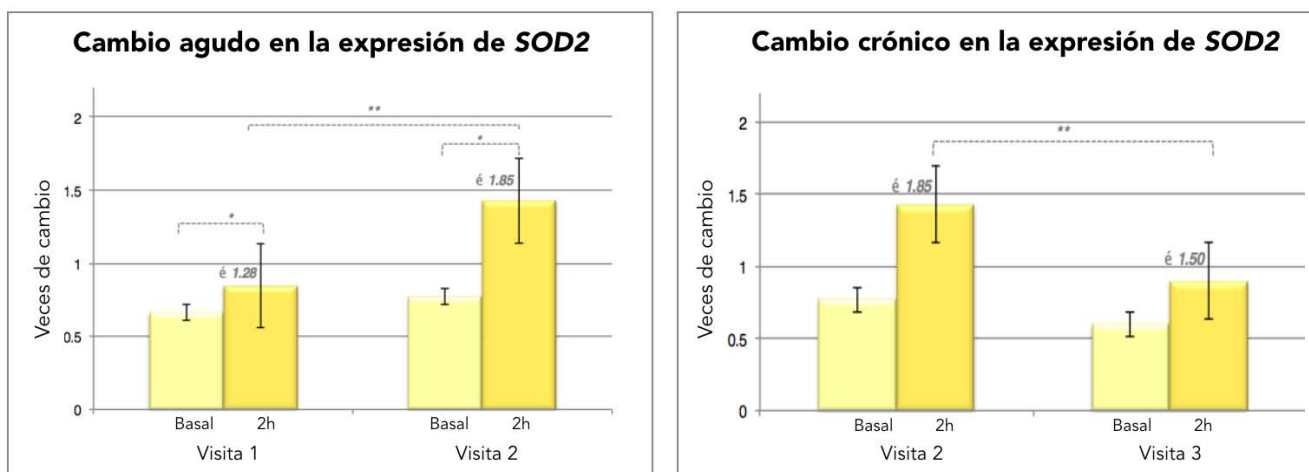


Figura 15: Cambio en la expresión de SOD2 posterior al consumo agudo y crónico de un concentrado de cocoa. El cambio en la expresión de SOD2 se evaluó a través del método de cuantificación relativa del $2^{-\Delta\Delta C_t}$ utilizando el gen endógeno GAPDH como calibrador y el consumo del placebo como comparador. El cambio agudo ($n=20$) y crónico ($n=10$) en el nivel de expresión de SOD2 intragrupo se evaluó a través de una prueba-t para muestras relacionadas. El cambio intergrupo se evaluó a través de una prueba-t para muestras independientes ($n=10$). $*p < 0.05$, $**p < 0.01$.

8.4.2 Efecto del consumo de cocoa sobre el perfil de expresión global en PBMCs

El efecto agudo del consumo de un concentrado de cocoa y placebo sobre el cambio en la expresión de genes individual se evaluó en 24 muestras de RNA pertenecientes a seis participantes (Figura 16). La selección de los participantes se hizo de acuerdo a los criterios de calidad descritos anteriormente (Figura 16). El procesamiento de las muestras cumplió con todos los criterios de calidad estipulados por Illumina para el análisis de microarreglos. Los datos crudos sugieren que la mayor proporción de muestras se agrupan por individuo con valores-p aproximadamente no sesgados (AU) y valores de probabilidades de arranque (BP) mayores de 95 (Figura 17). El análisis bioinformático de datos demostró que el consumo agudo de cocoa indujo cambios en el nivel de transcripción de 98 genes de los cuales 37 estuvieron subexpresados (Figura 18; Tabla 5A). Únicamente 18 genes cambiaron su nivel de expresión posterior al consumo de placebo, de ellos, tres estuvieron subexpresados (Figura 18; Tabla 5B). La magnitud del efecto mínimamente detectado de gen interleucina-8 (CXCL8 o IL8) posterior al consumo agudo de cocoa fue Δ Cohen=4.4, el cual se considera moderado. El análisis de poder post-hoc utilizando este dato fue del 68% [84].

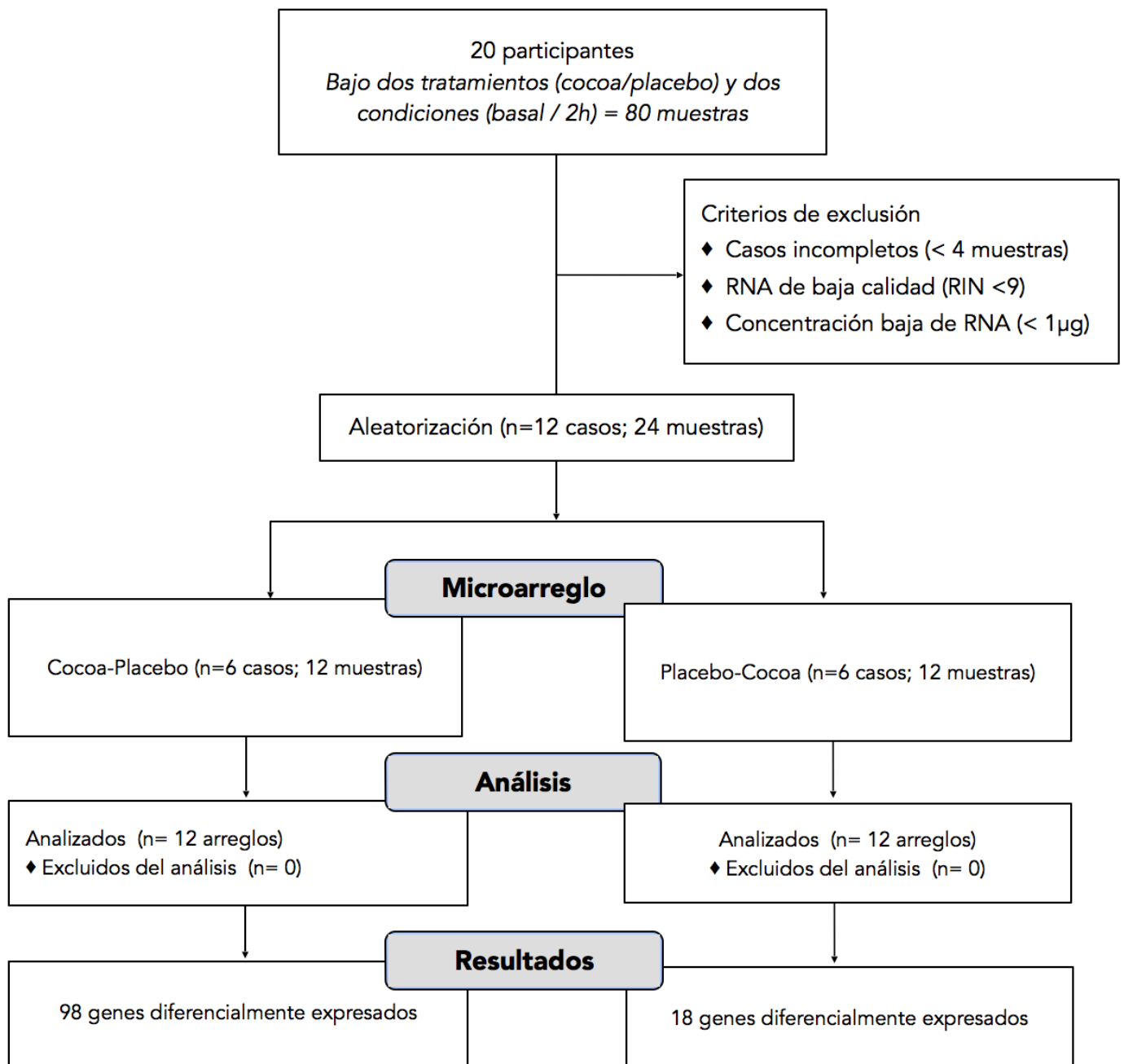


Figura: 16 Diagrama de flujo de las muestras de RNA analizadas en microarreglo.

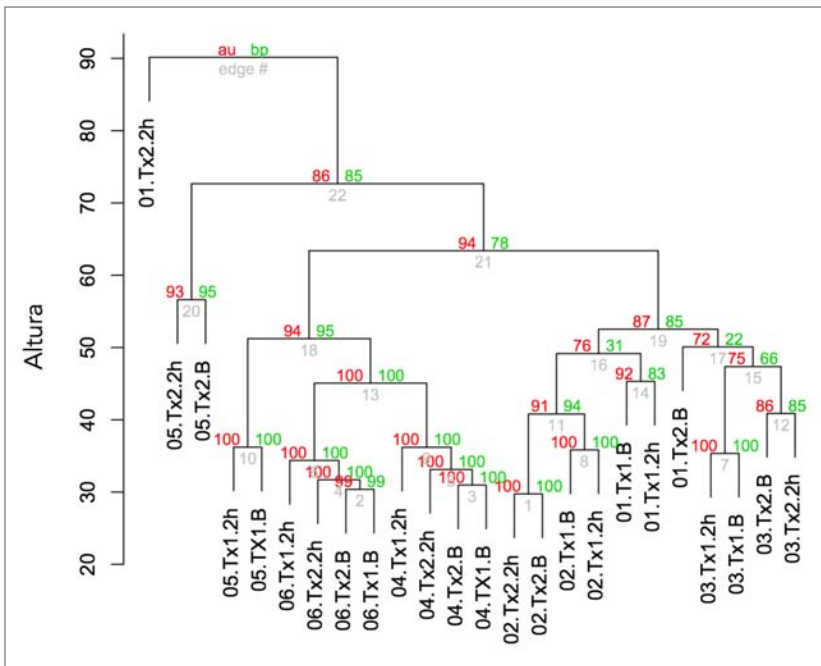


Figura 17: Análisis de agrupamiento de las muestras. El dendrograma de agrupamiento jerárquico no supervisado sobre valores de expresión de genes normalizado muestra un agrupamiento adecuado de las muestras de acuerdo a su clasificación. Las etiquetas se definen como: sujeto ID {0.1:06}, {Tx1: cocoa, Tx2: placebo} y condiciones {B: basal, 2h: después de 2 horas}. El agrupamiento se realizó con correlaciones Spearman, distancias Euclidianas y ligamiento promedio. Los números en rojo representan AU (aproximados no sesgados) y valores-p (%). Los números en verde representan BP (probabilidad de arranque).

COCOA

PLACEBO

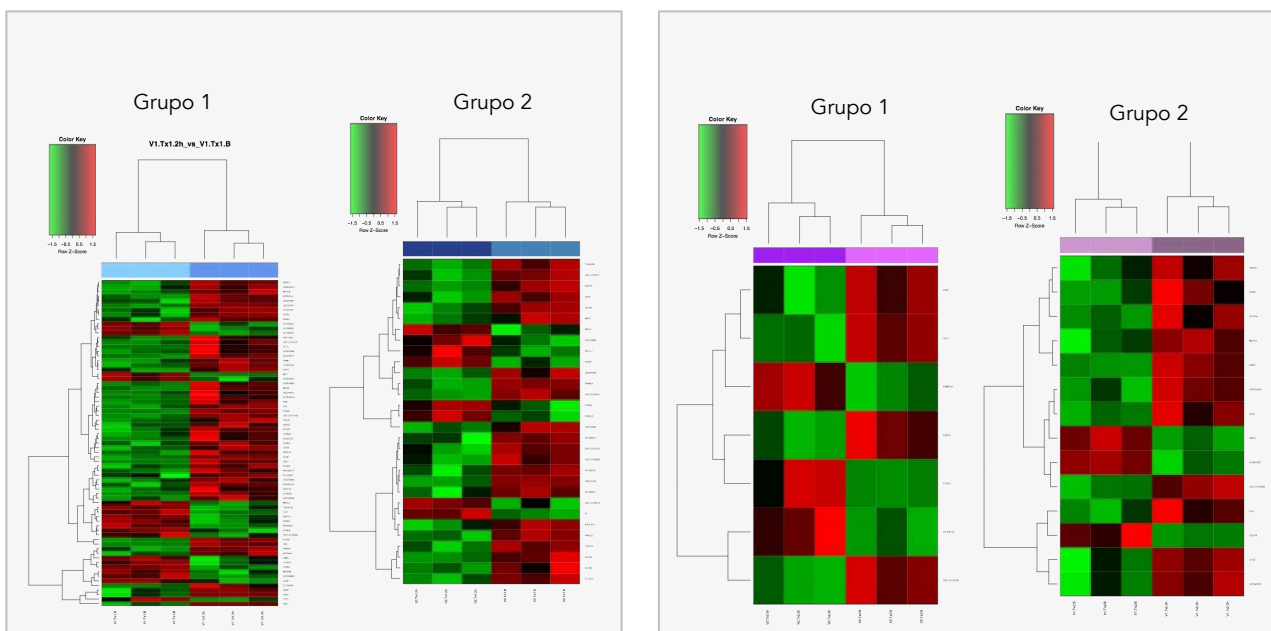


Figura 18: Mapas de calor de genes diferencialmente expresados posterior al consumo agudo de un concentrado de cocoa y placebo. El análisis de expresión se llevó a cabo en los mismos individuos antes y 2 h después del consumo de cocoa y placebo. Los genes diferencialmente expresados se identificaron en 24 muestras de PBMCs pertenecientes a seis participantes {dos tratamientos (cocoa y placebo), bajo dos condiciones (basal y 2h)}. Cada mapa de calor contiene seis columnas; las columnas 1-3 muestra el nivel de expresión en condiciones basales y las columnas 4-6 muestra el nivel de expresión del mismo individuo, 2 horas después de haber consumido el tratamiento. El color verde denota un nivel de expresión disminuido, mientras que el color rojo denota un nivel de expresión aumentado. Los datos están organizados por grupo; el Grupo-1 consumió los tratamientos en secuencia Cocoa-Placebo y el Grupo-2 lo hizo en el orden contrario.

