



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

“DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL  
FLAVONOIDE (-)EPICATEQUINA SOBRE EL  
COMPLEJO DE UTROFINA Y PROTEÍNAS  
ASOCIADAS EN CÉLULAS ENDOTELIALES DE  
VENA DE CORDÓN UMBILICAL”.

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

ANDREA TOMASENA GLENNIE

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. RAMÓN M. CORAL VÁZQUEZ

COMITÉ TUTOR: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA  
DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA

MÉXICO D.F.

SEPTIEMBRE, 2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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





UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

“DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL  
FLAVONOIDE (-)EPICATEQUINA SOBRE EL  
COMPLEJO DE UTROFINA Y PROTEÍNAS  
ASOCIADAS EN CÉLULAS ENDOTELIALES DE  
VENA DE CORDÓN UMBILICAL”.

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

ANDREA TOMASENA GLENNIE

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. RAMÓN M. CORAL VÁZQUEZ

COMITÉ TUTOR: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA  
DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA

MÉXICO D.F.

SEPTIEMBRE, 2011

**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**P r e s e n t e**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 08 de agosto de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **TOMASENA GLENNIE ANDREA** con número de cuenta **510007946** con la tesis titulada: **"DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL FLAVONOIDE EPICATEQUINA SOBRE EL COMPLEJO DE UTROFINA Y PROTEÍNAS ASOCIADAS EN CÉLULAS ENDOTELIALES DE VENA DE CORDÓN UMBILICAL."** realizada bajo la dirección de: **DR. RAMÓN M. CORAL VAZQUEZ**

Presidente: DR. MARIO ISRAEL VEGA PAREDES  
Vocal: DRA. HAYDEE ROSAS VARGAS  
Secretario: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA  
Suplente: DRA. ROSANA PELAYO CAMACHO  
Suplente: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 14 de septiembre de 2011

*M. del Coro Arizmendi*

**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A CONACYT por el apoyo recibido para el desarrollo de esta investigación donde el estudiante fue becario de tiempo completo con el número **231766**.

Al Dr. Ramón Coral, al Dr. Alejandro Zentella y al Dr. Luis Felipe Jiménez por todo el apoyo y asesoría.

## **AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL**

A Aldo.

A todos los del laboratorio que de alguna u otra manera me ayudaron a sacar este trabajo adelante. En especial a Chivatito.

A todo el equipo del Tococirugía de hospital de Xoco, en especial al Dr. Rivas, por su invaluable ayuda para obtener los cordones.

A la Dra. Patricia Canto. A Marthita, Isra, Tere Neri, Cinthia y a los miembros del equipo del Dr. Ceballos.

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica, División de Medicina Genómica, Subdirección de Enseñanza e Investigación del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE.

***Para Aldo***



## TABLA DE CONTENIDO

ABREVIATURAS .....	I
RELACIÓN DE FIGURAS Y GRÁFICAS .....	II
RESUMEN .....	III
INTRODUCCIÓN .....	1
·Complejo de proteínas asociadas a distrofina.....	1
·Distrofina y Utrofina .....	2
·Distroglicanos .....	4
·Sintrofinas .....	5
·Sarcoglicanos y sarcospán.....	5
·Caveolas y cavininas.....	7
·eNOS .....	9
·Cardiomiopatía dilatada.....	11
·Endotelio .....	13
·Epicatequina.....	15
JUSTIFICACIÓN .....	19
HIPÓTESIS .....	20
OBJETIVO GENERAL .....	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
METODOLOGÍA: .....	22
·Consideraciones éticas .....	22
·Material biológico .....	22
·Extracción de las células endoteliales de vena de cordón umbilical humano .....	22

·Método de congelación y descongelación.....	24
·Inmunofluorescencia indirecta.....	25
·Medición de NO por DAF.....	26
·Estímulo con (-)epicatequina y extracción de proteína .....	26
·Cuantificación.....	27
·Separación de dominios membranales .....	27
·Ensayos de inmunoelectrotransferencia .....	28
RESULTADOS .....	30
·Obtención y caracterización de HUVEC .....	30
·La (-)epicatequina es capaz de inducir un aumento en los niveles de NO en las HUVEC .....	32
·La (-)epicatequina induce cambios en la distribución y en los niveles de las proteínas del complejo UAPC en los diferentes dominios membranales en HUVEC .....	34
DISCUSIÓN .....	41
CONCLUSIONES .....	50
PERSPECTIVAS .....	52
REFERENCIAS .....	54

## ABREVIATURAS

DAPC: Complejo de proteínas asociadas a distrofina (*Dystrophin associated protein complex*)

UAPC: Complejo de proteínas asociadas a utrofina (*Utrophin associated protein complex*)

DMD: Distrofia muscular de Duchene

DMB: Distrofia muscular de Becker

Utr: Utofina

SG: Sarcoglicano

SSPN: Sarcospán

DG: Distroglicano

NO: Óxido nítrico

eNOS: Sintasa de óxido nítrico endotelial

p-eNOS Ser 1177: sintasa endotelial de óxido nítrico fosforilada en la serina 1177

Cav-1: Caveolina 1

Syn: Sintrofina

HUVEC: Células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (*Human umbilical vein endothelial cells*)

VWF: factor de Von Willebrand

HBSS: Solución salina balanceada de Hanks (*Hanks balanced salt solution*)

DRM: Membranas resistentes a detergentes (*Detergent resistant membranes*)

Epi: (-)Epicatequina

Bk: Bradicinina

CaM: Calmodulina

WB: Inmuno ensayo tipo "Western Blot"

## RELACIÓN DE FIGURAS Y GRÁFICAS

**Fig. 1.** Composición de los diferentes complejos UAPC localizados en endotelio

**Fig. 2** Estructura de la (-)epicatequina y su metabolito activo 3'-metil-epicatequina

**Fig. 3** Identificación de células HUVEC

**Fig. 4** Síntesis de NO inducido por (-)epicatequina

**Fig. 5** Perfil proteínico de las fracciones obtenidas por gradiente de sacarosa

**Fig. 6** Distribución de los miembros del UAPC en las 12 fracciones separadas por gradiente de sacarosa

**Fig. 7** Niveles relativos de proteína total en extractos de células estimuladas con (-)epicatequina 1  $\mu$ M durante 24 h en relación a células control

**Fig. 8** Propuesta de remodelación de la composición proteínica del UAPC y alteración de la morfología caveolar por acción de la (-)epicatequina a tiempos prolongados.

**Tabla 1.** Condiciones de WB para cada uno de los anticuerpos

## RESUMEN

Recientemente ha surgido interés en los efectos benéficos de la (-) epicatequina (Epi), un flavanol abundante en las semillas de cacao. Diversos estudios atribuyen parte de estos efectos a la capacidad de esta molécula de activar a la sintasa de óxido nítrico (eNOS). En trabajos previos nuestro equipo de trabajo observó que cuando células endoteliales son sometidas a un estrés mecánico eNOS activa, aumentando así los niveles de óxido nítrico (NO), y que los niveles de proteínas del complejo de proteínas asociadas a utrofina (UAPC) se incrementan. En este trabajo investigamos los efectos de la (-)epicatequina a tiempos prolongados sobre algunas proteínas del complejos UAPC en células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC). Las células fueron incubadas hasta por una hora con (-)epicatequina 1  $\mu$ M y se midieron los niveles de NO, sin observarse cambios significativos. Por otro lado, el tratamiento con (-) epicatequina 1  $\mu$ M por 24 h causó aumentos en los niveles de las proteínas utrofina (Utr), caveolina-1 (Cav-1), cavina-1, eNOS, así como de p-eNOS Ser 1177, que es una forma activa de eNOS. Las proteínas fueron separadas por medio de un gradiente de sacarosa y el análisis de las fracciones indica que eNOS se transloca a las fracciones de alta densidad, donde también se localizó p-eNOS Ser 1177. Cav-1 se localizó únicamente en las fracciones de baja densidad mientras que cavina-1 se movió a las regiones más densas. La ausencia de cavina-1 en las zonas de baja densidad podría significar que cuando las células son tratadas con (-)epicatequina, la forma característica de las caveolas se pierde.

## ABSTRACT

Recently, there have been reports about the beneficial effects of (-) epicatechine (Epi), an abundant flavanol in cocoa beans, and several studies suggest that these could be attributed to the ability of these molecule to activate endothelial nitric oxide synthase (eNOS). In a previous research, our team observed that when endothelial cells were subjected to mechanical stress eNOS was activated, with a subsequent augmentation of nitric oxide (NO), and that the protein levels of members of the utrophin associated protein complex (UAPC) increased. In this work we investigate the effects of Epi on certain proteins of UAPC in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) during long periods of time. The HUVEC where incubated with Epi 1  $\mu$ M for up to 1 h and levels of NO were measured, nevertheless no significant increase was observed. On the other hand, treatment of cells with Epi 1  $\mu$ M for 24 h led to an increase level of the utrophin (Utr), caveolin-1 (Cav-1), cavine-1 and eNOS as well as an active form of eNOS, p-eNOS Ser1177. The proteins were fractioned through a sucrose gradient and the analysis of the the fractions showed that eNOS translocated to the high density fractions, where p-eNOS Ser 1177 was also found. Cav-1 was concentrated in the low density fractions while cavine-1 moved to the high density fractions and did not colocalize with Cav-1. This may mean that when cells are treated with Epi, the characteristic form of caveolae is lost.

## INTRODUCCIÓN

### Complejo de proteínas asociadas a distrofina

El complejo de proteínas asociadas a la distrofina (DAPC por sus siglas en inglés *dystrophin associated protein complex*) es un grupo de proteínas citoplasmáticas, transmembranales y extracelulares [1] descrito en principio en el sarcolema de cardiomiocitos y células de músculo esquelético y músculo liso [2, 3]. Se trata de un complejo multifuncional que se encarga de unir mecánicamente y de mediar las interacciones entre el citoesqueleto y la matriz extracelular, proteger al sarcolema del daño inducido por contracción además de estar involucrado en procesos de transducción de señales [4]. Hoy en día se sabe que el DAPC es molecularmente heterogéneo y presente en una variedad de tejidos no musculares como sistema nervioso central y periférico, riñón, retina y endotelio [5-9]. El DAPC ha sido estudiado principalmente en el contexto de las distrofias musculares y cardiomiopatías [10-12] aunque recientemente el papel que juega como complejo de señalización y como andamio para las proteínas de membrana ha cobrado importancia. A pesar de que la función del DAPC en tejidos no musculares sigue sin estar clara, existe evidencia de que está involucrado en el desarrollo cerebral, formación y plasticidad sináptica, homeostasis de agua y iones así como regulación del óxido nítrico (NO) [13].

El DAPC está compuesto por diversos subcomplejos proteicos con diferentes características bioquímicas y distribución que se describirán a continuación.

## **Distrofina y Utrofina**

La distrofina (Dys), proteína que da nombre al complejo DAPC, es una proteína de 427 kDa localizada principalmente en la superficie citoplasmática de las membranas celulares del músculo esquelético y conformada por 4 dominios funcionales: Un dominio N-terminal que contiene un dominio funcional de unión a actina, seguido por un dominio central o *rod-like*, el más largo de la proteína, que consiste en 24 repeticiones helicoidales tipo espectrina repartidos a lo largo de 4 dominios “bisagra” [14] que se cree le confieren a la proteína la forma alargada y flexible que tiene. En tercer lugar se ubica un dominio rico en cisteínas, el cual contiene dos módulos tipo-mano EF [15] unidos por módulos WW [16] y dedos de zinc ZZ [17]. Finalmente encontramos un dominio C-terminal, que le permite unirse al complejo DAPC por medio de la interacción con  $\beta$ -dístroglicano, sintrofinas y distrobevina [18, 19]. Distrofina se une a la F-actina principalmente a través de tres sitios dentro de la región amino terminal [20] y de un grupo de repeticiones básicas (11-17) dentro del dominio central [21].

A pesar de ser la primera proteína descrita cuyas mutaciones causaban distrofia muscular, la función exacta de la distrofina sigue sin estar completamente clara. Esta proteína ancla el sarcolema al citoesqueleto de actina por lo que tiene un importante papel estructural durante los procesos de contracción y relajación muscular. El dominio central está compuesto por repeticiones helicoidales que le confieren cierta flexibilidad y elasticidad [22] por lo que se cree que a su vez protege a la célula muscular del estrés causado por la contracción. Las fibras



musculares que no contienen distrofina son más rígidas que las fibras normales [23].

La deficiencia de distrofina resulta en la pérdida del complejo de proteínas asociado y distrofia muscular severa lo que confirma el importante rol que desempeña esta proteína en ensamblar y mantener la unión entre la actina de citoesqueleto y la matriz extracelular [18].