Tabla 5A Genes diferencialmente expresados posterior al consumo agudo de cocoa

| Log Ratio | p-value | ID | Symbol | Entrez Gene Name | Location | Type(s) |
|-----------|----------|-----------|------------------------|--|----------------------|--------------------------------|
| 0.33 | 3.83E-03 | FAM108C1 | ABHD17C | abhydrolase domain containing 17C | Otro | enzima |
| 0.347 | 6.54E-03 | ADRB2 | ADRB2 | adrenoceptor beta 2 | Membrana Plasmática | Receptor acoplado a proteína-G |
| 1.885 | 1.37E-06 | AHSP | AHSP | alpha hemoglobin stabilizing protein | Citoplasma | Otro |
| 3.182 | 7.9E-07 | ALAS2 | ALAS2 | 5'-aminolevulinate synthase 2 | Citoplasma | enzima |
| -0.312 | 5.99E-03 | ANKRD54 | ANKRD54 | ankyrin repeat domain 54 | Núcleo | regulador transcripcional |
| 0.359 | 7.7E-03 | ARHGAP17 | ARHGAP17 | Rho GTPase activating protein 17 | Citoplasma | Otro |
| 1.099 | 6.95E-05 | CA1 | CA1 | carbonic anhydrase 1 | Citoplasma | enzima |
| -0.508 | 6.9E-03 | CAPG | CAPG | capping actin protein, gelsolin like | Núcleo | Otro |
| -0.396 | 5.09E-03 | CD36 | CD36 | CD36 molecule | Membrana Plasmática | transmembrane receptor |
| 0.306 | 7.88E-03 | CETN1 | CETN1 | centrin 1 | Núcleo | enzima |
| -0.319 | 4.57E-03 | CKAP4 | CKAP4 | cytoskeleton associated protein 4 | Citoplasma | Otro |
| -0.41 | 2.38E-03 | CLK1 | CLK1 | CDC like kinase 1 | Núcleo | cinasa |
| -0.455 | 9.52E-03 | COTL1 | COTL1 | coactosin like F-actin binding protein 1 | Citoplasma | Otro |
| -0.688 | 7.36E-03 | IL8 | CXCL8 | C-X-C motif chemokine ligand 8 | Espacio Extracelular | cytokine |
| 0.734 | 6.84E-03 | CXCR1 | CXCR1 | C-X-C motif chemokine receptor 1 | Membrana Plasmática | Receptor acoplado a proteína-G |
| 0.869 | 6.13E-04 | IL8RB | CXCR2 | C-X-C motif chemokine receptor 2 | Membrana Plasmática | Receptor acoplado a proteína-G |
| 0.49 | 2.77E-03 | WDR40A | DCAF12 | DDB1 and CUL4 associated factor 12 | Citoplasma | Otro |
| 0.401 | 7.85E-03 | DDR1 | DDR1 | discoidin domain receptor tyrosine kinase 1 | Membrana Plasmática | cinasa |
| 1.214 | 4.36E-04 | EPB42 | EPB42 | erythrocyte membrane protein band 4.2 | Membrana Plasmática | transportador |
| 0.557 | 8.72E-06 | FAM46C | FAM46C | family with sequence similarity 46 member C | Espacio Extracelular | Otro |
| -0.396 | 8.07E-03 | FPR1 | FPR1 | formyl peptide receptor 1 | Membrana Plasmática | Receptor acoplado a proteína-G |
| 0.316 | 9.34E-03 | GFI1 | GFI1 | growth factor independent 1 transcriptional repressor | Núcleo | regulador transcripcional |
| 0.436 | 4.11E-03 | GYPE | GYPE | glycophorin E (MNS blood group) | Membrana Plasmática | Otro |
| 3.707 | 2.24E-05 | HBA1 | HBA1/HBA2 | hemoglobin subunit alpha 2 | Espacio Extracelular | transportador |
| 1.729 | 1.34E-03 | HBA2 | HBA1/HBA2 | hemoglobin subunit alpha 2 | Espacio Extracelular | transportador |
| 1.581 | 5.9E-04 | HBA2 | HBA1/HBA2 | hemoglobin subunit alpha 2 | Espacio Extracelular | transportador |
| 2.202 | 3.99E-06 | HBD | HBD | hemoglobin subunit delta | Otro | transportador |
| 2.137 | 5.48E-05 | HBE1 | HBE1 | hemoglobin subunit epsilon 1 | Citoplasma | transportador |
| 1.582 | 3.43E-04 | HBM | HBM | hemoglobin subunit mu | Citoplasma | Otro |
| 0.73 | 3.78E-03 | IFIT1L | IFIT1B | interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 1B | Citoplasma | Otro |
| -0.436 | 2.08E-03 | HS.552896 | KCNC1 | potassium voltage-gated channel subfamily C member 1 | Membrana Plasmática | ion channel |
| 0.748 | 1.37E-03 | KCNG1 | KCNG1 | potassium voltage-gated channel modifier subfamily G member 1 | Membrana Plasmática | ion channel |
| -0.395 | 3.67E-03 | KREMEN2 | KREMEN2 | kringle containing transmembrane protein 2 | Otro | Otro |
| 0.323 | 5.3E-03 | KRTAP9-5 | KRTAP9-9 | keratin associated protein 9-9 | Citoplasma | Otro |
| 0.396 | 7.87E-03 | LARGE | LARGE1 | LARGE xylosyl- and glucuronyltransferase 1 | Citoplasma | enzima |
| 0.798 | 8.36E-03 | LOC440313 | LOC440313 | protein enabled homolog | Otro | Otro |
| -0.405 | 1.45E-03 | LRRN3 | LRRN3 | leucine rich repeat neuronal 3 | Espacio Extracelular | Otro |
| -0.428 | 2.39E-03 | MGST1 | MGST1 | microsomal glutathione S-transferase 1 | Citoplasma | enzima |
| -0.42 | 1.47E-03 | MIIP | MIIP | migration and invasion inhibitory protein | Otro | Otro |
| -0.448 | 3.68E-03 | MPZL2 | MPZL2 | myelin protein zero like 2 | Membrana Plasmática | Otro |
| -0.364 | 9.08E-03 | MS4A6A | MS4A6A | membrane spanning 4-domains A6A | Otro | Otro |
| 0.805 | 3.37E-04 | MUC6 | MUC6 | mucin 6, oligomeric mucus/gel-forming | Espacio Extracelular | Otro |
| 0.422 | 3.05E-03 | MYO1B | MYO1B | myosin IB | Citoplasma | enzima |
| 0.338 | 4.98E-03 | NIPAL4 | NIPAL4 | NIPA like domain containing 4 | Otro | Otro |
| 0.311 | 9.24E-03 | NUAK2 | NUAK2 | NUAK family kinase 2 | Otro | cinasa |
| 0.466 | 2.38E-03 | ORM1 | ORM1 | orosomuroid 1 | Espacio Extracelular | Otro |
| -0.398 | 1.76E-03 | OSBPL8 | OSBPL8 | oxysterol binding protein like 8 | Membrana Plasmática | transportador |
| -0.506 | 3.06E-03 | PFDN6 | PFDN6 | prefoldin subunit 6 | Citoplasma | Otro |
| 0.432 | 6.36E-03 | PKHD1 | PKHD1 | PKHD1, fibrocystin/polyductin | Membrana Plasmática | Otro |
| 0.407 | 3.61E-03 | PPP5C1B | PLPP5 | phospholipid phosphatase 5 | Otro | phosphatase |
| -0.314 | 4.55E-03 | A26C3 | POTEG (includes Otros) | POTE ankyrin domain family member G | Otro | Otro |
| -0.372 | 7.35E-03 | PTPRC | PTPRC | protein tyrosine phosphatase, receptor type C | Membrana Plasmática | phosphatase |
| 0.46 | 8.2E-03 | RAP1GAP | RAP1GAP | RAP1 GTPase activating protein | Citoplasma | Otro |
| 1.019 | 1.22E-03 | RNF213 | RNF213 | ring finger protein 213 | Citoplasma | enzima |
| -0.905 | 9.09E-03 | RNU1G2 | RNU1-4 | RNA, U1 small nuclear 4 | Otro | Otro |
| -0.582 | 6.15E-03 | RPPH1 | RPPH1 | ribonuclease P RNA component H1 | Otro | Otro |
| 0.644 | 2.31E-04 | SELENBP1 | SELENBP1 | selenium binding protein 1 | Citoplasma | Otro |
| 1.161 | 1.66E-03 | SERPINA13 | SERPINA13P | serpin family A member 13, pseudogene | Espacio Extracelular | Otro |
| 0.428 | 3.99E-03 | SESN3 | SESN3 | sestrin 3 | Espacio Extracelular | Otro |
| 0.933 | 6.73E-03 | SLC25A37 | SLC25A37 | solute carrier family 25 member 37 | Citoplasma | transportador |
| 0.635 | 3.67E-03 | SLC25A39 | SLC25A39 | solute carrier family 25 member 39 | Citoplasma | Otro |
| 0.421 | 7.25E-03 | RUNDCC2C | SNX29P2 | sorting nexin 29 pseudogene 2 | Otro | Otro |
| 0.676 | 4.15E-04 | STRADB | STRADB | STE20-related kinase adaptor beta | Citoplasma | cinasa |
| 0.376 | 7.26E-03 | TGFB3 | TGFB3 | transforming growth factor beta receptor 3 | Membrana Plasmática | cinasa |
| 0.35 | 5.64E-03 | TIGIT | TIGIT | T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains | Membrana Plasmática | Otro |
| -0.32 | 8.1E-03 | TMEM165 | TMEM165 | transmembrane protein 165 | Membrana Plasmática | Otro |
| 0.714 | 8.4E-03 | GPR175 | TPRA1 | transmembrane protein adipocyte associated 1 | Membrana Plasmática | Receptor acoplado a proteína-G |
| -0.35 | 9.36E-03 | TPT1 | TPT1 | tumor protein, translationally-controlled 1 | Citoplasma | Otro |
| -0.541 | 5.43E-03 | TRIM44 | TRIM44 | tripartite motif containing 44 | Citoplasma | Otro |
| 0.512 | 7.14E-03 | TSPAN5 | TSPAN5 | tetraspanin 5 | Membrana Plasmática | Otro |
| -0.389 | 6.43E-03 | UGCG | UGCG | UDP-glucose ceramide glucosyltransferase | Citoplasma | enzima |
| -0.501 | 6.5E-03 | UIMC1 | UIMC1 | ubiquitin interaction motif containing 1 | Núcleo | Otro |
| -0.315 | 5.18E-03 | UTY | UTY | ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat containing, Y-linked | Núcleo | enzima |
| -0.734 | 1.75E-03 | ZADH2 | ZADH2 | zinc binding alcohol dehydrogenase domain containing 2 | Citoplasma | enzima |

| | | | | | | |
|--------|----------|--------------|--------|-------------------------|--------|------|
| -1.054 | 4.12E-04 | ZNF573 | ZNF573 | zinc finger protein 573 | Núcleo | Otro |
| 1.181 | 1.94E-05 | LOC100131164 | | No identificado | | |
| 0.95 | 9.81E-04 | LOC644852 | | No identificado | | |
| 0.652 | 2.16E-03 | LOC389599 | | No identificado | | |
| 0.609 | 1.97E-03 | LOC283663 | | No identificado | | |
| -0.599 | 8.25E-03 | LOC100129882 | | No identificado | | |
| 0.576 | 3.12E-03 | LOC100131391 | | No identificado | | |
| 0.56 | 8.3E-03 | LOC642469 | | No identificado | | |
| -0.375 | 3.57E-03 | LOC399804 | | No identificado | | |
| -0.357 | 8.91E-03 | LOC645351 | | No identificado | | |
| 0.348 | 8.6E-03 | LOC644012 | | No identificado | | |
| 0.322 | 8.73E-03 | HS.527387 | | No identificado | | |
| 0.315 | 5.22E-03 | C1ORF183 | | No identificado | | |
| 0.315 | 9.78E-03 | LOC374491 | | No identificado | | |
| -0.311 | 4.8E-03 | HS.545536 | | No identificado | | |
| -0.306 | 7.07E-03 | HS.578383 | | No identificado | | |
| 0.306 | 4.19E-03 | LOC391347 | | No identificado | | |
| -1.045 | 4.37E-03 | RNU1-5 | | No identificado | | |
| 0.393 | 1.92E-03 | LOC649185 | | No identificado | | |
| 0.351 | 9.59E-03 | LOC100132506 | | No identificado | | |
| 0.343 | 2.56E-03 | C1ORF21 | | No identificado | | |
| 0.331 | 5.06E-03 | LOC648879 | | No identificado | | |
| -0.304 | 4.73E-03 | LOC728505 | | No identificado | | |
| -0.303 | 5.83E-03 | LOC729992 | | No identificado | | |

Tabla 5B Genes diferencialmente expresados posterior al consumo agudo de placebo

| Log Ratio | p-value | ID | Symbol | Entrez Gene Name | Location | Type(s) |
|-----------|----------|---------------|----------|---|---------------------|--------------------------------|
| 0.467 | 7.9E-03 | AP2B1 | AP2B1 | adaptor related protein complex 2 beta 1 subunit | Membrana Plasmática | transportador |
| 0.343 | 9.22E-03 | CACNA2D3 | CACNA2D3 | calcium voltage-gated channel auxiliary subunit alpha2delta 3 | Membrana Plasmática | ion channel |
| 0.63 | 2.53E-03 | CTSZ | CTSZ | cathepsin Z | Citoplasma | peptidase |
| -0.364 | 7.08E-03 | CXCR4 | CXCR4 | C-X-C motif chemokine receptor 4 | Membrana Plasmática | Receptor acoplado a proteína-G |
| 0.374 | 5.34E-03 | DLG4 | DLG4 | discs large MAGUK scaffold protein 4 | Membrana Plasmática | cinasa |
| 0.404 | 8.73E-03 | ERH | ERH | enhancer of rudimentary homolog (Drosophila) | Núcleo | Otro |
| 0.472 | 7.26E-04 | G6PD | G6PD | glucose-6-phosphate dehydrogenase | Citoplasma | enzima |
| 0.407 | 5.77E-03 | GTF2H4 | GTF2H4 | general transcription factor IIH subunit 4 | Núcleo | regulador transcripcional |
| 0.391 | 5.68E-03 | MEPCE | MEPCE | methylphosphate capping enzyme | Otro | enzima |
| -0.422 | 6.13E-03 | PRR13 | PRR13 | proline rich 13 | Núcleo | Otro |
| -0.318 | 4.61E-03 | RBM3 | RBM3 | RNA binding motif (RNPI, RRM) protein 3 | Citoplasma | Otro |
| 0.62 | 6.15E-03 | UBE2E1 | UBE2E1 | ubiquitin conjugating enzyme E2 E1 | Citoplasma | enzima |
| -0.455 | 4.29E-03 | LOC389049 | | No identificado | | |
| 0.519 | 5.21E-03 | DKFZP781G0119 | | No identificado | | |
| -0.38 | 7.43E-03 | LOC643452 | | No identificado | | |
| 0.312 | 8.37E-03 | LOC554208 | | No identificado | | |
| -0.31 | 5.25E-03 | LOC653257 | | No identificado | | |
| 0.335 | 3.94E-03 | LOC100130884 | | No identificado | | |

8.4.2.1 Análisis de enriquecimiento de genes diferencialmente expresados

Los análisis de enriquecimiento funcional se hicieron con el objetivo de dilucidar la función de varios genes cuya expresión cambió posterior al consumo agudo de cocoa y placebo a través de IPA. Los resultados de dichos análisis revelan que los genes diferencialmente expresados posterior al consumo de cocoa se asociaron a 423 funciones anotadas, de las cuales 30 tuvieron puntaje-Z válidos (Tabla 6A), sin embargo, sólo tres funciones pasaron el punto de corte previamente establecido (puntaje-Z < -1.5 o >1.5): i. Disminución de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) ($p=9.58E-4$; puntaje-Z = -2.216), ii. Activación de leucocitos ($p=4E-3$; puntaje-Z = -1.966) y, iii. Infección viral ($p=9.8E-4$, puntaje-Z=-1.667) (Figura 19). Otras funciones anotadas que han sido previamente asociadas al consumo de cocoa pero que no alcanzaron el punto de corte para el puntaje-Z establecido fueron: cantidad de Ca^{2+} ($p=2.51E-05$; puntaje-Z = 1.05) y movilización del Ca^{2+} ($p=3.62E-05$; z-score= -0.464). Los genes diferencialmente expresados posterior al consumo de placebo estuvieron involucrados en 141 funciones de las cuales dos tuvieron puntajes-Z válidos pero ninguna pasó el punto de corte previamente establecido (Tabla 6B).

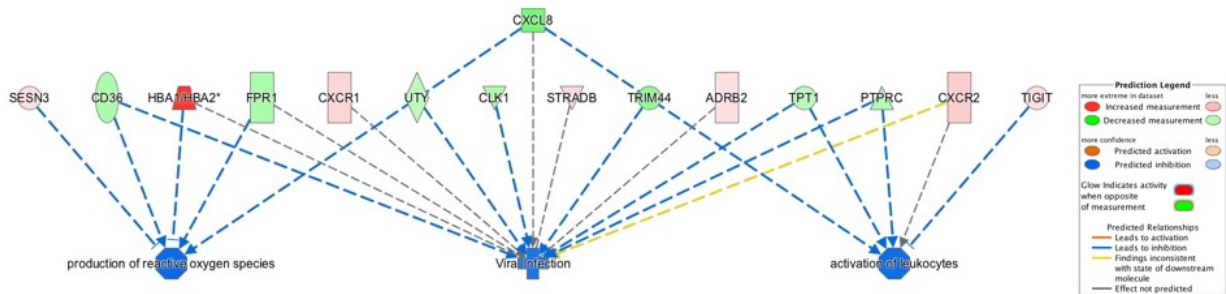


Figura 19: Análisis de enriquecimiento de los genes diferencialmente expresados posterior al consumo de cocoa. Los análisis de enriquecimiento se realizaron utilizando el software IPA. Redes de genes diferencialmente expresados de funciones enriquecidas que tuvieron un puntaje-Z de activación < -1.5 o >1.5; Disminución de la producción de ROS ($p=9.58E-4$; puntaje-Z = -2.216), Activación de leucocitos ($p=4E-3$; puntaje-Z = -1.966) y, Infección viral ($p=9.8E-4$, puntaje-Z=-1.667).

Tabla 6A: Análisis de enriquecimiento funcional de genes modulados posterior al consumo de cocoa

| Category | Functions Annotation | p-Value | Activation z-score | Molecules | # Molecules |
|---|--|----------|--------------------|--|-------------|
| Free Radical Scavenging | Production of reactive oxygen species | 9.58E-04 | -2.216 | CD36,CXCL8,FPR1,HBA1/HBA2,SESN3 | 5 |
| Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Function, Immune Cell Trafficking, Inflammatory Response | Activation of leukocytes | 4E-03 | -1.966 | CXCL8,CXCR2,PTPRC,TIGIT,TPT1 | 5 |
| Infectious Diseases | Viral Infection | 2.72E-02 | -1.667 | CD36,CLK1,CXCL8,CXCR1,CXCR2,FPR1,HBA1/HBA2,HBE1,PTPRC,STRADB,TPT1,TRIM44,UTY | 13 |
| Lipid Metabolism, Small Molecule Biochemistry | Synthesis of lipid | 3.02E-02 | -1.462 | COTL1,CXCL8,FPR1,LARGE,UGCG | 5 |
| Cell-To-Cell Signaling and Interaction | Activation of cells | 6.11E-03 | -1.418 | CXCL8,CXCR1,CXCR2,PTPRC,TIGIT,TPT1 | 6 |
| Lipid Metabolism, Small Molecule Biochemistry | Fatty acid metabolism | 6.83E-04 | -1.004 | CD36,COTL1,CXCL8,FPR1,LARGE,OSBPL8,UGCG | 7 |
| Cell Morphology | Cell spreading | 3.57E-03 | -0.958 | CD36,CXCL8,CXCR2,RAP1GAP | 4 |
| Cellular Movement | Migration of cells | 2.27E-02 | -0.818 | ADRB2,CD36,CXCL8,CXCR1,CXCR2,DDR1,FPR1,ORM1,RAP1GAP,TGFBR3,TPT1 | 11 |
| Cell-To-Cell Signaling and Interaction | Binding of cells | 2.57E-03 | -0.806 | CD36,CXCL8,CXCR1,CXCR2,ORM1,RAP1GAP | 6 |
| Cellular Movement, Immune Cell Trafficking | Leukocyte migration | 1.61E-02 | -0.563 | CXCL8,CXCR1,CXCR2,DDR1,FPR1 | 5 |
| Cell-To-Cell Signaling and Interaction | Binding of blood cells | 1.53E-04 | -0.515 | CXCL8,CXCR1,CXCR2,ORM1,RAP1GAP | 5 |
| Cell Signaling, Molecular Transport, Vitamin and Mineral Metabolism | Mobilization of Ca ²⁺ | 3.62E-05 | -0.464 | ADRB2,CXCL8,CXCR1,CXCR2,FPR1,PTPRC,TPT1 | 7 |
| Inflammatory Response | Inflammatory response | 1.28E-02 | -0.299 | CXCL8,CXCR1,CXCR2,FPR1,ORM1 | 5 |
| Cellular Movement, Hematological System Development and Function, Immune Cell Trafficking, Inflammatory Response | Chemotaxis of mononuclear leukocytes | 1.92E-03 | -0.278 | CXCL8,CXCR1,CXCR2,FPR1 | 4 |
| Cell Death and Survival | Apoptosis of leukemia cell lines | 3.63E-02 | -0.277 | GFI1,PTPRC,TPT1,UGCG | 4 |
| Cellular Movement | Cell movement of blood cells | 3.66E-03 | -0.259 | CD36,CXCL8,CXCR1,CXCR2,DDR1,FPR1 | 6 |
| Cellular Movement | Chemotaxis of cells | 1.4E-02 | -0.227 | CD36,CXCL8,CXCR1,CXCR2,FPR1 | 5 |
| Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Function, Inflammatory Response | Binding of professional phagocytic cells | 5.29E-05 | -0.211 | CXCL8,CXCR1,CXCR2,ORM1 | 4 |
| Cell-To-Cell Signaling and Interaction | Adhesion of blood cells | 2.23E-04 | -0.2 | ADRB2,CD36,CXCL8,CXCR1,CXCR2,ORM1 | 6 |
| Cellular Movement, Hematological System Development and Function, Immune Cell Trafficking, Inflammatory Response | Chemotaxis of neutrophils | 3.13E-04 | -0.153 | CXCL8,CXCR1,CXCR2,FPR1 | 4 |
| Cell-To-Cell Signaling and Interaction | Binding of tumor cell lines | 4.16E-03 | -0.152 | CD36,CXCR1,CXCR2,RAP1GAP | 4 |
| Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Function, Immune Cell Trafficking | Adhesion of immune cells | 6E-03 | -0.121 | CXCL8,CXCR1,CXCR2,ORM1 | 4 |
| Cardiovascular System Development and Function, Cellular Movement | Chemotaxis of endothelial cell lines | 1.57E-07 | -0.102 | CD36,CXCL8,CXCR1,CXCR2 | 4 |
| Cellular Development, Hematological System Development and Function | Differentiation of blood cells | 4.15E-02 | 0 | CXCL8,CXCR1,CXCR2,PTPRC | 4 |
| Cellular Movement | Cell movement | 2.08E-02 | 0.082 | ADRB2,CD36,CXCL8,CXCR1,CXCR2,DDR1,FPR1,NUAK2,ORM1,RAP1GAP,TGFBR3,TPT1 | 12 |
| Cellular Movement | Transmigration of cells | 3.92E-04 | 0.343 | CXCL8,CXCR2,FPR1,RAP1GAP | 4 |
| Cardiovascular System Development and Function, Cellular Movement | Movement of vascular endothelial cells | 2.56E-03 | 0.528 | CD36,CXCL8,CXCR2,ORM1 | 4 |
| Cardiovascular System Development and Function, Cellular Movement | Migration of endothelial cells | 1.62E-02 | 0.927 | CXCL8,CXCR1,CXCR2,ORM1 | 4 |
| Cardiovascular System Development and Function, Cellular Movement | Cell movement of endothelial cells | 4.06E-03 | 0.987 | CD36,CXCL8,CXCR1,CXCR2,ORM1 | 5 |
| Cell Signaling, Molecular Transport, Vitamin and Mineral Metabolism | Quantity of Ca ²⁺ | 2.51E-05 | 1.047 | CXCL8,CXCR1,CXCR2,FPR1,HBA1/HBA2,ORM1,PTPRC | 7 |

Tabla 6B: Análisis de enriquecimiento funcional de genes modulados posterior al consumo de placebo

| Category | Functions Annotation | p-Value | Activation z-score | Molecules | # Molecules |
|---------------------|-------------------------------|----------|--------------------|----------------------------------|-------------|
| Infectious Diseases | Infection by RNA virus | 4.58E-04 | 0.471 | AP2B1,CACNA2D3,CTS2,CXCR4,UBE2E1 | 5 |
| Infectious Diseases | Infection of tumor cell lines | 6.24E-04 | 0.594 | AP2B1,CTS2,CXCR4,UBE2E1 | 4 |

8.4.2.2 Validación de genes diferencialmente expresados

Los cambios en los niveles de expresión de cinco genes diferencialmente expresados posterior al consumo agudo de cocoa (*IL8*, *IL8RB*, *CD36*, *ADRB2* y *FPR1*) se validaron por qPCR en tiempo real utilizando 40 muestras de RNA pertenecientes a diez participantes. Los genes validados se seleccionaron de acuerdo a su magnitud de cambio y participación en al menos tres vías funcionales. La consistencia en la dirección de los cambios entre los datos del microarreglo y qPCR se observó para *IL8*, *IL8RB*, *CD36* y *ADRB2*. Únicamente *FPR1* presentó diferencias en los cambios observados entre los dos métodos (Tabla 7).