Utrofina es una proteína autosómica de 395 kDa homóloga a la distrofina [24] pero que, a diferencia de ésta se expresa en una variedad de tejidos como músculo esquelético, pulmón, riñón, sistema nervioso, endotelio y músculo liso [6, 9, 25, 26]. Las dos proteínas presentan una identidad de alrededor del 80%. Los extremos amino y carboxilo son homólogos ya que comparten los dominios de unión a actina y a distroglicano de la distrofina [27].

Se han identificado dos isoformas de utrofina: utrofina A, encontrada en músculo esquelético y utrofina B localizada en endotelio vascular [28, 29]. En las condiciones donde distrofina es sustituida por utrofina, el complejo es llamado complejo de proteínas asociadas a utrofina (UAPC por sus siglas en inglés *utrophin associated protein complex*).

## **Distroglicanos**

Los distroglicanos (DG) son proteínas codificadas en un solo gen, cuyo producto, una vez traducido, es transformado para formar dos subunidades:  $\alpha$  y  $\beta$ -DG [30]. Se sabe que los distroglicanos se expresan en una gran variedad de tejidos entre los que se encuentran músculo esquelético y cardíaco, epitelio, endotelio y sistema nervioso central y periférico [11, 31].

$\alpha$ -DG es una proteína altamente glicosilada con un peso aproximado de 72 kDa. Un análisis de la secuencia primaria y microscopía electrónica muestran que  $\alpha$ -DG tiene forma de “pesa” con dos dominios globulares, N y C terminales, conectados por una región central altamente glicosilada y rica en prolina, serinas y treoninas [32].  $\alpha$ -DG, interactúa de manera no covalente con el  $\beta$ -DG a través una región altamente conservada de 36 aminoácidos en la región C-terminal [32, 33].

El dominio citoplasmático del  $\beta$ -DG contiene múltiples residuos de prolina, lo que le permite interactuar con otras proteínas como distrofina, caveolina y Grb2 [34, 35]. Además de estas proteínas citoplasmáticas, el  $\beta$ -DG también se une a proteínas transmembranales como los sarcoglicanos [36]. Existe evidencia de que el  $\beta$ -DG podría estar involucrado en procesos de transducción de señales debido a la presencia de dominios de unión a SH2 y SH3 en el extremo citoplasmático de la proteína. También se ha demostrado que la fosforilación de Tyr 892 es necesaria para reclutar proteínas con dominios SH2 [37, 38]. Los DG forman un

punto de unión entre el citoesqueleto y la matriz extracelular siendo éste crucial para la estabilidad estructural de la membrana plasmática [39]

### **Sintrofinas**

La familia de las sintrofinas (syn) está compuesta por 5 miembros,  $\alpha$ 1-,  $\beta$ 1-,  $\beta$ 2-,  $\gamma$ 1-, y  $\gamma$ 2-syn codificados en diferentes genes.  $\alpha$ 1-,  $\beta$ 1-,  $\beta$ 2- y  $\gamma$ 2-, se expresan en músculo esquelético [40],  $\beta$ 2-syn es exclusiva de uniones neuromusculares, mientras que  $\alpha$ 1-,  $\beta$ 1- y  $\gamma$ 2-syn se encuentran a lo largo del sarcolema. Consistentemente,  $\alpha$ 1-,  $\beta$ 1-syn, se asocian a distrofina y  $\beta$ 2-syn a utrofina [41]. Las sintrofinas también se expresan en otros tejidos como cerebro [42], retina [43], riñón [44], hígado [45], endotelio y músculo liso [31]. Las  $\gamma$ -syn son abundantes en cerebro siendo  $\gamma$ 1-syn específica de neuronas [46].

Las sintrofinas contienen un dominio PDZ que les permite interactuar con una amplia variedad de moléculas de señalización y proteínas de membrana entre las que se encuentra la sintasa de óxido nítrico (NOS) y canales de calcio y potasio. Las múltiples interacciones mediadas por las sintrofinas subraya el importante papel que podría desempeñar el DAPC como un importante sistema de señalización celular [13]

### **Sarcoglicanos y sarcospán**

Los sarcoglicanos (SG) son una familia de proteínas transmembranales homólogas N-glicosiladas con un dominio corto intracelular, una región

transmembranal y un dominio largo extracelular que contiene en el dominio carboxilo terminal un agregado de residuos de cisteínas conservados. Los SG forman un complejo de glicoproteínas integradas a las membranas y unidas al complejo distroglicano. Este subgrupo de proteínas está compuesto por las isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\zeta$  con pesos de 50, 43, 35, 35, 50 y 40 kDa respectivamente.

Los sarcoglicanos forman un complejo con sarcospán (SSPN) [47]. Este complejo tiene como función anclar a  $\alpha$ -DG al sarcolema [48]. SSPN tiene las características estructurales que definen a la superfamilia de las tetraspaninas. Los miembros de esta superfamilia poseen 4 dominios transmembranales y tienen la función de agrupar y organizar complejos de proteínas transmembranales, controlando así una amplia gama de funciones celulares.

Inicialmente descrito en músculo esquelético, el complejo SG-SSPN también se encuentra presente en músculo liso y cardiaco, aunque su composición varía de acuerdo al tipo muscular. En músculo estriado se encuentran al menos dos tipos de complejos, uno formado con  $\beta$ -,  $\delta$ -,  $\gamma$ - y  $\alpha$ -SG y otro en donde  $\epsilon$ - SG sustituye a  $\alpha$ -SG [49, 50]. En músculo liso, el complejo se encuentra formado por  $\beta$ -,  $\delta$ -,  $\gamma$ - y  $\epsilon$ -SG.  $\beta$ -,  $\delta$ - y  $\epsilon$ -SG se expresan ampliamente en tejidos como cerebro, pulmón, riñón, hígado y otros órganos mientras que  $\alpha$ - y  $\gamma$ -SG se expresan únicamente en músculo estriado.

## **Caveolas y cavinas**

Las caveolas y balsas lipídicas son microdominios membranales caracterizados por ser ricos en colesterol, esfingolípidos, ácidos grasos saturados y proteínas de señalización [51, 52]. Ambos dominios tienen componentes lipídicos y proteícos similares con dos grandes excepciones: las balsas lipídicas no contienen caveolinas y las caveolas no contienen proteínas ancladas a glicosulfosfatidilinositol [52]. La composición lipídica específica de las caveolas parece ser central para facilitar las interacciones proteína-proteínas y lípido-proteína necesarias para la señalización celular [53].

Caveolina 1 (Cav-1) fue la primera proteína identificada como residente de caveolas. [54, 55]. Se expresa en tejidos no musculares y en músculo liso donde interactúa con caveolina 2 (Cav-2) [56]. Caveolina 3 (Cav-3) es la isoforma específica de músculo estriado [57]. Las caveolinas son proteínas de 22-24 kDa con acilaciones múltiples que se encuentran embebidas en la cara citosólica de las membranas celulares, con ambos extremos, el N y el C, del lado del citosol [54, 55].

Las caveolinas se insertan en membranas del retículo endoplásmico, luego transitan por la vía excretora, forman complejos hetero-oligoméricos en el aparato de Golgi, y salen de Golgi hacia la membrana plasmática en forma de ensamblados de 100-200 moléculas de caveolina,[58-60]. La presencia de estos

oligómeros se cree es la responsable de la forma característica que adquieren las caveolas, similar a una herradura e invaginadas 50 y 100 nm diámetro. .

La expresión de Cav-1 es necesaria para que Cav-2 sea exportada desde Golgi y para su estabilidad [56] y hasta la fecha no se han encontrado caveolas morfológicas en Golgi. Existe evidencia de que las caveolinas se expresan en tejidos y tipos celulares donde no hay existen caveolas morfológicamente reconocibles (neuronas [61] y leucocitos [62]) lo que apunta a que las caveolinas desempeñan roles importantes sin la necesidad de formar caveolas. (40).

Cavina-1, también llamada PTRF (Polymerase I and transcript release factor) o Cav-P60, es una proteína que recientemente ha cobrado interés por el papel que desempeña en la formación de caveolas. Cavina-1 es reclutada por las caveolinas a los dominios caveolares de la membrana plasmática y es necesaria para la formación de caveolas [63, 64]. De hecho, la ausencia de cavina-1 conlleva a una pérdida de la morfología de las caveolas y una disminución en la expresión de todas las isoformas de caveolina aunque no se ha observado una alteración a nivel de mRNA.

La regulación a la baja de cavina-1 también se ve acompaña de un aumento en la movilidad de Cav-1, la cual es liberada de la superficie celular e internalizada rápidamente para ser degradada [64]. Estudios señalan que cavina-1 contribuye a la formaron de caveolas en los últimos pasos. De hecho, solo se asocia con las membranas plasmáticas caveolares pero no con caveolinas

no caveolares [64, 65]. Por lo tanto, cavina-1 debe ser considerada como una proteína soluble, la cual es reclutada a caveola para operar como una nueva plataforma estabilizadora y donde la unión a lípidos probablemente desempeña un papel importante en asociación de Cav-1 con estas invaginaciones. Cavina1 y Cav-1 se asocian en forma dependiente de colesterol y ambas se unen a fosfatidilserina [63], especie lipídica particularmente abundante en caveolas [66].

### **eNOS**

El NO es sintetizado por una familia de enzimas denominadas sintasas de óxido nítrico (NOS) a partir de la L- arginina [67]. Se han identificado tres diferentes isoformas de NOS productos de diferentes genes, con diferente localización, regulación y propiedades catalíticas y que comparten aproximadamente un 50-60% de homología en su secuencia: la neuronal (nNOS o NOS1, con peso de 150 kDa), la inducible (iNOS o NOS2, con peso de 135 kDa) y la endotelial (eNOS o NOS3 de 135 kDa) [68] [69].

Al igual que las otras dos isoformas, la estructura de eNOS consiste en un homodímero donde cada una de las subunidades está compuesta por un dominio oxigenasa N-terminal donde se da la actividad catalítica y con sitios de unión para un grupo Heme, L-arginina, Zinc y el cofactor tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>); un dominio reductasa C-terminal con sitios de unión para FAD, FMN y NADPH; y un tercer dominio con sitios de unión a Ca<sup>++</sup>-Calmodulina (CaM, por su abreviatura

en inglés Calcium), que actúa como puente entre los extremos N y C-terminal [68].

En células endoteliales, eNOS está específicamente dirigida a caveolas. La localización de eNOS en caveolas depende de una miristoilación co-traducciona l e irreversible en la glicina N-terminal, [67, 70] que dirige a la enzima al aparato de Golgi donde se palmoitisan los residuos Cys 15 y Cys 16. Una vez miristoilada y palmitoilada, la enzima se dirige a caveolas. Estas dos modificaciones post-traduccionales confieren a eNOS tres grupos acilo que se anclan firmemente a la capa lipídica en la membrana [71]. A diferencia de la miristoilación, que es irreversible, los enlaces tiopalmitoil de la proteína son débiles lo que a su vez debilita la unión a las caveolas. Esto forma parte de una serie de mecanismos dinámicos de regulación de la actividad enzimática de eNOS [72].

La unión entre eNOS y Cav-1 se da por la interacción de ambos extremos citoplasmáticos de Cav-1 con el dominio oxigenasa de eNOS, aunque parece una sola de estas interacciones es suficiente. La actividad catalítica de eNOS se ve significativamente inhibida por su interacción con Cav-1 debido a que interfiere con el sitio de unión a  $Ca^{++}/CaM$  [73]. La actividad catalítica máxima de eNOS depende de su unión con CaM, la cuál facilita la transferencia de electrones entre los dominios reductasa y oxigenasa de la enzima, haciendo que los niveles intracelulares de  $Ca^{++}$  sean críticos [74]. Aumentos en los niveles de  $Ca^{++}$  intracelular activan a CaM, que se une a eNOS, liberándola de Cav-1 y solubilizándola [72].



Junto con la acilación y la CaM, diversas rutas de fosforilación y defosforilación sirven como principales reguladores post-transcripcionales de la actividad de eNOS. La fosforilación en las serinas 1177, 635 y 617 aumentan la actividad de la enzima, mientras que la fosforilación de la Thr 495 y Ser 116 la inhiben [75]. La fosforilación de la Ser-1177 activa a eNOS inhibiendo su disociación de CaM. El shear stress cataliza esta fosforilación a través de la activación de Akt (proteína quinasa B) [75]. Otras cinasas como la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico (AMPK) y la proteína quinasa II dependiente de Ca<sup>++</sup>/CaM (CaM quinasa II) también son capaces de fosforilar a la Ser-1177, y aunque las funciones específicas y las diversas rutas de activación de estas cinasas sigue en investigación, está claro que diferentes estímulos extracelulares activan las diferentes rutas que llevan a la fosforilación de eNOS [76-78]. Aunque la eNOS se expresa constitutivamente, existen diversos estímulos físicos y químicos que afectan los niveles de la enzima tanto *in vivo* como *in vitro*. La eNOS puede ser activada por agonistas de diversos receptores acoplados a proteínas G así como por estímulos físicos como el que ejerce el la sangre al fluir a través de los vasos sanguíneos (shear stress) y cambios en la oxigenación [79].