Tabla 7: Validación. Síntesis de cDNA y qPCR en tiempo real

| | Log Ratio | | p-Value | |
|-------|-----------|----------|----------|------|
| | Array | qPCR | Array | qPCR |
| CXCR2 | ↑ 0.869 | ↑ 0.061 | 6.13E-03 | 0.26 |
| ADRB2 | ↑ 0.347 | ↑ 0.044 | 6.54E-03 | 0.05 |
| FPR1 | ↓ -0.396 | ↑ 0.035 | 8.07E-03 | 0.21 |
| CD36 | ↓ -0.396 | ↓ -0.052 | 5.09E-03 | 0.04 |
| CXCL8 | ↓ -0.688 | ↓ -0.295 | 7.36E-03 | 0.08 |

Cinco genes diferencialmente expresados fueron validados por qPCR en tiempo real utilizando el equipo Quantum DNA. El análisis de datos se hizo a través de cuantificación absoluta utilizando curvas estándar.

9. DISCUSIÓN

El estudio pretendió evaluar el cambio en la expresión de genes en PBMCs derivados del consumo agudo y crónico de cocoa de alto contenido en polifenoles y placebo, y analizar la concentración de metabolitos de (-)-epicatequina, que pueden a su vez, modular la capacidad antioxidante en plasma. El diseño cruzado en la fase aguda permitió controlar por variables confusoras como el fondo genético y las características fisiológicas de los sujetos de estudio, también permitió analizar la respuesta individual bajo dos condiciones, lo cual aumenta la confiabilidad de los resultados y optimiza el tamaño de la muestra [13]. El concentrado de cocoa es una fuente primaria de (-)-epicatequina, es disponible y se consume en todo el mundo. El contenido de (-)-epicatequina varía entre productos, el concentrado de cocoa utilizado en el presente estudio contiene alrededor de cuatro veces más procianidinas y ocho veces más (-)-epicatequina que la cocoa convencional. La dosis consumida en este estudio está dentro de el rango de investigaciones previas [18, 85, 86] y aunque más alta que el consumo promedio poblacional, es considerada alcanzable a través de la dieta [16]. La biodisponibilidad de los polifenoles de cocoa consumidos a través de píldoras, se confirmó por cuantificación de metabolitos secundarios en muestras de plasma 2 h posterior al consumo de los tratamientos.

El perfil de metabolitos fue diferente entre individuos, en concordancia con publicaciones previas [16, 87]. La variación interindividual se ha atribuido a la absorción, distribución, metabolismo y excreción de los compuestos bioactivos, así como a la heterogeneidad en la respuesta biológica de los consumidores [88, 89]. En el presente estudio, las mujeres presentaron concentraciones ligeramente más elevadas de metabolitos circulantes que los hombres. Este fenómeno se ha descrito previamente tanto en modelos animales como en humanos [16]. A pesar de ello, los metabolitos más abundantes (E3G, E3S, E4G, 3MES) estuvieron distribuidos similarmente en todas las muestras y contribuyeron con casi el 85% del total de la concentración plasmática. El perfil de metabolitos se ha analizado en algunos estudios utilizando diferentes dosis, vehículos y métodos analíticos [16, 17, 87, 90]. Los resultados de nuestro estudio revelan un aumento similar en la concentración y patron de distribución que estudios previos, aunque la falta del estándar para 3'-O-Metil(-)-epicatequin-5-sulfato no nos permitió cuantificar este metabolito [17, 91]. La proporción de (-)-epicatequin glucurónidos en este estudio refleja los resultados de Rodriguez-Mateos et al. [85], posterior al consumo de una dosis similar de (-)-epicatequina y son ligeramente mayores que las concentraciones descritas por Ottaviani et al., [16, 87]. Como sugiere Actis-Goretta et al., el perfil

de distribución de los metabolitos podría estar influenciado por la cantidad de (-)-epicatequina consumida; el consumo de una dosis más alta de podría resultar en una concentración más de glucurónidos a expensas de sulfatos [17]. La concentración de metabolitos posterior a la suplementación crónica no fue diferente a la suplementación con una sola dosis (aguda).

La actividad antioxidante de los polifenoles de cocoa y de otros alimentos ricos en flavonoides es un tema controversial debido a la diversidad de resultados obtenidos en diferentes estudios [92]. En el presente estudio no se observaron diferencias en la capacidad antioxidante del plasma posterior al consumo agudo o crónico de cocoa. Ninguno de los metabolitos evaluados, o la suma de ellos, se relacionó a cambios en la capacidad antioxidante del plasma. La ausencia de cambios se puede deber a la baja biodisponibilidad de los flavanoles, algunos estudios han estimado que únicamente el 20% de los flavanoles consumidos vía oral se absorben en duodeno y son transferidos al torrente y órganos específicos como metabolitos de (-)-epicatequina en rangos que oscilan en valores nM, mientras que otros antioxidantes exógenos como la vitamina C se encuentra en rango mM. Además, los metabolitos identificados en plasma tienen menor capacidad antioxidante que los aglicones. En concordancia, hallazgos recientes de Ottaviani et al., demostraron la ausencia de productos de oxidación de (-)-epicatequina (orto-quinonas o aductos asociados a quinonas) posterior al consumo de (-)-epicatequina marcada radiactivamente en humanos, refutando la hipótesis de que los efectos sistémicos mediados por (-)-epicatequina se basan en mecanismos antioxidantes directos asociados a la transferencia de electrones [16]. Por el contrario, los flavanoles de cocoa podrían actuar a través de mecanismos antioxidantes indirectos, como consecuencia de la interacción entre antioxidantes exógenos como los metabolitos de (-)-epicatequina y estructuras de la membrana celular, que pueden resultar en la modulación vías de protección antioxidante endógena, caracterizadas por enzimas como la SOD, glutatión peroxidasa y catalasa [92-94]. Esta respuesta está relacionada a la regulación de genes de respuesta inflamatoria.

El cambio en la expresión de enzimas asociadas a respuesta antioxidante posterior al consumo de cocoa ha sido previamente descrito en animales y humanos [95, 96]. Los resultados del presente estudio demuestran que el consumo de una dosis única de cocoa (fase aguda) aumenta la expresión de SOD2 en PBMCs, este aumento fue mayor que el derivado del consumo diario durante cuatro semanas (fase crónica). Se han observado efectos similares posterior a suplementación durante tres meses con cocoa rica en (-)-epicatequina (100 mg) en biopsias de músculo esquelético de pacientes

con diabetes tipo 2 y falla cardíaca [96]. Es probable, que el consumo de (-)-epicatequina module la activación de factores de transcripción que promueven la respuesta antioxidante endógena. La SOD2 es una de las principales barreras antioxidantes del organismo y se expresa en la mitocondria, en donde se produce más del 70% de las ROS. El consumo diario de (-)-epicatequina fue capaz de aumentar indicadores de biogénesis mitocondrial y sistemas que regulan los niveles de estrés oxidativo, como SOD en células endoteliales [97]. Los datos del presente estudio sugieren que el efecto del consumo agudo de cocoa sobre el cambio en la expresión de un gen es mayor que el cambio posterior al consumo crónico. Un mayor tamaño de la muestra aumentaría el poder del estudio y esclarecería los efectos observados.

El efecto de los polifenoles de cocoa sobre la expresión de genes objetivo es un fenómeno ampliamente estudiado *in vitro* y en modelos animales [59, 60, 95, 98]. Sin embargo, a la fecha no se han identificado estudios de intervención que evalúen el efecto sobre el perfil de expresión global en humanos. Considerando que la magnitud del cambio en la expresión de SOD2 fue mayor en la fase aguda del estudio, analizamos el efecto que tenía el consumo de una sola dosis de cocoa sobre el perfil de expresión global, los resultados fueron comparados con el efecto en el mismo individuo, posterior al consumo de placebo. Debido a falta de estudios que utilizan catequinas como vehículo de intervención, los resultados del análisis de expresión global se discuten en el contexto de otros estudios clínicos bien realizados que evalúan el efecto de flavonoides similares, procedentes del aceite de oliva, semillas de uva y una mezcla de flavonoides y aceite de pescado en sujetos con diferentes fenotipos (por ejemplo: fumadores, hipertensos, obesos), durante periodos de tiempo más largos [93, 99-101]. La exposición a flavanoles de semillas de uva (200 mg) produjo cambios en la expresión de 864 genes de leucocitos en siete hombres fumadores, los cambios observados son sugerentes de una disminución en la adhesión celular al tejido endotelial [99]. En este estudio realizado por Tome-Carneiro et al. [93], en pacientes diabéticos tipo 2 e hipertensos con enfermedad arterial coronaria, se encontró que el consumo de un extracto de uva fortificado con resveratrol (8 mg) durante un año disminuyó la expresión de moléculas inflamatorias clave (*TNF- α* , *IL-1b*, *IL8*) en PBMCs. Vías de señalización similares (respuesta antiviral e inflamatoria) fueron moduladas en células de sangre periférica de mujeres obesas posterior al consumo de una mezcla de aceite de pescado y flavonoides que contenía epigallocatequina del té verde, quercetina, isoquercetina y omega-3 durante diez semanas [100]. Finalmente, el consumo de aceite de oliva durante tres semanas redujo la expresión de genes que participan en el sistema renina-angiotensina-aldosterona

(IL8RA, ADRB2, ACE, NR1H2) en PBMCs de individuos sanos [101]. La respuesta observada en el presente estudio es concordante con efectos previamente en la modificación de transcritos como IL8, IL8RA, ADRB2 y FPR1, y vías de señalización como la disminución de la producción de ROS y la activación de la respuesta viral de leucocitos. En el presente estudio, estos efectos fueron observados incluso después del consumo de una dosis única de cocoa de alto contenido en polifenoles. A pesar de las diferencias en el tiempo de exposición (dosis única vs repetitiva), en el estado de los participantes (sanos vs enfermos) y en el tipo de flavonoides, los resultados de los estudios antes mencionados convergen en una respuesta celular caracterizada por un efecto y disminución de la producción de ROS. Esta respuesta pareciera atenuar la activación y migración de células inmunes al endotelio, lo cuál puede estar asociado a beneficios inmunológicos y cardiovasculares subyacentes al consumo de cocoa [24]. Además, una vía asociada a la disminución de la respuesta viral se identificó en el presente y en estudios previos que evalúan el efecto de los flavonoides sobre la expresión en células sanguíneas [100], este efecto podría estar relacionado al aumento en factores que intervienen con la habilidad de los virus de infectar y replicarse dentro de las células posterior al consumo de flavonoides [100].

En el presente estudio se observó una respuesta en la expresión de genes variable intra- en inter-individualmente. Por ello, mientras que la lista de genes diferencialmente expresados posterior al consumo de cocoa no fue idéntica entre el Grupo 1 y el Grupo 2, ambos sugieren las mismas vías. Esta variación se ha rastreado a diferencias en las proporciones relativas de los diferentes subtipos celulares, al sexo y a la edad de los participantes [89, 102]. Sin embargo, es poco probable tener fluctuaciones en las frecuencias de los sub-tipos celulares posterior al consumo de una dosis única de cocoa [99, 100]. Las diferencias en la transcripción se deben, con mayor probabilidad, al perfil de expresión basal de los participantes, como lo sugiere el agrupamiento de la mayor parte de las muestras de cada individuo como vecino cercano (Figura 17). Las diferencias en la expresión de genes podría también reflejar la influencia de factores genéticos o ambientales [102]. Como lo propuso recientemente Manach *et al.* [89], el mayor desafío en el área nutrigenómica será el desarrollo de métodos y herramientas que permitan fenotipificar y estratificar a los individuos con base en su habilidad para responder al consumo de compuestos bioactivos en las plantas. En conjunto, los genes diferencialmente expresados en este estudio convergen en tres redes mayores de regulación: i. la disminución en la producción de ROS [FPR1, IL-8, Sestrina 3 (SESN3), CD36, HBA1/HBA2], ii. modulación del Ca^{2+} [(ADRB2, IL8, IL8RA, IL8RB, FPR1, Protein Tyrosine

Phosphatase, Receptor Type C (PTPRC), TPT1 HBA1/ HBA2, ORM1)], iii. modulación de la respuesta inflamatoria (IL8, PTPRC, TIGIT, TPT1, FPR1, IL8RA and IL8RB). La modulación de ROS mediada por calcio a través del consumo de metabolitos de (-)-epicatequina pareciera ser un mecanismo prominente a través del cuál estas sustancias puedan ejercer los efectos biológicos [71, 103]. Otros flavonoides también se han relacionado a este efecto en modelos *in vitro* y animales [104].

El presente estudio tiene diversas limitaciones. Primero, el análisis de expresión de genes se realizó en un subgrupo de participantes que tenían el conjunto de muestras completas y que cumplieron con los criterios para ser analizados por microarreglo. A pesar del reducido tamaño de la muestra y del poder insuficiente (68%), los cambios identificados en la expresión de genes concuerdan con los hallazgos de estudios previos que evalúan el efecto de otros polifenoles en muestras mas grandes o similares [93, 99, 100]. El perfil de expresión de cada tratamiento sugiere diferencias claras en los efectos observados y la validación de los resultados utilizando qPCR en tiempo real confirma estos hallazgos. Una segunda limitación del estudio es que el análisis de la expresión de genes se realizó en PBMCs que incluyen sub-grupos de células funcionales, y que no reflejan necesariamente el efecto de los metabolitos en otros tejidos. Sin embargo, estas células se han utilizado extensamente para investigar el efecto de intervenciones dietéticas [105]. Una tercera limitante es el uso de un extracto de cocoa que contiene otros compuestos además de polifenoles. Mientras que la evidencia previa sugiere que la (-)-epicatequina es la cause de los efectos observados, el extracto de cocoa contiene una amplia gama de polifenoles y otros compuestos bioactivos como la teobromina, y no podemos descartar la contribución de estos compuestos a los efectos observados. Como fortalezas del estudio, el diseño cruzado permite comparar la respuesta individual bajo dos tratamientos, lo cual permite controlar por factores de confusión que aumentan la variabilidad de los cambios observados. El análisis simultáneo de los metabolitos conjugados y la capacidad antioxidante del plasma provee información sobre la falta de asociación entre estas medidas. Este estudio confirma que los cambios en la expresión de genes puede ocurrir posterior al consumo de una dosis única de polifenoles en un corto periodo de tiempo.

La caracterización de la respuesta individual al consumo de polifenoles requiere futura investigación ya que se han identificado respondedores y no respondedores en estudios previos

[89]. Se recomienda evaluar el efecto del consumo de polifenoles sobre el cambio en la expresión de genes a corto y largo plazo utilizando tamaños de muestra más grandes.

10. CONCLUSIÓN

En conclusión, el consumo de cocoa rico en polifenoles aumentó la concentración de metabolitos derivados de (-)-epicatequina en plasma 2 h después de su consumo agudo y crónico sin cambios en la capacidad antioxidante del plasma en las muestras de estudio. La respuesta transcripcional observada en este estudio se caracterizó por una expresión diferencial moderada de genes asociados a inflamación que converge en tres mayores redes: la disminución de la producción de ROS, la modulación del Ca^{2+} , y la modulación de la respuesta inflamatoria. Estas vías se han asociado a los efectos biológicos de otros polifenoles y pueden contribuir a explicar los efectos conocidos del consumo de cocoa.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Scalbert, A., I.T. Johnson, and M. Saltmarsh, *Polyphenols: antioxidants and beyond*. Am J Clin Nutr, 2005. **81**(1 Suppl): p. 215S-217S.
2. Manach, C., et al., Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. Am J Clin Nutr, 2005. **81**(1 Suppl): p. 230S-242S.
3. Pandey, K.B. and S.I. Rizvi, Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2009. **2**(5): p. 270-278.
4. Vogiatzoglou, A., et al., Flavonoid Intake in European Adults (18 to 64 Years). Plos One, 2015. **10**(5).
5. Tsao, R., Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2010. **2**(12): p. 1231-46.
6. Kumar, S. and A.K. Pandey, Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *ScientificWorldJournal*, 2013. **2013**: p. 162750.
7. Magrone, T., M.A. Russo, and E. Jirillo, Cocoa and Dark Chocolate Polyphenols: From Biology to Clinical Applications. *Front Immunol*, 2017. **8**: p. 677.
8. Heiss, C., C.L. Keen, and M. Kelm, Flavanols and cardiovascular disease prevention. *Eur Heart J*, 2010. **31**(21): p. 2583-92.
9. Tomas-Barberan, F.A., et al., A new process to develop a cocoa powder with higher flavonoid monomer content and enhanced bioavailability in healthy humans. *J Agric Food Chem*, 2007. **55**(10): p. 3926-35.
10. Coe, S.D. and M.D. Coe, *The true history of chocolate*. 1996, New York: Thames and Hudson. 280 p.
11. Dillinger, T.L., et al., Food of the gods: cure for humanity? A cultural history of the medicinal and ritual use of chocolate. *J Nutr*, 2000. **130**(8S Suppl): p. 2057S-72S.
12. Jolic, S.M., et al., Changes of phenolic compounds and antioxidant capacity in cocoa beans processing. *International Journal of Food Science and Technology*, 2011. **46**(9): p. 1793-1800.
13. Vogiatzoglou, A., et al., Assessment of the dietary intake of total flavan-3-ols, monomeric flavan-3-ols, proanthocyanidins and theaflavins in the European Union. *British Journal of Nutrition*, 2014. **111**(8): p. 1463-1473.
14. Galvan-Portillo, M.V., et al., Assessing phytochemical intake in a group of Mexican women. *Salud Publica Mex*, 2007. **49**(2): p. 126-31.
15. Tzounis, X., et al., Prebiotic evaluation of cocoa-derived flavanols in healthy humans by using a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2011. **93**(1): p. 62-72.
16. Ottaviani, J.I., et al., The metabolome of [2-(14)C](-)-epicatechin in humans: implications for the assessment of efficacy, safety, and mechanisms of action of polyphenolic bioactives. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 29034.
17. Actis-Goretta, L., et al., Elucidation of (-)-epicatechin metabolites after ingestion of chocolate by healthy humans. *Free Radic Biol Med*, 2012. **53**(4): p. 787-95.
18. Rodriguez-Mateos, A., et al., Uptake and metabolism of (-)-epicatechin in endothelial cells. *Arch Biochem Biophys*, 2014. **559**: p. 17-23.
19. Barnett, C.F., et al., Pharmacokinetic, partial pharmacodynamic and initial safety analysis of (-)-epicatechin in healthy volunteers. *Food Funct*, 2015. **6**(3): p. 824-33.
20. Corti, R., et al., Cocoa and cardiovascular health. *Circulation*, 2009. **119**(10): p. 1433-41.
21. Buitrago-Lopez, A., et al., Chocolate consumption and cardiometabolic disorders: systematic review and meta-analysis. *BMJ*, 2011. **343**: p. d4488.

22. Andujar, I., et al., Cocoa Polyphenols and Their Potential Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012.
23. Blumberg, J.B., et al., The Science of Cocoa Flavanols: Bioavailability, Emerging Evidence, and Proposed Mechanisms. *Advances in Nutrition*, 2014. **5**(5): p. 547-549.
24. Keen, C.L., et al., Cocoa antioxidants and cardiovascular health. *Am J Clin Nutr*, 2005. **81**(1 Suppl): p. 298S-303S.
25. Macready, A.L., et al., Flavonoids and cognitive function: a review of human randomized controlled trial studies and recommendations for future studies. *Genes Nutr*, 2009. **4**(4): p. 227-42.
26. Perez-Cano, F.J. and M. Castell, Flavonoids, Inflammation and Immune System. *Nutrients*, 2016. **8**(10).
27. Buijsse, B., et al., Chocolate consumption in relation to blood pressure and risk of cardiovascular disease in German adults. *Eur Heart J*, 2010. **31**(13): p. 1616-23.
28. Hollenberg, N.K., et al., Age, renal perfusion and function in island-dwelling indigenous Kuna Amerinds of Panama. *Nephron*, 1999. **82**(2): p. 131-8.
29. Hollenberg, N.K., et al., Stress and blood pressure in Kuna Amerinds. *J Clin Hypertens (Greenwich)*, 2005. **7**(12): p. 714-20.
30. McCullough, M.L., et al., Hypertension, the Kuna, and the epidemiology of flavanols. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2006. **47 Suppl 2**: p. S103-9; discussion 119-21.
31. Hollenberg, N.K., N.D. Fisher, and M.L. McCullough, Flavanols, the Kuna, cocoa consumption, and nitric oxide. *J Am Soc Hypertens*, 2009. **3**(2): p. 105-12.
32. Buijsse, B., et al., Cocoa intake, blood pressure, and cardiovascular mortality: the Zutphen Elderly Study. *Arch Intern Med*, 2006. **166**(4): p. 411-7.
33. Janszky, I., et al., Chocolate consumption and mortality following a first acute myocardial infarction: the Stockholm Heart Epidemiology Program. *J Intern Med*, 2009. **266**(3): p. 248-57.
34. di Giuseppe, R., et al., Regular consumption of dark chocolate is associated with low serum concentrations of C-reactive protein in a healthy Italian population. *Journal of Nutrition*, 2008. **138**(10): p. 1939-1945.
35. Matsumoto, C., et al., Chocolate consumption and risk of diabetes mellitus in the Physicians' Health Study. *Am J Clin Nutr*, 2015. **101**(2): p. 362-7.
36. Strandberg, T.E., et al., Chocolate, well-being and health among elderly men. *Eur J Clin Nutr*, 2008. **62**(2): p. 247-53.
37. Djousse, L., et al., Chocolate consumption is inversely associated with prevalent coronary heart disease: the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study. *Clin Nutr*, 2011. **30**(2): p. 182-7.
38. Katz, D.L., K. Doughty, and A. Ali, Cocoa and chocolate in human health and disease. *Antioxid Redox Signal*, 2011. **15**(10): p. 2779-811.
39. Lin, X., et al., Cocoa Flavanol Intake and Biomarkers for Cardiometabolic Health: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J Nutr*, 2016. **146**(11): p. 2325-2333.
40. Hanhineva, K., et al., Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *Int J Mol Sci*, 2010. **11**(4): p. 1365-402.
41. Mellor, D.D., et al., High-cocoa polyphenol-rich chocolate improves HDL cholesterol in Type 2 diabetes patients. *Diabet Med*, 2010. **27**(11): p. 1318-21.
42. Baba, S., et al., Plasma LDL and HDL cholesterol and oxidized LDL concentrations are altered in normo- and hypercholesterolemic humans after intake of different levels of cocoa powder. *J Nutr*, 2007. **137**(6): p. 1436-41.

43. Baba, S., et al., Continuous intake of polyphenolic compounds containing cocoa powder reduces LDL oxidative susceptibility and has beneficial effects on plasma HDL-cholesterol concentrations in humans. *Am J Clin Nutr*, 2007. **85**(3): p. 709-17.
44. Stote, K.S., et al., Effect of cocoa and green tea on biomarkers of glucose regulation, oxidative stress, inflammation and hemostasis in obese adults at risk for insulin resistance. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2012. **66**(10): p. 1153-1159.
45. Grassi, D., et al., Short-term administration of dark chocolate is followed by a significant increase in insulin sensitivity and a decrease in blood pressure in healthy persons. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2005. **81**(3): p. 611-614.
46. Grassi, D., et al., Cocoa reduces blood pressure and insulin resistance and improves endothelium-dependent vasodilation in hypertensives. *Hypertension*, 2005. **46**(2): p. 398-405.
47. Triche, E.W., et al., Chocolate consumption in pregnancy and reduced likelihood of preeclampsia. *Epidemiology*, 2008. **19**(3): p. 459-64.
48. Heiss, C., et al., Vascular effects of cocoa rich in flavan-3-ols. *JAMA*, 2003. **290**(8): p. 1030-1.
49. Taubert, D., et al., Effects of low habitual cocoa intake on blood pressure and bioactive nitric oxide - A randomized controlled trial. *Jama-Journal of the American Medical Association*, 2007. **298**(1): p. 49-60.
50. Hooper, L., et al., Effects of chocolate, cocoa, and flavan-3-ols on cardiovascular health: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Am J Clin Nutr*, 2012. **95**(3): p. 740-51.
51. Grassi, D., et al., Cocoa consumption dose-dependently improves flow-mediated dilation and arterial stiffness decreasing blood pressure in healthy individuals. *J Hypertens*, 2015. **33**(2): p. 294-303.
52. Vazquez-Agell, M., et al., Cocoa consumption reduces NF-kappaB activation in peripheral blood mononuclear cells in humans. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2013. **23**(3): p. 257-63.
53. Monagas, M., et al., Effect of cocoa powder on the modulation of inflammatory biomarkers in patients at high risk of cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*, 2009. **90**(5): p. 1144-50.
54. Mathur, S., et al., Cocoa products decrease low density lipoprotein oxidative susceptibility but do not affect biomarkers of inflammation in humans. *J Nutr*, 2002. **132**(12): p. 3663-7.
55. Wang-Polagruto, J.F., et al., Chronic consumption of flavanol-rich cocoa improves endothelial function and decreases vascular cell adhesion molecule in hypercholesterolemic postmenopausal women. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2006. **47 Suppl 2**: p. S177-86; discussion S206-9.
56. Joshipura, K.J., et al., The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease. *Ann Intern Med*, 2001. **134**(12): p. 1106-14.
57. Ramiro, E., et al., Flavonoids from theobroma cacao down-regulate inflammatory mediators. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005. **53**(22): p. 8506-8511.
58. Maskarinec, G., Cancer protective properties of cocoa: a review of the epidemiologic evidence. *Nutr Cancer*, 2009. **61**(5): p. 573-9.
59. Mao, T., et al., Cocoa procyanidins and human cytokine transcription and secretion. *J Nutr*, 2000. **130**(8S Suppl): p. 2093S-9S.
60. Mao, T.K., et al., Modulation of TNF- α Secretion in Peripheral Blood Mononuclear Cells by Cocoa Flavanols and Procyanidins. *Developmental Immunology*, 2002. **9**(3): p. 135-141.
61. Moreno-Ulloa, A., et al., The effects of (-)-epicatechin on endothelial cells involve the G protein-coupled estrogen receptor (GPER). *Pharmacol Res*, 2015. **100**: p. 309-20.
62. Ramiro-Puig, E., et al., Cocoa-enriched diet enhances antioxidant enzyme activity and modulates lymphocyte composition in thymus from young rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007. **55**(16): p. 6431-6438.