### **Cardiomiopatía dilatada**

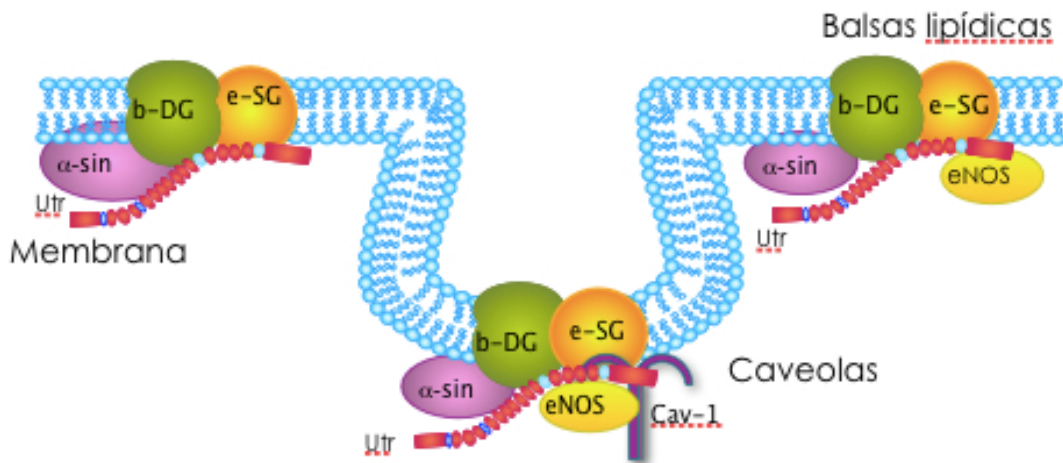
Alteraciones en algunos de los componentes del complejo DAPC/UAPC se asocia con la pérdida progresiva de la función muscular. Mutaciones en el gen de la distrofina pueden causar distrofia muscular de Duchene (DMD) o una distrofia mas leve como la de Becker (BMD) pudiendo también causar cardiomiopatía

dilatada ligada al X [80]. Así mismo, mutaciones en los genes que codifican para  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ - SG causan distrofia muscular de cintura (LGMD) tipo 2D, 2E, 2C y 2F respectivamente [81-84]. En cada una de estas enfermedades, una mutación en cualquiera de los genes de SG, tiene como resultado una deficiencia de todo el complejo SG [48]. Los pacientes con LGMD tipo 2E, 2C y 2F también pueden presentar cardiomiopatía, aunque la gravedad y la penetrancia de ésta es variable [85].

En un estudio en ratones deficientes de  $\delta$ -SG, se observó además de distrofia muscular y cardiomiopatía graves, una ausencia de todo el complejo SG-SSPN en el músculo cardíaco y en músculo liso vascular. Un análisis más profundo de las lesiones cardíacas del ratón  $\delta$ -SG mostró irregularidades en la vasculatura coronaria [84]. En contraste, en ratones deficientes de  $\alpha$ -SG la distrofia muscular no se acompaña de cardiomiopatía. Debido a que no se observan alteraciones en el complejo SG-SSPN en músculo liso vascular y a que  $\alpha$ -SG es una proteína exclusiva de músculo cardíaco, se puede establecer una relación entre la pérdida del complejo SG-SSPN en el músculo liso y el desarrollo de cardiomiopatías. Esto confirma la importancia del complejo DAPC/UAPC y del subcomplejo SG-SSPN en la disfunción vascular y en la presencia de cardiomiopatías dilatadas.

## Endotelio

Hasta hace no mucho tiempo se sabía poco acerca de la presencia y composición del DAPC/UAPC en endotelio. Recientemente nuestro grupo de investigación probó la existencia de tres diferentes complejos UAPC en células endoteliales: El primero conformado por utrofina,  $\beta$ -DG,  $\epsilon$ -SG, caveolina-1 y eNOS ubicado en la membrana de los dominios caveolares; el segundo, ubicado en membrana de balsas lipídicas (no caveolares), conformado por utrofina,  $\beta$ -DG,  $\epsilon$ -SG, y eNOS; y el conformado por utrofina,  $\beta$ -DG y  $\epsilon$ -SG situado en el resto de la membrana [31] (Figura 1).



**Fig.1.** Composición de los diferentes complejos UAPC localizados en diferentes regiones de la membrana plasmática de células endoteliales (Modificado de [31]) Utofina (Utr), beta distroglicano (b-DG), epsilon sarcoglicano (e-SG), alfa sintrofina (a-sin), sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS), caveolina-1 (Cav-1).

Una vez descrito el complejo en endotelio, este mismo equipo de investigación llevó a cabo un estudio en células HUVEC a las que se sometió a un estímulo mecánico similar al ejercido por las fuerzas hemodinámicas. Al comparar los niveles de expresión de las proteínas pertenecientes al UAPC, se demostró un aumento en la expresión proteínica en las células estimuladas (estiradas) contra aquellas en estado basal (datos no publicados).

También se observó que en las células estiradas había un decremento en la eNOS asociada al complejo, aunado a un aumento en su forma activa fosforilada (p-eNOS) no asociada al complejo. Al medir los niveles de NO en estas células se observó un aumento de 3 veces con respecto al basal. Estos resultados sugieren que el estímulo mecánico libera y activa la NOS unida al UAPC.

El endotelio forma una barrera permeable altamente selectiva y constituye una superficie ininterrumpida, suave y no trombogénica [86]. Es considerado un tejido multifuncional que responde a estímulos nerviosos, metabólicos, inmunológicos y mecánicos; y se encarga de mantener la homeostasis vascular a través de una serie de interacciones entre el lumen y la pared del vaso. El endotelio sintetiza y libera una gran cantidad de sustancias vasoactivas entre las que se encuentra el NO que es liberado por las células endoteliales en respuesta al estrés por roce ejercido por el flujo sanguíneo [87]. El NO además de controlar el tono vascular interviene en otros procesos fisiológicos como el control de la coagulación [88] y el flujo sanguíneo así como en la producción de citocinas que dirigen y regulan el proceso inflamatorio [89]. A la alteración de las principales

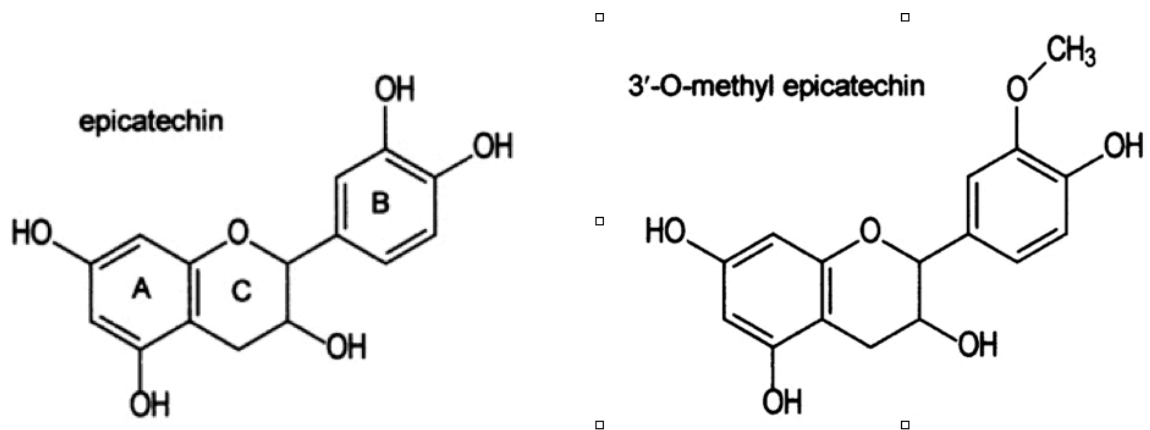
funciones endoteliales se le denomina disfunción endotelial. Esta condición esta asociada a una actividad reducida del NO lo que promueve el endurecimiento de la pared vascular y consecuentemente una enfermedad cardiovascular [90]. Esto puede ser el resultado de una actividad reducida de la eNOS y de una disminución en la biodisponibilidad del NO. La disfunción endotelial está implicada en la fisiopatología de diferentes enfermedades cardiovasculares, como la hipertensión, enfermedad arterial coronaria, falla cardiaca crónica y la cardiomiopatía dilatada [91, 92].

### **Epicatequina**

Dentro del estilo de vida, la dieta ha sido señalada como uno de los factores más importantes que influyen en la incidencia de enfermedades cardiovasculares [27]. En los últimos años numerosas investigaciones han identificado y estudiado diversos compuestos fitoquímicos presentes en los alimentos, entre los que destacan los flavonoides.

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común compuesto por dos anillos de benceno (A y B) ligados a través de un anillo heterocíclico ( C) [93]. En el contexto de las enfermedades cardiacas, un grupo particular de flavonoides, el de los flavanoles, ha llamado especial atención. Los flavanoles contienen un grupo -OH en la posición 3 del anillo C y pueden encontrarse en forma de monómeros, como la (-) epicatequina (Fig. 2) y la (+) catequina. Estos monómeros también pueden formar uniones entre los C4 y

C8 lo que permite la formación de dímeros, oligómeros o polímeros llamados procianidinas[94]. Éstos compuestos se encuentran en grandes cantidades en el vino de uva, el té verde, frutos rojos y particularmente en el cacao [95].



**Fig. 2.** Estructura de la (-)epicatequina y su metabolito activo 3'-metil-epicatequina [96].

El interés en los beneficios de estos compuestos surge a partir de un estudio realizado en indígenas Kuna, población que vive en diversas islas caribeñas en la costa de Panamá y durante siglos permaneció aislada. Entre los Kunas la hipertensión es extremadamente rara y la presión arterial no aumenta con la edad. Atribuidas estas observaciones a un factor de protección genético, este fue descartado debido a que entre las personas que migraban fuera de la isla y adquirían hábitos occidentales la hipertensión se volvía bastante mas común y la presión arterial aumentaba con el paso de los años. Después de analizar una amplia variedad de factores ambientales entre los pobladores de la isla, se

estableció una relación entre la baja incidencia de enfermedades cardiovasculares y el alto consumo de bebida de cacao [97].

Un estudio prospectivo entre 34,389 mujeres post-menopáusicas, sin enfermedad cardiovascular se observó, después de 16 años de seguimiento, una asociación entre el consumo de alimentos con alto contenido en flavonoides y un decremento en el riesgo de muerte con enfermedad cardiaca [98].

Reportes recientes apuntan a que la (-)epicatequina es la principal responsable de la acción del cacao. La ingesta de (-)epicatequina pura en humanos reproduce los efectos hipotensivos y antioxidantes observados ante el consumo de cacao. Por otro lado, se cree que el metabolito de la epicatequina 3-metil-epicatequina (Fig. 2) podría ser el responsable de las acciones observadas. En un estudio realizado en células HUVEC, cuando se bloqueó la acción de la catechol-O-methyltransferasa (COMT), responsable de metilar a la (-)epicatequina, los efectos observados previamente desaparecieron [99]. Por otro lado, antes la ingesta de una bebida alta en flavonoles, se observó que al tiempo que se presentaba el pico máximo de especies reactivas de NO y de la mejora endotelial el metabolito de la epicatequina era la 3'-metil-epicatequina-5-O-β-glucorónido [100].

Aunque el mecanismos de acción de los flavanoles todavía no están claramente dilucidados, se ha observado que tanto las concentraciones plasmáticas de NO como la vasodilatación aumentan después de la ingesta de

cocoa rica en flavanoles, y que esta acción desaparece cuando se inhibe la eNOS. Esto pudiera significar que gran parte de los efectos observados están mediados por el NO [100].

Estudios recientes realizados en células endoteliales de arteria cardiaca humana (HCAEC's) indican que la síntesis de NO inducida por la (-) epicatequina, se da por medio de la activación de eNOS mediada por la fosforilación de los residuos Ser 1177 y Ser 633 y de la defosforilación de Thr 495. Las cinasas Akt y PKA son miembros de la vía de señalización PI3K y son capaces de fosforilar a eNOS. Akt fosforila a la Ser 1177 mientras que PKA fosforila tanto a a Ser177 como a Ser633. La (-) epicatequina es capaz de actuar sobre ambas vías de señalización. Así mismo la (-) epicatequina estimula la disociación de eNOS de la membrana plasmática, cuya activación está mediada por la vía  $Ca^{++}/CaM/CaMKII$ . El tratamiento de células con (-)epicatequina también induce un aumento significativo en la producción de IP3, así como la fosforilación de IP3R en el retículo endoplásmico. Esto activa las cinasas dependientes de  $Ca^{++}$  como CaMKII que a su vez activan a eNOS. En otro estudio realizado en las mismas células HCAEC's se observó que eNOS puede ser activada por medio de fosforilación tanto dependiente como independiente de  $Ca^{++}$ .