63. Ramiro-Puig, E., et al., Spleen lymphocyte function modulated by a cocoa-enriched diet. *Clinical and Experimental Immunology*, 2007. **149**(3): p. 535-542.
64. Ramos-Romero, S., et al., Cocoa intake attenuates oxidative stress associated with rat adjuvant arthritis. *Pharmacol Res*, 2012. **66**(3): p. 207-12.
65. Ramiro-Puig, E., et al., Intestinal immune system of young rats influenced by cocoa-enriched diet. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2008. **19**(8): p. 555-565.
66. Sanbongi, C., N. Suzuki, and T. Sakane, Polyphenols in chocolate, which have antioxidant activity, modulate immune functions in humans in vitro. *Cell Immunol*, 1997. **177**(2): p. 129-36.
67. Al-Hanbali, M., et al., Epicatechin suppresses IL-6, IL-8 and enhances IL-10 production with NF-kappa B nuclear translocation in whole blood stimulated system. *Neuroendocrinology Letters*, 2009. **30**(1): p. 131-138.
68. Mackenzie, G.G., et al., Epicatechin, catechin, and dimeric procyanidins inhibit PMA-induced NF-kappaB activation at multiple steps in Jurkat T cells. *FASEB J*, 2004. **18**(1): p. 167-9.
69. Ramiro, E., et al., Effect of Theobroma cacao flavonoids on immune activation of a lymphoid cell line. *Br J Nutr*, 2005. **93**(6): p. 859-66.
70. Perez-Cano, F.J., et al., The effects of cocoa on the immune system. *Front Pharmacol*, 2013. **4**: p. 71.
71. Fraga, C.G. and P.I. Oteiza, Dietary flavonoids: Role of (-)-epicatechin and related procyanidins in cell signaling. *Free Radic Biol Med*, 2011. **51**(4): p. 813-23.
72. Steffen, Y., T. Schewe, and H. Sies, (-)-Epicatechin elevates nitric oxide in endothelial cells via inhibition of NADPH oxidase. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. **359**(3): p. 828-33.
73. Craig, C.L., et al., International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity. *Med Sci Sports Exerc*, 2003. **35**(8): p. 1381-95.
74. Lohman, T.G., A.F. Roche, and R. Martorell, *Anthropometric standardization reference manual*. Abridged ed. 1991, Champaign, Ill.: Human Kinetics Books. vi, 90 p.
75. Faul, F., et al., G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods*, 2007. **39**(2): p. 175-91.
76. Morey, J.S., J.C. Ryan, and F.M. Van Dolah, Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. *Biol Proced Online*, 2006. **8**: p. 175-93.
77. Irizarry, R.A., et al., Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res*, 2003. **31**(4): p. e15.
78. Bolstad, B.M., et al., A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*, 2003. **19**(2): p. 185-93.
79. Smyth, G.K., Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol*, 2004. **3**: p. Article3.
80. Ritchie, M.E., et al., limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res*, 2015. **43**(7): p. e47.
81. Benjamini, Y., et al., Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav Brain Res*, 2001. **125**(1-2): p. 279-84.
82. Suzuki, R. and H. Shimodaira, Pvcust: an R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering. *Bioinformatics*, 2006. **22**(12): p. 1540-2.
83. Kramer, A., et al., Causal analysis approaches in Ingenuity Pathway Analysis. *Bioinformatics*, 2014. **30**(4): p. 523-30.
84. Lakens, D., Calculating and reporting effect sizes to facilitate cumulative science: a practical primer for t-tests and ANOVAs. *Front Psychol*, 2013. **4**: p. 863.

85. Rodriguez-Mateos, A., et al., Interactions between cocoa flavanols and inorganic nitrate: additive effects on endothelial function at achievable dietary amounts. *Free Radic Biol Med*, 2015. **80**: p. 121-8.
86. Vogiatzoglou, A., et al., Associations between flavan-3-ol intake and CVD risk in the Norfolk cohort of the European Prospective Investigation into Cancer (EPIC-Norfolk). *Free Radical Biology and Medicine*, 2015. **84**: p. 1-10.
87. Franconi, F. and I. Campesi, Pharmacogenomics, pharmacokinetics and pharmacodynamics: interaction with biological differences between men and women. *Br J Pharmacol*, 2014. **171**(3): p. 580-94.
88. Waxman, D.J. and M.G. Holloway, Sex differences in the expression of hepatic drug metabolizing enzymes. *Mol Pharmacol*, 2009. **76**(2): p. 215-28.
89. Manach, C., et al., Addressing the inter-individual variation in response to consumption of plant food bioactives: Towards a better understanding of their role in healthy aging and cardiometabolic risk reduction. *Mol Nutr Food Res*, 2017. **61**(6).
90. Lotito, S.B. and B. Frei, Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon? *Free Radic Biol Med*, 2006. **41**(12): p. 1727-46.
91. Actis-Goretta, L., et al., Identification of O-methyl(-)-epicatechin-O-sulphate metabolites by mass-spectrometry after O-methylation with trimethylsilyldiazomethane. *J Chromatogr A*, 2012. **1245**: p. 150-7.
92. Wiswedel, I., et al., Flavanol-rich cocoa drink lowers plasma F(2)-isoprostane concentrations in humans. *Free Radic Biol Med*, 2004. **37**(3): p. 411-21.
93. Tome-Carneiro, J., et al., One-year supplementation with a grape extract containing resveratrol modulates inflammatory-related microRNAs and cytokines expression in peripheral blood mononuclear cells of type 2 diabetes and hypertensive patients with coronary artery disease. *Pharmacol Res*, 2013. **72**: p. 69-82.
94. Chen, L., et al., Intracellular signaling pathways of inflammation modulated by dietary flavonoids: The most recent evidence. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2017: p. 1-17.
95. Ramiro-Puig, E., et al., Cocoa-enriched diet enhances antioxidant enzyme activity and modulates lymphocyte composition in thymus from young rats. *J Agric Food Chem*, 2007. **55**(16): p. 6431-8.
96. Ramirez-Sanchez, I., et al., (-)-Epicatechin rich cocoa mediated modulation of oxidative stress regulators in skeletal muscle of heart failure and type 2 diabetes patients. *Int J Cardiol*, 2013. **168**(4): p. 3982-3990.
97. Ramirez-Sanchez, I., et al., (-)-Epicatechin-induced recovery of mitochondria from simulated diabetes: Potential role of endothelial nitric oxide synthase. *Diab Vasc Dis Res*, 2016. **13**(3): p. 201-10.
98. Ramiro-Puig, E. and M. Castell, Cocoa: antioxidant and immunomodulator. *Br J Nutr*, 2009. **101**(7): p. 931-40.
99. Milenkovic, D., et al., Dietary flavanols modulate the transcription of genes associated with cardiovascular pathology without changes in their DNA methylation state. *PLoS One*, 2014. **9**(4): p. e95527.
100. Cialdella-Kam, L., et al., A Mixed Flavonoid-Fish Oil Supplement Induces Immune-Enhancing and Anti-Inflammatory Transcriptomic Changes in Adult Obese and Overweight Women-A Randomized Controlled Trial. *Nutrients*, 2016. **8**(5).
101. Martin-Pelaez, S., et al., Effect of olive oil phenolic compounds on the expression of blood pressure-related genes in healthy individuals. *Eur J Nutr*, 2017. **56**(2): p. 663-670.

102. Whitney, A.R., et al., Individuality and variation in gene expression patterns in human blood. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(4): p. 1896-901.
103. Verstraeten, S.V., et al., (-)-Epicatechin and related procyanidins modulate intracellular calcium and prevent oxidation in Jurkat T cells. *Free Radic Res*, 2008. **42**(10): p. 864-72.
104. Kim, J., et al., Cocoa phytochemicals: recent advances in molecular mechanisms on health. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2014. **54**(11): p. 1458-72.
105. Afman, L., D. Milenkovic, and H.M. Roche, Nutritional aspects of metabolic inflammation in relation to health--insights from transcriptomic biomarkers in PBMC of fatty acids and polyphenols. *Mol Nutr Food Res*, 2014. **58**(8): p. 1708-20.



CONSENTIMIENTO INFORMADO

Identificación del proyecto de investigación: 11.21.NRC (DUND-100174)

Patrocinador: Nestec Ltd
Avenue Nestlé 55
CH-1800 Vevey
Switzerland

No. de participante: _____

Nombre del participante: _____

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 de estudio.

1. TÍTULO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

«Mecanismos genéticos y epigenéticos asociados a los beneficios de la cocoa»

2. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO DEL ESTUDIO

Los polifenoles son una variedad de compuestos encontrados en los alimentos de origen vegetal, como en té y uvas, y su consumo se ha relacionado a la prevención de enfermedades crónicas. La cocoa contiene polifenoles activos que confieren beneficios a la salud. En este estudio queremos estudiar aproximadamente 40 sujetos sanos de entre 18 y 40 años, no embarazadas o en periodo de lactancia en el caso de las mujeres, que no consuman medicamentos de ningún tipo, ni suplementos vitamínicos por lo menos un mes antes de iniciar el estudio; a consumir un concentrado de polifenoles de cocoa. El objetivo de este estudio es investigar si el consumo de un suplemento de cocoa rico en polifenoles afecta la función de sus células sanguíneas, y/u otros factores importantes para la salud.

Se le extraerá sangre y de las células presentes en su sangre se analizará cómo el tratamiento con cocoa rico en polifenoles afecta la actividad de sus células. Para ello se aislará de sus células sanguíneas ADN (ácido desoxirribonucleico) y ARN (ácido ribonucleico). Una vez realizadas estas determinaciones, el ADN será almacenado en el Biobanco del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) y en Nestec Ltd. y podrá ser usado para estudios similares a este. Su nombre no aparecerá en ninguna otra prueba genómica; su muestra de sangre no tendrá ningún tipo de información personal, será codificada con un número de serie para evitar cualquier posibilidad de ser identificado. Una vez que comience el estudio, sus muestras no podrán serle devueltas. El código que identifica su muestra estará disponible únicamente para los investigadores titulares del

proyecto, quienes están obligados por ley a mantener estos datos confidenciales. Los códigos serán guardados en un archivero con llave en una oficina INMEGEN y Nestec Ltd. bajo estrictas medidas de seguridad. El acceso a esta oficina será permitido únicamente a los investigadores principales del proyecto. Todos los datos que se obtengan durante el estudio serán guardados con las mismas medidas de seguridad y confidencialidad, y solo los investigadores responsables tendrán acceso a la información que contiene su nombre. Si decide participar en este estudio, se le tomarán muestras de sangre de la vena de su brazo en dos ocasiones por visita bajo condiciones de ayuno; una antes y otra dos horas después del consumo del suplemento de cocoa rico en polifenoles. Usted tendrá que asistir a la clínica en tres ocasiones durante cinco semanas. Durante su segunda visita a la clínica se le proveerán suficientes suplementos para consumir durante las próximas cuatro semanas del estudio.

No se cobrará por ninguna de las pruebas realizadas, ni se le dará a cambio dinero por su participación en el estudio. En cambio, usted recibirá los resultados de su análisis de sangre, un estudio de su dieta y composición corporal. Los suplementos serán proporcionados sin ningún costo. Durante su última visita a la clínica usted recibirá los resultados de su estudio y la orientación nutricional necesaria.

3. PROTOCOLO DE ESTUDIO Y PROCEDIMIENTOS

Lea por favor los siguientes puntos en donde se explica el protocolo y procedimientos del estudio.

- 3.1. El estudio consistirá en tres consultas durante cinco semanas. Todas las mediciones y tomas de muestras se realizarán en ayuno. La consulta inicial durará 3 horas aproximadamente. Durante esta consulta, se le tomarán dos muestras de sangre del brazo de 25 ml, una antes y otra 2 horas después de haber consumido el suplemento de cocoa o el placebo. Se le pedirá que proporcione información referente a su historia clínica, así como información referente a sus hábitos de dieta y de ejercicio, se le tomarán medidas antropométricas (peso, talla, circunferencia de cintura) y, por último, se le hará una evaluación de composición corporal. La segunda consulta se realizará una semana después y tendrá una duración de 2 horas. Durante esta consulta se le tomarán otras dos muestras de sangre del brazo de 25 ml, una antes y otra 2 horas después del consumo del suplemento de cocoa o el placebo, también se le entregarán los suplementos necesarios para que los consuma en el transcurso de las próximas cuatro semanas. En la tercera y última visita se repetirá el proceso de toma de muestras; antes y 2 horas después del consumo del suplemento de cocoa, también se realizará una segunda medición de composición corporal. Todas las consultas serán dentro de la Clínica de Nutrición de la Universidad Iberoamericana plantel Santa Fe.
- 3.2. El día de la tercer visita a la clínica, usted tendrá que entregarle al encargado de la investigación el frasco que contiene los suplementos que no consumió.
- 3.3. En la primera visita a la clínica se le pedirá que se ponga una bata desechable para hacer mediciones corporales. El peso se medirá en báscula, la estatura en estadímetro, se medirá la circunferencia de cintura y analizará la composición corporal mediante impedancia bioeléctrica con el equipo InBody.
- 3.4. En cada visita, un profesional de la salud le tomará una muestra de sangre en ayuno y una muestra dos horas posteriores al consumo de suplemento de 25 ml de sangre cada una (aproximadamente 2.5 cucharadas de sangre). Todo el material será nuevo y desechable. Cualquier molestia deberá ser reportada de inmediato al personal a cargo de este estudio.
- 3.5. Una sola vez, se le realizarán cuestionarios enfocados a conocer su historia clínica, hábitos alimenticios y actividad física.

- 3.6. Se le entregarán los resultados de sus estudios de sangre, de orientación alimentaria y contará con seguimiento nutricional durante el tiempo que dure el estudio.
- 3.7. El estudio será llevado a cabo bajo la dosis segura de suplementación con polifenoles de cocoa. La dosis será proporcionada por el investigador. Usted tomará una dosis al día del suplemento de cocoa durante 4 semanas. Durante el tiempo que dure el estudio usted no debe cambiar su alimentación o ningún otro hábito.
- 3.8. La muestra de sangre se utilizará para aislar RNA que se usará para estudios de expresión de genes, así mismo se extraerá DNA para análisis de metilación.

4. POSIBLES RIESGOS ASOCIADOS

No se espera toxicidad alguna con la dosis administrada durante el estudio. Los efectos gastrointestinales adversos (por ejemplo: náusea, malestar intestinal, estreñimiento, malestar estomacal, etc.) serán monitoreados. Probablemente haya molestia o moretón en la zona del brazo en donde se tomó la muestra de sangre.

5. BENEFICIOS

- Evaluación nutricional gratuita durante el estudio.
- Examen de laboratorio de perfil de lípidos y glucosa gratuitos.
- Estudio de composición corporal por impedancia bioeléctrica en equipo InBody.
- Orientación alimentaria de acuerdo a los resultados del estudio.

6. ¿QUÉ PASA SI SE REALIZAN NUEVOS DESCUBRIMIENTOS Y SE COMPARTEN LOS RESULTADOS?

Existe la posibilidad de que, mientras se esté llevando a cabo el estudio, surja información nueva que afecte el objetivo principal de lo que se está estudiando. Si esto sucede, se le informará y se le preguntará si desea continuar en el estudio. Si decide no continuar, se harán los trámites necesarios para que su póliza de seguro médico (si es que tiene alguna) no refleje cambios y su acceso a otros servicios médicos no se vea afectado.

Así mismo, nosotros nos reservamos el derecho a suspender su participación en el estudio si consideramos que es lo mejor para usted. Si su participación termina de manera temprana, se le puede pedir que regrese para realizarle análisis y procedimientos finales para su seguridad.

Si por cualquier motivo el estudio termina, se le informará con anticipación.

Usted es libre de finalizar el estudio en cualquier momento, sin necesidad de dar ningún motivo ni incurrir en ninguna responsabilidad.

7. CONFIDENCIALIDAD

Toda la información recopilada durante el estudio será manejada con estricta confidencialidad. Solo las personas que están directamente relacionadas con el estudio tendrán la información que permite identificarlo, esta información no será otorgada a nadie más.

Las muestras de sangre recolectadas serán utilizadas para el análisis de ADN, ARN e identificación de moléculas en plasma y podrán ser empleadas en estudios similares a este.

El expediente médico y la información obtenida durante el estudio serán revisados por representantes autorizados de Nestlé. Únicamente el código de individuo que le fue

asignado, así como sus iniciales serán entregados a Nestlé. Así mismo, la información y los expedientes pueden ser revisados por la Comisión de Ética en Investigación y probablemente por otras Autoridades Regulatorias. Consecuentemente, usted deberá autorizarnos a entregar sus registros médicos a Nestlé, sus empleados o agentes, a las Autoridades de Salud Regulatorias Nacionales y Extranjeras, y a la Comisión de Ética en Investigación. Estos registros serán utilizados por ellos únicamente en relación al cumplimiento de las obligaciones concernientes a este estudio.

Toda la información o análisis que resulten de este estudio y que conciernan a su estado de salud, se mantendrán en estricta confidencialidad. Usted será informado de cualquier descubrimiento de importancia relacionado a su estado de salud durante el periodo del estudio pero, sin su permiso escrito, esta información no será revelada a terceras partes adicionales a las ya mencionadas. La única excepción a esta regla será en caso de identificar una enfermedad transmisible, en donde por obligación legal se deberá de informar al Departamento de Salud. En este caso, usted será informado de nuestra intención de revelar dicha información a las agencias autorizadas.

8. ¿A QUIÉN CONTACTAR?

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 está encargada de la Comisión de Ética en Investigación (CEI) 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 tel. 53501900 ext. 1145.

9. RESTRICCIONES REGULATORIAS

Este estudio ha sido aprobado por la Comisión de Ética en Investigación el 2 de Marzo de 2012.

El estudio se ha estructurado en concordancia con la **Declaración de Helsinki** (última modificación: Octubre 2008, www.conamed.gob.mx/prof_salud/pdf/helsinki.pdf), que se ocupa de las recomendaciones que guían al personal de salud en las investigaciones biomédicas con seres humanos de acuerdo al Reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación para la Salud (www.salud.gob.mx/unidades/cdi/legis/lgs/index-t1.htm). Se le puede otorgar una copia si usted lo desea.

Una descripción de este ensayo clínico estará disponible en <http://www.ClinicalTrials.gov>, como lo requiere la Ley de EE.UU.. Este sitio Web no incluirá información que le pueda identificar. A lo sumo, el sitio web incluirá un resumen de los resultados. Puede buscar en este sitio web, en cualquier momento.

Nestlé ha contratado una aseguradora (Zurich Insurance Company) que cubre cualquier daño a la salud que tengan los participantes únicamente como consecuencia de su participación en este estudio. Se le ha otorgado una copia del certificado de seguro a la Comisión de Ética en Investigación.

FORMA DE CONSENTIMIENTO

Título del estudio: **«Mecanismos genéticos y epigenéticos asociados a los beneficios de la cocoa»**

Número del estudio: 11.21.NRC

Nombre de la investigadora: 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. También entiendo que puede retirarme del estudio en cualquier momento si así lo deseo y que no habrá consecuencias por esto.
- 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 otras investigaciones similares a esta.
- Entiendo que la cobertura del seguro médico que ampara esta investigación cubre únicamente daños a la salud asociados a mi participación en este estudio.
- 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.

| |
|---|
| Fecha: Nombre y firma del participante |
| Fecha: Nombre y firma del testigo 2 |

| |
|--|
| Fecha: Nombre y firma del testigo 1 |
| Fecha: Firma del investigador principal |

PADECIMIENTOS ACTUALES

MEDICAMENTOS EN EL ÚLTIMO MES

| MEDICAMENTO | DOSIS | TIEMPO |
|-------------|-------|--------|
| | | |
| | | |
| | | |

ALERGIAS O REACCIONES A MEDICAMENTOS

| MEDICAMENTO | REACCIÓN |
|-------------|----------|
| | |
| | |
| | |

CIRUGÍAS

| OPERACIÓN | FECHA |
|-----------|-------|
| | |
| | |
| | |

ASPECTOS GINECOLÓGICOS

Número de embarazos: _____ Fecha de la última menstruación: _____
Día / Mes / Año

ESTILO DE VIDA

Tabaquismo

Nunca he fumado: _____ Lo he dejado (Fecha): _____
Día / Mes / Año

Fumador ocasional (Número de cigarros): _____
Semana Mes

Fumador ocasional, nunca fumador diario: Sí No
 Fumador ocasional, antes fumador diario: Sí No Tiempo: _____
 Fumador actual: _____
 Meses
 Número de cigarros / día: _____ Número de años: _____

Alcohol

¿Toma bebidas alcohólicas? Sí No Número de bebidas: _____
 Semana Mes

Toxicomanías

¿Consume alguna droga? Sí No Especificar: _____

Alimentos

¿Con qué frecuencia consume los siguientes alimentos o bebidas?
 (Tazas de aprox. 240 ml)

| ALIMENTO | DÍA | SEMANA | MES | NUNCA |
|--------------------------|-----|--------|-----|-------|
| Café | | | | |
| Té (verde, negro o rojo) | | | | |
| Vino tinto | | | | |
| Chocolate amargo | | | | |
| Manzana | | | | |
| Pera | | | | |
| Otras frutas | | | | |

Observaciones: _____

COMPOSICIÓN CORPORAL Y ANTROPOMETRÍA DEL PACIENTE

Esta sección deberá de ser llenada únicamente por los investigadores.

Fecha: _____

Código del paciente: _____

Antropometría

| DATOS | UNIDADES | | OBSERVACIONES |
|------------------------|-----------|-----------|---------------|
| | BodPod | InBody | |
| Peso | kg | kg | |
| Talla | cm | cm | |
| IMC | kg / m | kg / m | |
| CC | cm | cm | |
| Grasa corporal | % | % | |
| Masa grasa | kg | kg | |
| Masa libre de grasa | kg | kg | |

Observaciones: _____

Persona que realizó la evaluación: _____

RECORDATORIO DE 24 HORAS P# _____ Iniciales _____

Entrevistador: _____

Fecha de aplicación: _____

Visita No. _____

Recordatorio del día: _____

| Tiempo de comida | Platillo | Ingredientes/preparación | Equivalentes |
|-------------------------------------|-----------------|---------------------------------|---------------------|
| Desayuno Hora: | | | |
| Colación matutina Hora: | | | |
| Comida Hora: | | | |
| Colación vespertina Hora: | | | |
| Cena Hora: | | | |

NRC 11.16 Entrevistador _____ Fecha _____

| FRECUENCIA DE CONSUMO | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|---|-----------------------|---|--------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | ALIMENTO FRUTAS | NUNCA (0) | MEN OS DE UNA VEZ AL MES (1) | VEC ES AL MES 1-3 (2) | VECES A LA SEMANA | | | VECES AL DIA | | | | |
| | | | | | 1 (3) | 2-4 (4) | 5-6 (5) | 1 (6) | 2-3 (7) | 4-5 (8) | 6 (9) | |
| 8 | UN PLATANO | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 9 | UNA NARANJA | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 10 | UN VASO CON JUGO DE NARANJA O TORONJA | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 11 | UNA REBANADA DE MELON | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 12 | UNA MANZANA FRESCA | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 13 | UNA REBANADA DE SANDIA | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 14 | UNA REBANADA DE PIÑA | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 15 | UNA REBANADA DE PAPAYA | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 16 | UNA PERA | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 17 | UN MANGO | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 18 | UNA MANDARINA | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 19 | UNA PORCION DE FRESAS (± 10) | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 20 | UN DURAZNO CHABACANO O NECTARINA | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 21 | UNA PORCION DE UVAS (± 10-15) | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 22 | UNA TUNA | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 23 | UNA PORCION DE CIRUELAS (± 6) | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 24 | UNA REBANADA DE MAMEY | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 25 | UN ZAPOTE | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |

Durante el año previo a este día. ¿Con qué frecuencia consumió usted huevos, carnes y embutidos?