## JUSTIFICACIÓN

Nuestro equipo de trabajo lleva tiempo estudiando el patrón de expresión de las proteínas del UAPC en endotelio, de lo cual se sabía poco. Se observó que al someter a las células endoteliales a un estímulo físico, la expresión de proteínas de este complejo aumentaba. Además se vio que el estímulo físico libera y activa a la eNOS del complejo, aumentando la concentración de NO.

En años recientes el interés por lo efectos de los flavonoides de diversos alimentos ha ido en aumento. Entre estos flavonoides destaca la (-)epicatequina, encontrada principalmente en el cacao. Diversos estudios señalan la capacidad de este flavanol de activar la eNOS y como consecuencia aumentar los niveles de NO.

Estas observaciones nos impulsaron a analizar los efectos de la (-) epicatequina durante un periodo prolongado sobre algunos miembros del complejo UAPC en HUVEC, tal como se hizo previamente con el estímulo mecánico.

## **HIPÓTESIS**

La (-)epicatequina es capaz de modificar la distribución de las proteínas del complejo UAPC y activar a la eNOS en HUVEC.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto de la (-)epicatequina sobre el complejo utrofina y proteínas asociadas en células HUVEC en ausencia de un estímulo mecánico.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Medir los efectos agudos y crónicos de la (-)epicatequina en la producción de NO en cultivos primarios HUVEC's.
- Evaluar la localización y activación de la eNOS en presencia de la (-)epicatequina.
- Determinar si hay cambios en la cantidad y en la distribución de las proteínas del complejo UAPC en las células endoteliales tratadas con (-)epicatequina.

## **METODOLOGÍA:**

### **Consideraciones éticas**

Los cordones umbilicales fueron obtenidos a través del servicio de Tococirugía del Hospital General Xoco de la Secretaría de Salud del Distrito Federal con previa revisión y autorización del protocolo por parte de comité de ética del propio hospital.

### **Material biológico**

Se trabajó con cordones producto de nacimientos normales a término, recolectados inmediatamente después del parto los cuales y transportados en frascos estériles con una solución de NaCl al 0.9% con antibiótico-antimicótico al 1% (GIBCO).

### **Extracción de las células endoteliales de vena de cordón umbilical humano**

Las células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC) fueron desprendidas del músculo liso por medio de digestión enzimática de la matriz extracelular[101].

En una campana de extracción, se limpia el cordón con una gasa con yodo y se corta uno de los extremos con bisturí estéril. En el extremo recién cortado, se inserta una cánula en la vena y se sujeta al cordón con una pinza. Una vez

realizado lo anterior se lava la vena cuidadosamente la vena con una jeringa y PBS 1X estéril.

Cuando la solución de lavado sea transparente e incolora, se pinza el otro extremo del cordón y se introduce tripsina al 0.125% hasta observar una tensión moderada, masajeando suavemente el cordón. El cordón con tripsina se incuba en un vaso precipitado de 2 L con PBS 1X a 37°C con agitación moderada durante 15 min.

Transcurrido el tiempo de incubación, en la campana de cultivo se sostiene el cordón sobre un tubo cónico de 50 ml y se corta cuidadosamente la punta inferior para depositar la tripsina dentro del tubo. Con el fin de obtener un mayor número de células es recomendable realizar un último lavado con PBS 1X. La solución obtenida se centrifuga por 10 min a 2500 rpm, se elimina el sobrenadante y se resuspende el 3 ml de medio para endotelio (EBM1, Lonza) previamente adicionado con antibiótico-antimicótico (GIBCO) al 1% para sembrar en una caja de 25 cm<sup>2</sup>.

Las células se incuban a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>. Al día siguiente se lavan con solución de Hanks (HBSS) (Sigma-Aldrich) agregando medio nuevo. Las células son cultivadas hasta un 80% de confluencia, se tripsinizan y se pasan a una caja de 75 cm<sup>2</sup>.

### **Método de congelación y descongelación**

Una vez que las células del pase 3 han alcanzado un 80% de confluencia se tripinizan para su posterior criopreservación (5 o 6 viales por cada caja de 75 cm<sup>2</sup>). Las células se tripsinizan y se centrifugan a 2500 rpm por 10 min eliminando el sobrenadante y resuspendiendo el botón con 200 µl de SFB y 700 µl de medio para endotelio por vial a congelar. En cada vial se adicionan 100 µl de DMSO y 900 µl de la suspensión de células.

Es necesario congelar los viales paulatinamente ya que cambios bruscos de temperatura afectan la viabilidad celular. Para lograr esto, cada vial se envuelve en papel aislante y se almacena a 4 °C por 15 min, a -20 °C por 2 h, a -70 °C por 24 h, para finalmente introducirlos en el nitrógeno líquido.

Para descongelar, se saca el vial del nitrógeno líquido y se sumerge en agua a 37°C. Una vez que las paredes están líquidas, el contenido del vial se deposita en una caja de 25 cm con 5 ml de medio para endotelio y se homogeneiza. Se incuba a 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>. Es recomendable cambiar el medio al día siguiente debido a la toxicidad del DMSO.

Para realizar todos los experimentos, se hizo una mezcla de las células obtenidas de 4 cordones y se utilizaron entre los pases 3 y 6.

## **Inmunofluorescencia indirecta**

Para determinar la pureza del cultivo endotelial, se probó por inmunofluorescencia indirecta la presencia de factor de Von Willebrand, proteína específica de células endoteliales. Se sembraron las células a una densidad de 10,000 células/cm<sup>2</sup> sobre un cubre objetos de cristal de 1 cm de diámetro. Una vez adheridas fueron lavadas con HBSS y fijadas con paraformaldehído (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) al 4 % pH 7 por 10 min lavando posteriormente con HBSS-albúmina al 1%. Las células fueron permeabilizadas con Triton X-100 al 0.2% por 5 min y después con SDS al 0.1 % también por 5 min. Transcurrido ese tiempo, los cubreobjetos fueron lavados con HBSS y posteriormente incubados con albúmina al 3 % en HBSS por media hora a 37°C/ 5 % CO<sub>2</sub>. Las células se incubaron durante 3 h con el anticuerpo primario específico contra el factor de Von Willebrand (Rabbit anti-Factor VIII related antigen 18-0018, Invitrogen Corporation. Camarillo, California USA) a una dilución de 1:200 a 37 °C. Se lavaron con HBSS y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con FITC (Invitrogen) en una dilución 1:300, por una h a 37 °C/ 5% CO<sub>2</sub>. Finalmente se hicieron tres lavados con HBSS de 5 min cada uno y los cubreobjetos se montaron en portaobjetos con 5 µl de medio de montaje para fluorescencia vecta-shield con DAPI (VECTOR Laboratories, Inc. Burlingame, California USA). Las imágenes fueron analizadas con un microscopio invertido (ZEISS) en el modo confocal, a un objetivo de 63 x, utilizando el programa Start LSM Image Examiner.

### **Medición de NO por DAF.**

Las células endoteliales se sembraron en cajas de 24 pozos con una densidad de 10,000 células/cm<sup>2</sup>. Cuando las células tuvieron una confluencia del 70% se sincronizaron por 15 min a 4 °C. Se lavaron tres veces con solución de Hanks y se incubaron con reactivo de DAF-2 DA (SIGMA) a una concentración de 1 µl/ml en HBSS durante una hora a 37 °C protegidas de las luz. Posteriormente se lavaron 2 veces con HBSS y se aplicó el estímulo con (-)epicatequina 1 µM, utilizando a su vez bradicinina (Bk) 1 µM como control positivo. La fluorescencia se midió a tiempo cero y a los 5, 10, 15, 20, 30, 60 y 120 min a una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 538 nm en un fluorómetro Fluoroskan Ascent FL. (Thermo Electron Corporation). El análisis estadístico se hizo con el programa NCSS 2007.

### **Estímulo con (-)epicatequina y extracción de proteína**

Las células fueron sometidas a un estímulo con (-)epicatequina 1 µM durante 24 h cambiando el medio con el estímulo cada 12 h con el fin de analizar el efecto crónico del flavanol.

Transcurrido el tiempo, las células se lavaron con PBS 1X tres veces y se les agregó aproximadamente 200 µl de buffer de extracción de proteínas Tritón-TNE (0.05 M Tris, 0.15 M NaCl, 0.001 M EDTA, 0.1% Triton X-100 [pH 7.4]) adicionado con inhibidores de proteasas MiniComplete (Roche Molecular Biochemicals,



Laval, Quebec, Canada). Las células se rasparon con un gendarme y se recolectaron en un tubo, dejándolas en agitación leve a 4 °C por 30 min y se almacenaron a -80°C.

### **Cuantificación**

Los extractos proteicos se cuantificaron por el método de Bradford. Se elaboró una curva estándar de concentración contra absorbancia utilizando albúmina de suero de bovino (BSA). Para determinar la absorbancia de las muestras se usó una dilución de muestra 1:800 agregando posteriormente 200 µl de reactivo de Bradford (Bio-Rad) e incubando por 5 min. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 595 nm.

### **Separación de dominios membranales**

La separación de dominios membranales se llevó a cabo por medio de un gradiente de sacarosa. Los extractos proteicos control y los estimulados con (-) epicatequina se cuantificaron y las concentraciones fueron igualadas. En un tubo para micro-ultracentrífuga de 1 ml se colocaron 200 µl del extracto proteico y 200 µl de una solución de sacarosa al 80% en buffer Tritón-TNE. Se homogeneizó perfectamente y se agregaron cuidadosamente 400 µl de solución de sacarosa al 35% y después 200 µl de sacarosa al 5% cuidando que las fases no se mezclaran. El gradiente de sacarosa se centrifugó a 100,000 g durante 16 h a 4 °C en una micro-ultracentrífuga Beckman Coulter TL-100 con un rotor TLS-55. Se recuperaron 12 fracciones de 83 µl cada una.

## Ensayos de inmunoelectrotransferencia

Para determinar posibles variaciones en la cantidad y localización de las proteínas utrofina, caveolina-1,  $\epsilon$ -SG, cavina-1, eNOS y eNOS fosforilada en la serina 1177 (p-eNOS Ser 1177) entre las HUVEC sometidas a un estímulo crónico con (-)epicatequina y las que no fueron sometidas a dicho estímulo, los extractos proteicos se resolvieron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) con un gradiente de concentración de 2.5-13 %. Se tomó el volumen equivalente a 30  $\mu$ g de proteína el cual fue mezclado con una solución amortiguadora de carga (2X SDS gel-loading buffer: 100mM Tris-HCl, 4 % SDS, 0,2 % azul de bromofenol, 200mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 20%glicerol). La mezcla se calentó a 95 °C durante 5 min y se colocó en hielo para inmediatamente después cargarse en los pozos del gel concentrador. Se utilizaron 3  $\mu$ l de marcador de peso molecular preteñido (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas). Las muestras se corrieron a 90 V por 100 min en el sistema Mini Protean (Bio-Rad Laboratories, Inc.) en amortiguador de electrodo (10X: 0.25 M Tris-HCl, 2 M Glicina, 1% SDS).

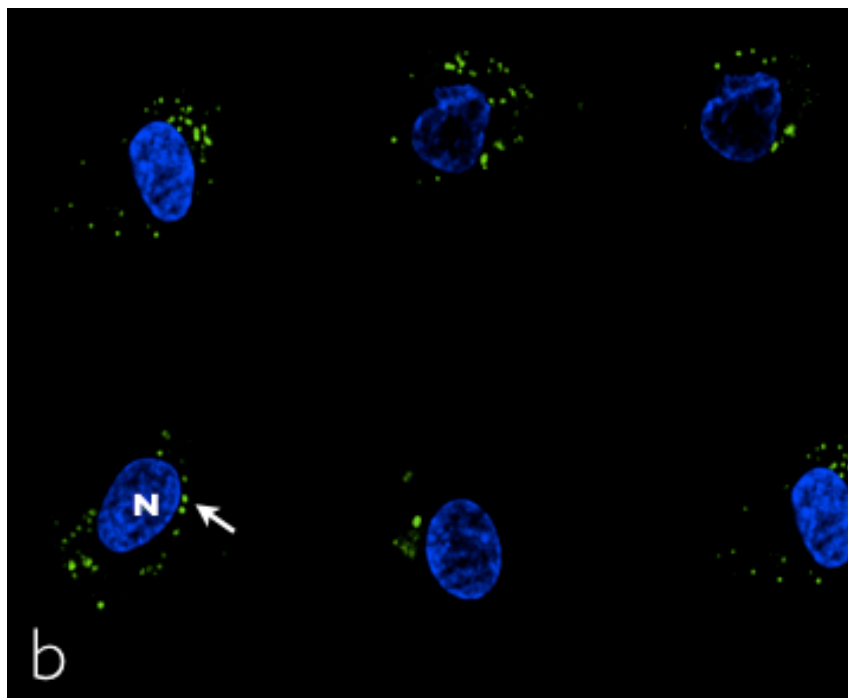
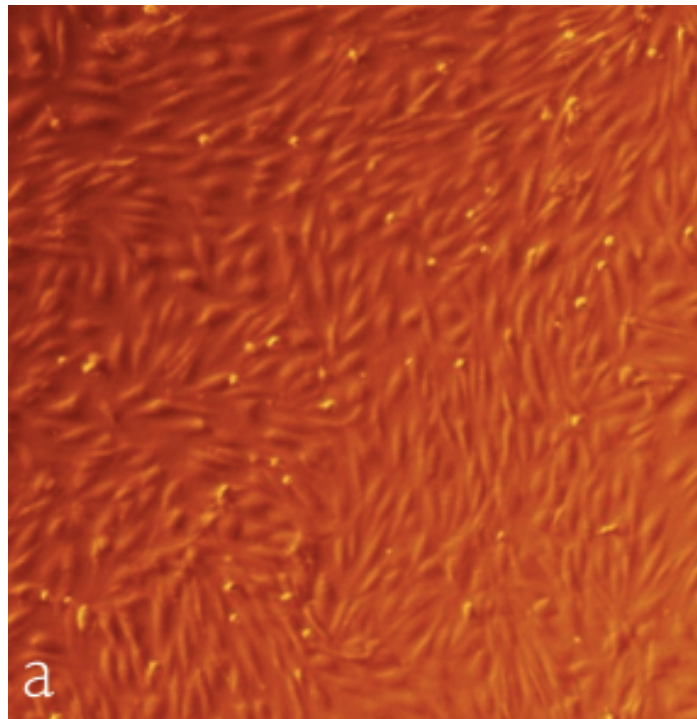
Las proteínas resueltas en el gel se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa (Hybond ECL RPN 3032D; Amersham Pharmacia Biotech) a través del sistema de electrotransferencia húmedo de Bio-Rad, con amperaje constante de 350 mA por 150 min a 4 °C en amortiguador de transferencia (25 mM Tris-HCl, 192 mM glicina, 20% metanol pH [8.3])

Posteriormente, las membranas fueron incubadas en una solución de bloqueo, durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios específicos para las proteínas de interés a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente, se realizaron lavados con la solución de lavado (PBS-Tween 0.1 %) y se incubaron con el anticuerpo especie-específico acoplado a peroxidasa durante una hora a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se realizaron otra serie de lavados. La reacción de revelado se desarrolló con el reactivo Super Signal West Pico (Pierce) de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

## **RESULTADOS**

### **Obtención y caracterización de HUVEC**

El cultivo primario para el presente trabajo se llevó a cabo a partir de la extracción y expansión de endotelio de vena de cordón umbilical. Las células endoteliales se obtuvieron a partir de cordones provenientes de embarazos sanos. Una vez obtenidas las células, se expandieron y se estabilizaron (Fig 3). A través de la técnica de inmunofluorescencia indirecta se probó la presencia del factor de Von Willebrand, proteína específica de células endoteliales. Se analizaron 20 campos y en todos se observó que la totalidad de las células eran positivas para el VWF (Fig. 3). Esto indica que el lote de células utilizadas para llevar a cabo tanto las mediciones de NO como el gradiente, son HUVEC sin presencia de músculo liso o fibroblastos.

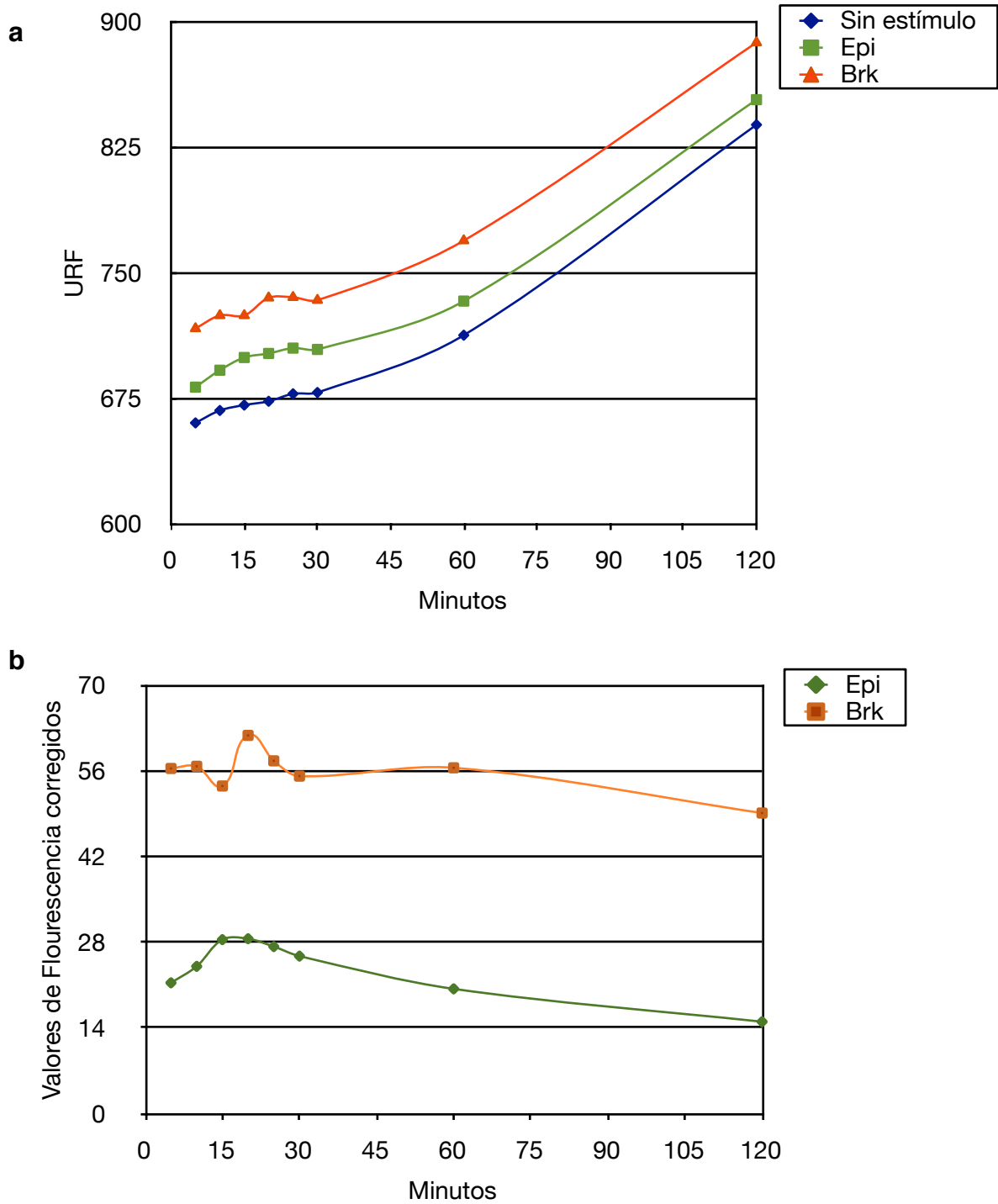


**Fig. 3.** Identificación de células HUVEC. a) Campo confluyente observado con microscopio de contraste de fases (10X). b) Detección de HUVEC con anti VWF/FITC observadas en microscopio confocal (63X) N: Núcleo teñido con DAPI, Flecha: Vesículas con VWF.

### **La (-)epicatequina es capaz de inducir un aumento en los niveles de NO en las HUVEC**

Con el fin de comprobar que la (-)epicatequina es capaz de inducir aumentos en los niveles de NO en células HUVEC, el cultivo fue sometido a un estímulo con (-)epicatequina 1  $\mu$ M, utilizando Bradicinina (Bk) como control positivo por periodos de tiempo de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60 y 120 min. Mediante la técnica DAF-2F se llevaron a cabo las mediciones de NO en tiempo real, observando un aumento en la producción de este en los tres casos, tanto en el control como en la Bk y la Epi (Fig. 4 a). Los resultados mostrados no permiten diferenciar la producción basal de NO en la célula sin estímulo alguno (control) de la producción con un estímulo químico (Bk y Epi). Por este motivo se corrigieron los valores restando los valores obtenidos con Epi y con Bk a los del control. De esta manera se puede obtener la producción neta con cada uno de los estímulos a diferentes tiempos. (Figura 4 b). En el caso de la (-)epicatequina se observa un pico máximo de producción de NO entre los 15 y 20 min de aplicado el estímulo. Si bien estos valores nos son significativos, si pueden ser indicativos de la capacidad de la (-)epicatequina para inducir cambios en los niveles de NO en HUVEC.

Efecto de la epicatequina sobre el complejo UAPC en HUVEC



**Fig. 4.** Síntesis de NO inducido por (-)epicatequina. a) Producción de óxido nítrico (NO) con (-) epicatequina (Epi) 1  $\mu$ M con Bradicinina (Bk) 1 $\mu$ M como control positivo expresada en unidades relativas de fluorescencia (URF). b) Producción neta de NO con Epi y Bk. Los niveles de NO no muestran una diferencia significativa (ANOVA)( $p > 0.05$ ,  $n=4$ )

### **La (-)epicatequina induce cambios en la distribución y en los niveles de las proteínas del complejo UAPC en los diferentes dominios membranales en HUVEC**

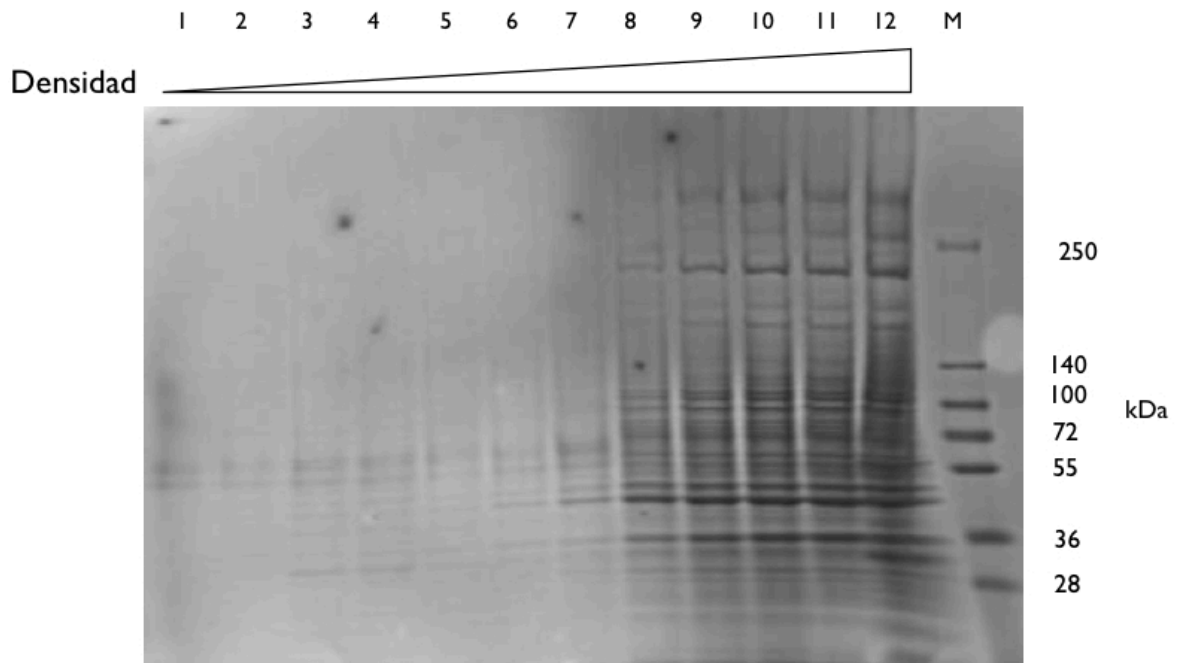
Con el objetivo de determinar los efectos de la (-)epicatequina administrada por periodos prolongados en la distribución y los niveles de las proteínas del complejo UAPC en HUVEC, éstas fueron cultivadas con (-)epicatequina 1  $\mu$ M en medio para endotelio por 24 h, realizando cambio de medio cada 12 h. Los extractos proteícos fueron sometidos a una separación subcelular basada en gradiente de sacarosa con concentraciones de 40 a 5 %, lo que permite determinar la localización de las proteínas. Con el fin de comprobar la integridad y de determinar el perfil proteínico del gradiente de sacarosa, se aplicó el mismo volumen (correspondiente a 30  $\mu$ g de la fracción 12) de todas las fracciones.. Las proteínas separadas fueron visualizadas por medio de azul brillante de Coomassie (Fig. 5).