Por favor indique con una cruz, en la columna de frecuencias, la opción que considere más cercana a su realidad.

| FRECUENCIA DE CONSUMO | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|--|-----------------------|---|-------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|
| | ALIMENTO HUEVO, CARNES Y EMBUTIDOS | NUNCA (0) | MEN OS DE UNA VEZ AL MES (1) | VEC ES AL MES (2) | VECES A LA SEMANA | | | VECES AL DIA | | | | | |
| | | | | | 1 (3) | 2-4 (4) | 5-6 (5) | 1 (6) | 2-3 (7) | 4-5 (8) | 6 (9) | | |
| 26 | HUEVO DE GALLINA | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 27 | UNA PIEZA DE POLLO | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 28 | UNA REBANADA DE JAMON | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 29 | UN PLATO DE CARNE DE RES | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 30 | UN PLATO DE CARNE DE CERDO | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 31 | UNA PORCION DE ATUN | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 32 | UN PEDAZO DE CHICHARRON | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 33 | UNA SALCHICHA | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 34 | UNA REBANADA DE TOCINO | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 35 | UN BISTECK DE HIGADO O HIGADITOS DE POLLO | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 36 | UN TROZO DE CHORIZO O LONGANIZA | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 37 | UN PLATO DE PESCADO FRESCO (mojarra, etc.) | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 38 | UN PLATO DE SARDINAS EN JITOMATE | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 39 | MEDIA TAZA DE MARISCOS | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 40 | UN PLATO DE CARNITAS | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 41 | UN PLATO DE BARBACOA | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

Durante el año previo a este día. ¿Con qué frecuencia consumió usted leguminosas?
 Por favor indique con una cruz, en la columna de frecuencias, la opción que considere más cercana a su realidad.

| FRECUENCIA DE CONSUMO | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|----------------------------------|-----------------------|---|--------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | ALIMENTO LEGUMINOSAS | NUNCA (0) | MEN OS DE UNA VEZ AL MES (1) | VEC ES AL MES 1-3 (2) | VECES A LA SEMANA | | | VECES AL DIA | | | | | |
| | | | | | 1 | 2-4 | 5-6 | 1 | 2-3 | 4-5 | 6 | | |
| | | | | | (3) | (4) | (5) | (6) | (7) | (8) | (9) | | |
| 59 | UN PLATO DE FRIJOLES | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 60 | MEDIA TAZA DE CHICHAROS | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 61 | UN PLATO DE HABAS VERDES | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 62 | UN PLATO DE HABAS SECAS | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 63 | UN PLATO DE LENTEJAS O GARBANZOS | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |

| FRECUENCIA DE CONSUMO | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|--|-----------------------|---|--------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | ALIMENTO CEREALES | NUNCA (0) | MEN OS DE UNA VEZ AL MES (1) | VEC ES AL MES 1-3 (2) | VECES A LA SEMANA | | | VECES AL DIA | | | | | |
| | | | | | 1 | 2-4 | 5-6 | 1 | 2-3 | 4-5 | 6 | | |
| | | | | | (3) | (4) | (5) | (6) | (7) | (8) | (9) | | |
| 64 | UNA TORTILLA DE MAIZ | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 65 | TORTILLA DE TRIJO (TORTILLA DE HARINA) | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 66 | UNA REBANADA DE PAN DE CAJA (TIPO BIMBO) | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 67 | UNA REBANADA DE PAN DE CAJA INTEGRAL | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 68 | UN BOLILLO O TELERA | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 69 | UNA PIEZA DE PAN DULCE | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 70 | UN PLATO DE ARROZ | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 71 | UN PLATO DE SOPA DE PASTA | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 72 | UN PLATO DE AVENA | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 73 | UN TAZON CEREAL DE CAJA (TIPO HOJUELAS DE MAIZ) ¿CUAL? _____ | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 74 | CEREAL ALTO EN FIBRA ¿CUAL? _____ | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |

Durante el año previo a este día. ¿Con qué frecuencia consumió usted golosinas o postres?
 Por favor indique con una cruz, en la columna de frecuencias, la opción que considere más cercana a su realidad.

| FRECUENCIA DE CONSUMO | | | | | | | | | | | | |
|---|-----------------------|---|--------------------------------------|-----------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| ALIMENTO GOLOSINAS | NUNCA (0) | MEN OS DE UNA VEZ AL MES (1) | VEC ES AL MES 1-3 (2) | VEC ES A LA SEMANA | | | VEC ES AL DIA | | | | | |
| | | | | 1 (3) | 2-4 (4) | 5-6 (5) | 1 (6) | 2-3 (7) | 4-5 (8) | 6 (9) | | |
| 75 UNA REBANADA DE PASTEL | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 76 UNA CUCHARADITA DE ATE, MIEL, MERMELADA, CAJETA O LECHE CONDENSADA | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 77 UNA CUCHARADITA DE CHOCOLATE EN POLVO | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 78 UNA TABLILLA DE CHOCOLATE | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 79 UNA BOLSA DE FRITURAS | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |

| FRECUENCIA DE CONSUMO | | | | | | | | | | | | |
|---|-----------------------|---|--------------------------------------|-----------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| ALIMENTO BEBIDAS | NUNCA (0) | MEN OS DE UNA VEZ AL MES (1) | VEC ES AL MES 1-3 (2) | VEC ES A LA SEMANA | | | VEC ES AL DIA | | | | | |
| | | | | 1 (3) | 2-4 (4) | 5-6 (5) | 1 (6) | 2-3 (7) | 4-5 (8) | 6 (9) | | |
| 80 UN REFRESCO DE COLA MEDIANO | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 81 UN REFRESCO GASEOSO DE SABOR | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 82 UN REFRESCO DIETETICO | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 83 UN VASO CON AGUA DE SABOR AZUCARADA | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 84 UNA TAZA DE CAFÉ SIN AZUCAR | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 85 UNA TAZA DE ATOLE SIN LECHE | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 86 UNA TAZA DE ATOLE CON LECHE | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 87 UNA CERVEZA | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 88 UNA COPA DE VINO DE MESA | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 89 UNA BEBIDA CON RON, BRANDY O TEQUILA | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |

Durante el año previo a este día. ¿Con qué frecuencia consumió usted grasas y qué tipo de aceite utiliza para cocinar?

Por favor indique con una cruz, en la columna de frecuencias, la opción que considere más cercana a su realidad.

| FRECUENCIA DE CONSUMO | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|------------------------------------|-----------------------|---|--------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------|
| | ALIMENTO VERDURAS | NUNCA (0) | MEN OS DE UNA VEZ AL MES (1) | VEC ES AL MES 1-3 (2) | VECES A LA SEMANA | | | VECES AL DIA | | | | |
| | | | | | 1 (3) | 2-4 (4) | 5-6 (5) | 1 (6) | 2-3 (7) | 4-5 (8) | 6 (9) | |
| 90 | ACEITE DE MAIZ | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="checkbox"/> |
| 91 | ACEITE DE SOYA | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="checkbox"/> |
| 92 | ACEITE DE GIRASOL | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="checkbox"/> |
| 93 | ACEITE DE CARTAMO | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="checkbox"/> |
| 94 | ACEITE DE OLIVA | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="checkbox"/> |
| 95 | UNA CUCHARADITA DE MARGARINA | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="checkbox"/> |
| 96 | UNA CUCHARADITA DE MANTEQUILLA | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="checkbox"/> |
| 97 | UNA CUCHARADITA DE CREMA | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="checkbox"/> |
| 98 | UNA CUCHARADITA DE MAYONESA | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="checkbox"/> |
| 99 | UNA CUCHARADITA DE MANTECA VEGETAL | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="checkbox"/> |
| 100 | UNA CUCHARADITA DE MANTECA ANIMAL | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="checkbox"/> |

Durante el año previo a este día. ¿Con qué frecuencia consumió usted de los antojitos mexicanos que se enlistan a continuación?

Por favor indique con una cruz, en la columna de frecuencias, la opción que considere más cercana a su realidad.

| FRECUENCIA DE CONSUMO | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------|-----------------------|---|--|-----------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| ALIMENTO ANTOJITOS | NUNCA (0) | MEN OS DE UNA VEZ AL MES (1) | VEC ES AL MES 1-3 (2) | VEC ES A LA SEMANA | | | VEC ES AL DIA | | | | | |
| | | | | 1 (3) | 2-4 (4) | 5-6 (5) | 1 (6) | 2-3 (7) | 4-5 (8) | 6 (9) | | |
| 101 UN TACO AL PASTOR | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 102 UN SOPE O QUESADILLA | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 103 UN PLATO CON POZOLE | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| 104 UN TAMAL | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |

Por favor, indique cualquier otro alimento que usted consumió al menos una vez por semana y que no encontró entre los alimentos anteriores, además de esta lista, al año previo a este día.

| FRECUENCIA DE CONSUMO | | | | | | | | |
|-----------------------|-----------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| ALIMENTO | VEC ES A LA SEMANA | | | VEC ES AL DIA | | | | |
| | 1 (3) | 2-4 (4) | 5-6 (5) | 1 (6) | 2-3 (7) | 4-5 (8) | 6 (9) | |
| | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |

¿Cuántas cucharaditas de azúcar le agrega usted a sus alimentos, a lo largo del día? Tome en cuenta lo que le pone al café, licuado, etc.
_____ cucharaditas.

¿Le agrega usted sal a sus alimentos antes de probarlos?

Sí _____ No _____

¿Se come usted el pellejo del pollo?

Sí _____ No _____

¿Se come usted el gordito de la carne?

Sí _____ No _____

¿Cuántos meses del año pasado consumió usted vitaminas?

| 0 | 1-2 | 3-4 | 5-6 | 7-8 | 9-10 | 11-12 |
|---|-----|-----|-----|-----|------|-------|
| | | | | | | |

¿Cuál o cuáles? _____

¿Cuántos meses del año pasado consumió usted suplemento de calcio?

| 0 | 1-2 | 3-4 | 5-6 | 7-8 | 9-10 | 11-12 |
|---|-----|-----|-----|-----|------|-------|
| | | | | | | |

¿Cuál o cuáles? _____

¿Considera usted que su alimentación ha cambiado durante el último año?

Sí _____ No _____ (Si, sí ha cambiado, preguntar:)

¿Porqué? _____

Observaciones _____

CUESTIONARIO INTERNACIONAL DE ACTIVIDAD FÍSICA

Estamos interesados en saber acerca de la clase de actividad física que la gente hace como parte de su vida diaria. Las preguntas se referirán acerca del tiempo que usted utilizó siendo físicamente activo(a) en los **últimos 7 días**. Por favor responda cada pregunta aún si usted no se considera una persona activa. Por favor piense en aquellas actividades que usted hace como parte del trabajo, en el jardín y en la casa, para ir de un sitio a otro, y en su tiempo libre de descanso, ejercicio o deporte.

Piense acerca de todas aquellas actividades **vigorosas** que usted realizó en los **últimos 7 días**. Actividades **vigorosas** son las que requieren un esfuerzo físico fuerte y le hacen respirar mucho más fuerte que lo normal. Piense *solamente* en esas actividades que usted hizo por lo menos 10 minutos continuos.

1. Durante los **últimos 7 días**, ¿Cuántos días realizó usted actividades físicas **vigorosas** como levantar objetos pesados, excavar, aeróbicos, o pedalear rápido en bicicleta?

_____ **días por semana**

Ninguna actividad física vigorosa → **Pase a la pregunta 3**

2. ¿Cuánto tiempo en total usualmente le tomó realizar actividades físicas **vigorosas** en uno de esos días que las realizó?

_____ **horas por día**

_____ **minutos por día**

No sabe/No está seguro(a)

Piense acerca de todas aquellas actividades **moderadas** que usted realizó en los **últimos 7 días**. Actividades **moderadas** son aquellas que requieren un esfuerzo físico moderado y le hace respirar algo más fuerte que lo normal. Piense *solamente* en esas actividades que usted hizo por lo menos 10 minutos continuos.

3. Durante los **últimos 7 días**, ¿Cuántos días hizo usted actividades físicas **moderadas** tal como cargar objetos livianos, pedalear en bicicleta a paso regular, o jugar dobles de tenis? No incluya caminatas.

_____ **días por semana**

Ninguna actividad física moderada → **Pase a la pregunta 5**

4. Usualmente, ¿Cuánto tiempo dedica usted en uno de esos días haciendo actividades físicas **moderadas**?

_____ **horas por día**

_____ **minutos por día**

No sabe/No está seguro(a)

Piense acerca del tiempo que usted dedicó a caminar en los **últimos 7 días**. Esto incluye trabajo en la casa, caminatas para ir de un sitio a otro, o cualquier otra caminata que usted hizo únicamente por recreación, deporte, ejercicio, o placer.

5. Durante los **últimos 7 días**, ¿Cuántos días caminó usted por al menos 10 minutos continuos?

_____ **días por semana**

No caminó → **Pase a la pregunta 7**

6. Usualmente, ¿Cuánto tiempo gastó usted en uno de esos días **caminando**?

_____ **horas por día**

_____ **minutos por día**

No sabe/No está seguro(a)

La última pregunta se refiere al tiempo que usted permanenció **sentado(a)** en la semana en los **últimos 7 días**. Incluya el tiempo sentado(a) en el trabajo, la casa, estudiando, y en su tiempo libre. Esto puede incluir tiempo sentado(a) en un escritorio, visitando amigos(as), leyendo o permanecer sentado(a) o acostado(a) mirando television.

7. Durante los **últimos 7 días**, ¿Cuánto tiempo permaneció **sentado(a)** en un **día en la semana**?

_____ **horas por día**

_____ **minutos por día**

No sabe/No está seguro(a)