Las fracciones del gradiente fueron analizadas por ensayos de inmunoelectrotransferencia. Debido a que se trabajó con anticuerpos nuevos, las condiciones para el WB tuvieron que ser previamente estandarizadas. (Tabla 1).

A través de la técnica de “dot blot”, el anticuerpo CT-B conjugado con HRP, que se une específicamente con el gangliosido GM1, se utilizó como marcador de balsas lipídicas y caveolas, y la proteína GAPDH como control de fracciones no resistentes a detergentes, correspondientes a las regiones de mayor densidad,



Efecto de la epicatequina sobre el complejo UAPC en HUVEC



**Fig. 5.** Perfil proteínico de las fracciones obtenidas por gradiente de sacarosa  
M: Marcador de peso molecular

Efecto de la epicatequina sobre el complejo UAPC en HUVEC

Anticuerpo	Bloqueo	Primario	Lavados	Secundario	Lavados
Caveolina-1 Monoclonal	1 h PBS-T Leche 5%	1:500 en PBS-T 14 h	4 x 10 min. PBS-T	1:5000 en PBS-T 1 h Anti-ratón	4 x 10 min PBS-T
Cavina-1 Monoclonal	1 h PBS-T Leche 5%	1:500 en PBS-T 14 h	4 x 10 min. PBS-T	1:5000 en PBS-T 1 h Anti-ratón	4 x 10 min PBS-T
Utrofina Policlonal	1 h PBS-T Leche 5%	1:500 en PBS-T 14 h	4 x 10 min. PBS-T	1:10,000 en PBS-T 1 h Anti-conejo	4 x 10 min PBS-T
eNOS* Policlonal	1 h TBS-T Leche 5%	1:1000 en TBS-T BSA 5% 17 h	3 x 5 min. TBS-T	1:2000 1 h en TBS-T leche 5% Anti-conejo	3 x 5 min. TBS-T
p-Enos Ser 1177* Policlonal	1 h TBS-T Leche 5%	1:100 en TBS-T 17 h	4 x 10 min. TBS-T	1:7500 1 h en TBS-T Anti-conejo	4 x 10 min PBS-T
GAPDH Policlonal	1 h PBS-T Leche 5%	1:3000 en PBS-T 14 h	4 x 10 min. PBS-T	1:10,000 en PBS-T 1 h Anti-ratón	4 x 10 min PBS-T
CTB-HRP	1 h PBS-T Leche 5%	1:1000 en PBS-T T con leche 5% 1 h	3 x 5 min. PBS-T	-----	-----
*Después del tiempo de bloqueo, se hicieron 3 lavados de 5 min. cada uno con TBS-T					

**Tabla 1.** Condiciones de WB para cada uno de los anticuerpos.

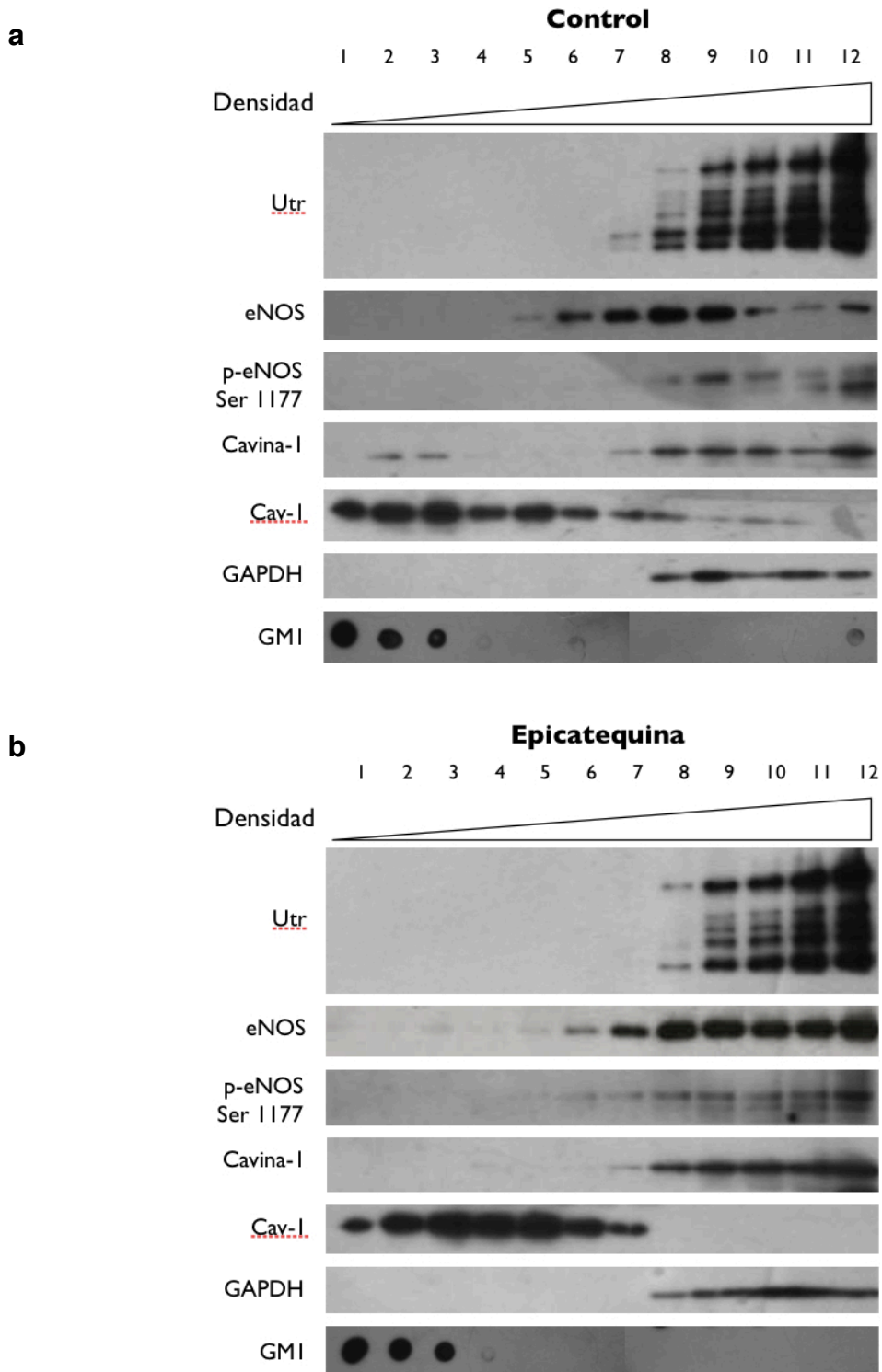
En las células HUVEC control, Utr se encuentra únicamente en las fracciones 7 a la 12 que son las más densas, observándose particularmente enriquecida en las fracciones 9 a la 12. El WB de esta proteína presenta una serie de bandas inespecíficas que no fueron posible eliminar aún ajustando la técnica. Estas bandas también se han observado por otros miembros de nuestro equipo de investigación cuando trabajan con el mismo anticuerpo. eNOS se localiza desde la fracción 5 hasta la 12 en donde se observa un aumento gradual de la fracción 5 a la 9, que luego va en decremento de las fracciones 10 a la 12. La localización de eNOS en las regiones de alta densidad es característica de su activación. La eNOS fosforilada (p-eNOS) Ser 1177 se encuentra fosforilada únicamente en las fracciones 7 a la 12. Cavina-1 se localiza en las fracciones 2 y 3, resistentes a detergentes (DRM), así como en las fracciones 7 a la 12. Cav-1 se encuentra desde la fracción 1 hasta la 11 particularmente enriquecida en las zonas de baja densidad donde colocaliza con el GM1 y con cavina-1 (Fig 6 a).

En las células estimuladas con (-)epicatequina, eNOS se encuentra desplazada hacia las fracciones de mayor densidad, aunque se observan niveles muy bajos en las fracciones 4 y 6. p-eNOS-Ser 1177 se encuentra fosforilada en las mismas fracciones donde se encuentra eNOS, lo que permite suponer que en estas fracciones la eNOS esta activa. De la misma manera cavina-1 también se observa únicamente en las fracciones 7 a la 12 a diferencia del control en el que además se localiza en las fracciones 2 y 3. Por otro lado, Cav-1 únicamente se encuentra en las fracciones menos densas con un claro enriquecimiento en las

fracciones 3, 4 y 5. El GM-1, al igual que en el control, fue detectado en las regiones menos densas que corresponden a las fracciones 1, 2 y 3 (Fig. 6 b).

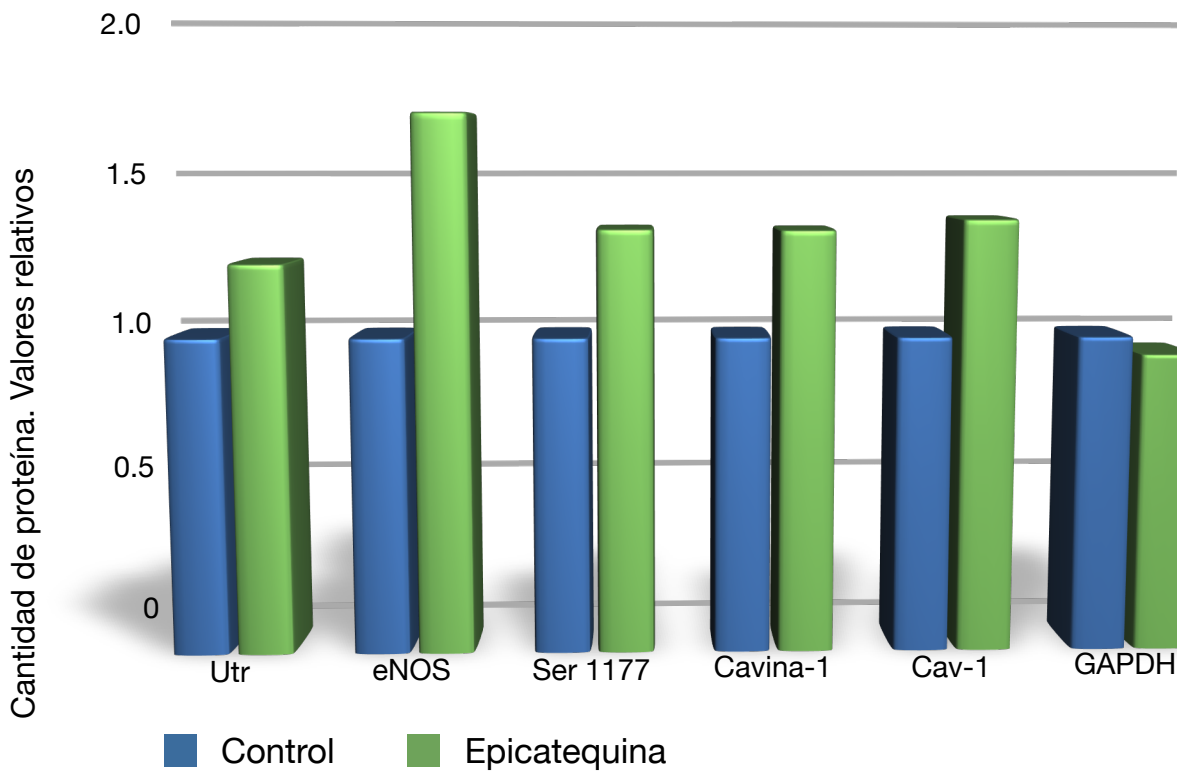
Por otro lado, se realizó una densitometría del patrón de bandas obtenidas para poder determinar la existencia de cambios en los niveles totales de cada una de las proteínas. En todas las proteínas analizadas se observan aumentos significativos en la cantidad cuando las células son sometidas a un estímulo prolongado de 24 hr con (-)epicatequina. El mayor aumento se observa en el caso de eNOS la cual aumento aproximadamente un 69 % y la fosforilación de eNOS-Ser 1177 aumenta en un 34 %. Cavina-1 y Cav-1 aumentan en aproximadamente un tercio su nivel mientras que Utr aumenta en un 23 %. En el caso del esta última proteína, se tomó en cuenta la banda superior para llevar a cabo los estudios de densitometría debido a que es la que corresponde a la isoforma completa. (Fig. 7) [86]

Efecto de la epicatequina sobre el complejo UAPC en HUVEC



**Fig. 6.** Distribución de los miembros del UAPC en las 12 fracciones separadas por gradiente de sacarosa a) HUVEC control. b) HUVEC estimuladas con (-)epicatequina 1  $\mu$ M durante 24 h. Utrofina (Utr), sintasas de óxido nítrico endotelial (eNOS), sintasa de óxido nítrico endotelial fosforilada en Ser 1177 (p-eNOS Ser 1177), cavina-1 y caveolina-1 (Cav-1). GAPDH y GMI utilizados como control.

Efecto de la epicatequina sobre el complejo UAPC en HUVEC



**Fig. 7.** Niveles relativos de proteína total en extractos de células estimuladas con Epi 1  $\mu$ M durante 24 hr en relación a células control.

## DISCUSIÓN

### Estandarización del cultivo de células HUVEC

Ultimamente, los efectos atribuibles al consumo de alimentos ricos en flavonoides ha llamado particularmente la atención. Dentro de estos alimentos, además del vino, las moras y el té verde, se encuentra el cacao, cuyo flavanol más abundante es la (-)epicatequina. Estudios recientes atribuyen a la (-)epicatequina la capacidad de actuar como antiinflamatorio y antioxidante así como de disminuir la presión arterial y mejorar la disfunción endotelial [102, 103]

En un estudio llevado a cabo por Ramírez-Sánchez et al [31]. se describió a la eNOS como componente del UAPC en células endoteliales resaltando el papel que desempeña este complejo en la regulación de la actividad de ésta enzima tan importante para la fisiología vascular. Por otro lado, diversos estudios recientes han señalado la importancia del complejo UAPC en el funcionamiento del músculo liso vascular [84, 104]. Las alteraciones en proteínas de este complejo se asocian a diversos tipos de distrofia muscular así como al desarrollo de cardiomiopatía dilatada. En análisis detallados llevados a cabo en ratones deficientes en  $\beta$ -SG con cardiomiopatía dilatada se encontró que además de alteraciones en músculo liso y cardíaco, estos ratones presentaban irregularidades en la vasculatura cardíaca lo que confirma la importancia del complejo UAPC en los vasos sanguíneos. Algunas estrategias enfocadas a aumentar la biodisponibilidad de NO

como manera de prevenir enfermedades cardiovasculares incluyen aquellos reportados en numerosos estudios [102, 105, 106] que señalan la capacidad de la (-)epicatequina para activar a la eNOS y así aumentar los niveles de NO. Estas observaciones nos motivaron a analizar los efectos crónicos de la (-)epicatequina sobre el complejo UAPC en células endoteliales.

Debido a la dificultad para obtener tejidos de vasculatura humana y a que los modelos animales no son siempre equivalentes al humano, el presente estudio se llevó a cabo en células endoteliales de vena de cordón umbilical humano que, al ser un tejido de fácil obtención, no representa un procedimiento invasivo para los pacientes. Previamente Ramirez-Sánchez et al. [31] caracterizaron el complejo UAPC en endotelio tanto de venas como arterias de cordón umbilical y observaron que no existía diferencia en la expresión de las proteínas del complejo entre los dos tipos de vasos sanguíneos. Por esta razón se optó por utilizar el endotelio de la vena para este trabajo.

A la técnica previamente reportada por Marin et al. [107] para la extracción de células endoteliales provenientes de vena de cordón umbilical humano, se le hicieron ciertas modificaciones para evitar problemas de contaminación y de bajo crecimiento. Los resultados obtenidos se optimizaron haciendo modificaciones a una serie de condiciones críticas. Una vez transportados, los cordones se lavaron con yodo para eliminar posibles contaminantes y se cortaron las puntas, eliminando así las regiones de la vena expuestas. Esto impidió que al insertar la



cánula en la vena se arrastraran microorganismos contaminantes. A su vez, se aumento la concentración de antibiótico-antimicótico del medio de cultivo.

Con el fin de comprobar la pureza del cultivo de endotelio, se probó la presencia del factor de Von Willebrand (VWF), glicoproteína que se utiliza como marcador de células endoteliales. La distribución del complejo DAPC/UAPC difiere en relación al tejido en el que se exprese. En músculo liso, se ha descrito la presencia del complejo DAPC/UAPC, formado por  $\beta$ ,  $\delta$ , y  $\epsilon$ -SG [85], unidos a distrofina o a utrofina. Al ser el músculo liso un tejido circundante y con importante interacción con el endotelio, era importante asegurar que la presencia de células musculares o fibroblastos no fuera significativa y el patrón de expresión de proteínas no pudiera ser alterada por poblaciones celulares diferentes a endotelio. Se contaron 20 campos ópticos en los cuáles el 100 % de las células resultaron positivas para el VWF. Esto nos lleva a concluir que nuestro cultivo es puro y homogéneo, lo que elimina el riesgo de un sesgo causado por otro tipo celular.

Para probar la capacidad de la Epi de inducir aumentos en los niveles de NO se utilizó la técnica 2- diacetato de diaminofluoresceína (DAF-2 DA). El DAF-2 DA es un reactivo no fluorescente capaz de permear la célula para medir NO libre en células vivas bajo condiciones fisiológicas. Una vez dentro de la célula, los grupos diacetato del DAF-2 DA son hidrolizados por esterasas citosólicas liberando al DAF-2. El NO convierte el DAF-2, no fluorescente a DAF-2T, fluorescente. Por lo anterior, esta técnica resultó una alternativa para poder medir los niveles de NO en tiempo real y de manera directa en lugar de llevar a cabo las mediciones por el

método indirecto de Griess. Se utilizó Epi en una concentración 1  $\mu\text{M}$  debido a las observaciones que indican una correlación entre los efectos in vitro generados con 1  $\mu\text{M}$  de Epi con los efectos cardioprotectores y de vasodilatación observados en los modelos animales y en el humano. En un estudio practicado en ratas a las que se les administró 1 mg/kg de Epi se observó que el pico máximo de concentración en plasma era de 1  $\mu\text{M}$ , alcanzado alrededor de una hora después del consumo. La concentración de 1  $\mu\text{M}$  de Epi también coincide con la concentración plasmática máxima del flavanol observada en humanos a las 2 hr del consumo de una bebida de cacao rica en flavonoides [108, 109].

En nuestro estudio, el nivel máximo de producción de NO ocurre entre los 15 y 20 min de aplicado el estímulo, lo que coincide con lo reportado por Ramírez-Sánchez et al [106]. A su vez esta ventana de tiempo de estimulación de NO coincide con aquellas reportadas para otros activadores de eNOS como la Bk utilizada como control positivo en nuestro experimento [110]. La falta de significancia de esta prueba podría ser atribuible a un error en la técnica donde la concentración de DAF-2 DA era mayor a la que el sistema era capaz de metabolizar. A pesar de que el aumento observado bajo los efectos de la Epi y la Bk no son significativos, se sabe que aumentos muy pequeños en los niveles de NO podían ser suficientes para desencadenar mecanismos celulares. Por otro lado, se ha observado que en situaciones donde la producción de NO es muy elevada, se entra en un estrés nitrosante provocando la muerte celular. Al ver un patrón de inducción de NO por parte de la Epi y de la Bk parecido al ya reportado,

tomamos estos aumentos de NO como suficientes para proseguir con el estímulo crónico de las HUVEC.

Con el fin de evaluar el efecto de la (-)epicatequina en periodos prolongados sobre las proteínas del complejo UAPC, las HUVEC se estimularon con el flavanol durante 24 h. Una vez llevado a cabo el estímulo con (-)epicatequina, se extrajo la proteína del cultivo control y del estimulado por medio del método previamente descrito. Las proteínas se separaron en 12 fracciones mediante un gradiente de sacarosa del 5-40 %. Debido a las diferencias en su composición lipídica y proteínica, las balsas lipídicas son resistentes a detergentes no iónicos a baja temperatura (4 °C). Además flotan en la fracción de baja densidad en los gradientes de sacarosa [111]. Esto permite que puedan ser aisladas fácilmente a través de la ultracentrifugación de gradientes de sacarosa permitiendo estudiar las características bioquímicas de los diferentes dominios membranales.

Cav-1 fue la primera proteína identificada como miembro estructural de caveolas, dominios enriquecidos en esfingolípidos, colesterol, esfingomiélin, con forma vesículas que están particularmente enriquecidas en moléculas de señalización [53]. Si bien es una proteína que se encuentra especialmente abundante en balsas lipídicas, hoy se sabe que puede estar en una variedad de dominios celulares como aparato de Golgi, RE y mitocondria [112]. Al analizar la expresión de las proteínas del complejo UAPC en nuestro control (Fig. 6 a) Cav-1 se localiza en casi todas las fracciones, con excepción de la 12, y particularmente abundante en las fracciones 1-3 donde correlaciona con GM1, lo cual indica que

estas regiones corresponden a balsas lipídicas. Algo que resalta es que en las células tratadas con Epi (Fig 6 b) además de aumentar en alrededor de 34 %, esta proteína solo se localiza en las fracciones 1-7, mostrando un enriquecimiento en las fracciones 3, 4, y 5. A pesar de que en el control y las células estimuladas con (-)epicatequina en la fracción 5 y 6. Por lo anterior sería interesante analizar la densidad de caveolas en la membrana de células tratadas y no tratadas con Epi.

Por otro lado, se puede observar que tanto en el control como bajo el estímulo de la (-)epicatequina, utrofina se encuentra fuera de los dominios de baja densidad. Existen reportes contradictorios con respecto a la localización de esta proteína en HUVEC. Nuestro grupo de trabajo encontró en un estudio previo a utrofina localizada no solo en los dominios de alta densidad sino también en balsas lipídicas y caveolas (datos no publicados). Por otro lado, de manera mas reciente, también en nuestro grupo de investigación se reportó la ausencia de esta proteína en las fracciones de baja densidad y el patrón de localización observado coincide con los resultados presentados en este trabajo.

Uno de los mecanismos de regulación de la actividad de eNOS consiste en su interacción con Cav-1 que compite por el sitio de unión a CaM. En condiciones basales cabría esperar que un alto porcentaje de eNOS estuviese localizado en balsas lipídicas caveolares donde su interacción con Cav-1 estaría suprimiendo su actividad. Estudios señalan que Cav-1 debe unirse al dominios reductasa de eNOS para abolir su capacidad de unirse a CaM y donar electrones en la

subunidad heme [113]. A pesar de que eNOS y Cav-1 se expresan por todo el sistema arterial, la mayoría de los estudios que demuestran una asociación entre las dos proteínas se llevaron a cabo en cultivos subconfluentes [114]. Sin embargo, en cultivos confluentes así como en células endoteliales nativas, eNOS se concentra en los contactos célula-célula cercana a la molécula de adhesión plaquetaria endotelial 1 (PECAM-1) y en el aparato de Golgi [115]. Además de esto, a pesar de que tanto Cav-1 como eNOS pueden ser encontradas en el aparato de Golgi, se encuentran localizadas en distintos compartimentos perinucleares y al no haber contacto físico entre ellas, la actividad de eNOS no es regulada por Cav-1 en Golgi [116]. En el control lo que se observa en las fracciones correspondientes a balsas lipídicas es una ausencia total de la proteína, lo que se contrapone con lo reportado acerca de eNOS y su ubicación en HUVEC [105]. Su localización se concentra en las fracciones 5 a la 12, aunque si colocaliza con Cav-1 en las regiones 5, 6 y 7. El análisis de la cantidad de p-eNOS Ser 1177 indica que si bien una parte de la eNOS localizada en las fracciones de alta densidad esta activa por medio de la fosforilación en este sitio, existe un porcentaje importante de la eNOS que ya sea, se encuentra inactiva o esté siendo activada a través de otros sitios de fosforilación como el de Ser 633 o Ser 113. Por otro lado, en las células estimuladas con Epi, se observa que la eNOS está desplazada hacia las fracciones de mayor densidad aunque también se encuentran cantidades muy pequeñas en las fracciones 3, 4 y 5. Al analizar el patrón de localización de p-eNOS Ser 1177 se puede observar que coincide con las fracciones en donde se localiza eNOS. Esto pudiera indicar que, bajo el efecto de la (-)epicatequina, eNOS se fosforila en este residuo, activandose y

translocándose hacia las regiones de mayor densidad. Esto coincide con lo reportado por Ramírez-Sánchez et al, que observaron que ante un estímulo corto de Epi, la eNOS se fosforilaba en los residuos Ser 1177, Ser 633 y se defosforilaba en la Thr 495 para finalmente desplazarse fuera de caveolas. Por otro lado, en ese mismo estudio se observó que la Epi es capaz de activar a eNOS de una manera independiente de calcio y de translocación, lo que significa que la enzima es fosforilada en los residuos antes mencionados sin que eso implique necesariamente un desacoplamiento de ésta de las caveolas. Nosotros observamos que en el caso de las células estimuladas con Epi hay presencia de pequeñas cantidades de eNOS-Ser1177 en las fracciones 4 y 5 donde colocalizaría con Cav-1 lo que va de acuerdo con el estudio arriba mencionado.

Aunque cavina-1 fue descrita en un principio como un factor de transcripción, hoy existen reportes que indican que, además de su función nuclear, es una proteína estructural de gran importancia, necesaria para la formación de caveolas. A pesar de que no existen reportes de la distribución de cavina-1 en gradientes de sacarosa, según estos antecedentes cabría esperar que la proteína estuviera localizada, además de las fracciones de alta densidad, en las fracciones correspondientes a balsas lipídicas caveolares. Nuestros resultados en las células control, además de mostrar la presencia de cavina-1 en las regiones de alta densidad que corresponden a las fracciones 7 a la 12, muestran a cavina en las fracciones 2 y 3, colocalizando con Cav-1 y con el GM1 lo que supone que está haciendo su función como proteína estructural de caveolas. De manera

interesante, en las células tratadas con Epi, se observa un aumento de aproximadamente 30 % de esta proteína distribuida entre las fracciones 7 a la 12.

Llama la atención que bajo el tratamiento de Epi, cavina-1 no se localiza en las regiones caveolares. Sinha et al [117] observaron que al someter a las células endoteliales a un shock hipo-osmótico, lo que causa un aumento en la tensión membranal, cavina-1 se separa de las caveolas, ocasionando la pérdida de la morfología caveolar. Este mecanismo otorga a la célula mayor superficie membranal para poder soportar el estiramiento. Nuestras observaciones en las células tratadas con Epi, donde cavina-1 no colocaliza con Cav-1 ni con GM1, podrían indicar que la epi simula los efectos observados ante un estímulo mecánico, siendo capaz de alterar la morfología caveolar dando así a la célula mayor superficie de membrana. Esto sigue la misma línea de observaciones realizadas en nuestro grupo de trabajo donde se vio que al aplicar un estímulo mecánico equibraxial, algunos componentes del complejo UAPC se desplazaban a otros dominios.

Además de las observaciones anteriores algo que llama la atención es que las proteínas del complejo UAPC estudiadas, aumentan su nivel en las células tratadas con Epi. Este tipo de aumentos ocurren comúnmente en genes cuyos promotores tienen sitios de unión a factores de transcripción que son activados por NO, segundo mensajero que se sabe aumenta por la acción de la Epi.

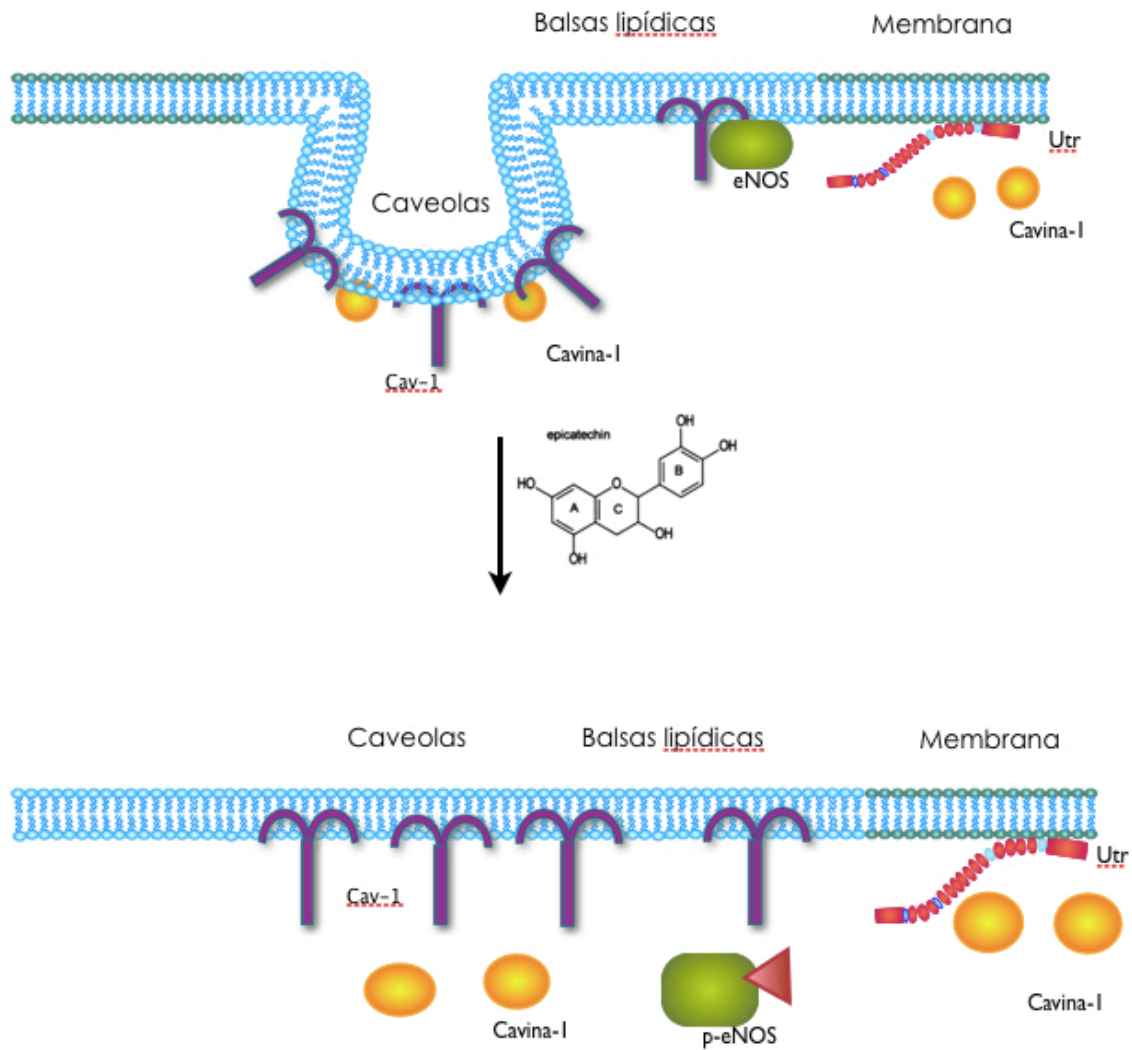
## **CONCLUSIONES**

La (-)epicatequina puede modificar la distribución y nivel de algunos miembros del UAPC.

La (-)epicatequina es capaz de alterar la morfología caveolar, otorgando posiblemente a la célula endotelial mayor superficie membranal para contrarrestar el estrés mecánico ejercido por la sangre.



Efecto de la epicatequina sobre el complejo UAPC en HUVEC



**Fig. 8.** Propuesta de remodelación de la composición proteínica del UAPC y alteración de la morfología caveolar por acción de la (-)epicatequina a tiempos prolongados. Cambios en el tamaño de las proteínas indican cambios en el nivel de éstas. Utrofina (Utr), sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS), caveolina-1 (Cav-1).

## **PERSPECTIVAS**

Para poder corroborar y cuantificar los aumentos en los niveles de NO en las células sometidas a un estímulo con (-)epicatequina, sería conveniente repetir el ensayo con DAF-2DA, ajustando las concentraciones del reactivo. También se podría cuantificar el NO por otro método como el indirecto de Griess.

Debido a que estudios señalan que la (-)epicatequina activa a la eNOS a través de la fosforilación de la Ser 1177 y de la Ser 633 y de la defosforilación de la Thr 495 durante un estímulo corto. Para alcanzar un mayor entendimiento sobre los mecanismos de acción de la (-)epicatequina a tiempos prolongados, sería recomendable analizar el estado de fosforilación de la Ser 633 y Thr 495 de la eNOS.

Con el fin de confirmar o descartar que Utr se encuentra en las regiones caveolares, se podría llevar a cabo una doble inmunofluorescencia con microscopio confocal contra las proteínas Utr y Cav-1 o Utr y GM1. Estos datos ayudarían a pensar en la colocalización de Utr con Cav.-1 en balsas lipídicas. Un experimento complementario de inmunoprecipitación con Cav-1 seguido de un WB de contra Utr aportaría evidencia directa de su interacción. Esto también serviría para confirmar si por efecto de la (-)epicatequina, la interacción de cavina-1 y Cav-1 se ve afectada. Por otro lado, la inmunomicroscopía electrónica con oro coloidal sería de gran utilidad para conocer si, el estímulo con (-)

epicatequina altera la estructura fina de las caveolas y la localización ultraestructural de las proteínas.

Estudios señalan que un aumento en la expresión de utrofina en modelos animales deficientes en distrofina (*mdx*) ayuda a aminorar los síntomas característicos de la distrofia muscular de Duchenne. Por lo tanto, sería de gran utilidad estudiar los efectos de la (-)epicatequina en otras líneas celulares o modelos animales, con el fin de observar si ante un tratamiento prolongado con el flavanol, los niveles de utrofina y de los otros miembros de complejo UAPC se elevan, y si estos aumentos conducen a una mejora en el fenotipo distrófico. De la misma manera, el tratamiento crónico con (-)epicatequina en modelos animales distróficos, ayudaría a determinar el efecto sobre la vasculatura cardíaca.

## REFERENCIAS

1. Davies, K.E. and K.J. Nowak, *Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(10): p. 762-73.
2. Ervasti, J.M., et al., *Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle*. Nature, 1990. **345**(6273): p. 315-9.
3. Yoshida, M. and E. Ozawa, *Glycoprotein complex anchoring dystrophin to sarcolemma*. J Biochem, 1990. **108**(5): p. 748-52.
4. Rando, T.A., *The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies*. Muscle Nerve, 2001. **24**(12): p. 1575-94.
5. Lidov, H.G., S. Selig, and L.M. Kunkel, *Dp140: a novel 140 kDa CNS transcript from the dystrophin locus*. Hum Mol Genet, 1995. **4**(3): p. 329-35.
6. Haenggi, T., et al., *The role of utrophin and Dp71 for assembly of different dystrophin-associated protein complexes (DPCs) in the choroid plexus and microvasculature of the brain*. Neuroscience, 2004. **129**(2): p. 403-13.
7. Moukhles, H. and S. Carbonetto, *Dystroglycan contributes to the formation of multiple dystrophin-like complexes in brain*. J Neurochem, 2001. **78**(4): p. 824-34.
8. Ueda, H., T. Baba, and S. Ohno, *Current knowledge of dystrophin and dystrophin-associated proteins in the retina*. Histol Histopathol, 2000. **15**(3): p. 753-60.
9. Ramirez-Sanchez, I., et al., *Expression and function of utrophin associated protein complex in stretched endothelial cells: dissociation and activation of eNOS*. Front Biosci, 2007. **12**: p. 1956-62.
10. Blake, D.J., et al., *Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle*. Physiol Rev, 2002. **82**(2): p. 291-329.
11. Durbeej, M., et al., *Distribution of dystroglycan in normal adult mouse tissues*. J Histochem Cytochem, 1998. **46**(4): p. 449-57.
12. Cohen, N. and F. Muntoni, *Multiple pathogenetic mechanisms in X linked dilated cardiomyopathy*. Heart, 2004. **90**(8): p. 835-41.
13. Haenggi, T. and J.M. Fritschy, *Role of dystrophin and utrophin for assembly and function of the dystrophin glycoprotein complex in non-muscle tissue*. Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(14): p. 1614-31.
14. Koenig, M. and L.M. Kunkel, *Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility*. J Biol Chem, 1990. **265**(8): p. 4560-6.
15. Koenig, M., A.P. Monaco, and L.M. Kunkel, *The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein*. Cell, 1988. **53**(2): p. 219-28.
16. Bork, P. and M. Sudol, *The WW domain: a signalling site in dystrophin?* Trends Biochem Sci, 1994. **19**(12): p. 531-3.
17. Ponting, C.P., et al., *ZZ and TAZ: new putative zinc fingers in dystrophin and other proteins*. Trends Biochem Sci, 1996. **21**(1): p. 11-13.

18. Ehmsen, J., E. Poon, and K. Davies, *The dystrophin-associated protein complex*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 14): p. 2801-3.
19. Imamura, M. and E. Ozawa, *Differential expression of dystrophin isoforms and utrophin during dibutyryl-cAMP-induced morphological differentiation of rat brain astrocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(11): p. 6139-44.
20. Norwood, F.L., et al., *The structure of the N-terminal actin-binding domain of human dystrophin and how mutations in this domain may cause Duchenne or Becker muscular dystrophy*. Structure, 2000. **8**(5): p. 481-91.
21. Amann, K.J., B.A. Renley, and J.M. Ervasti, *A cluster of basic repeats in the dystrophin rod domain binds F-actin through an electrostatic interaction*. J Biol Chem, 1998. **273**(43): p. 28419-23.
22. Grum, V.L., et al., *Structures of two repeats of spectrin suggest models of flexibility*. Cell, 1999. **98**(4): p. 523-35.
23. Pasternak, C., S. Wong, and E.L. Elson, *Mechanical function of dystrophin in muscle cells*. J Cell Biol, 1995. **128**(3): p. 355-61.
24. Love, D.R., et al., *An autosomal transcript in skeletal muscle with homology to dystrophin*. Nature, 1989. **339**(6219): p. 55-8.
25. Blake, D.J., et al., *Characterization of a 4.8kb transcript from the Duchenne muscular dystrophy locus expressed in Schwannoma cells*. Hum Mol Genet, 1992. **1**(2): p. 103-9.
26. Sogos, V., et al., *Developmentally regulated expression and localization of dystrophin and utrophin in the human fetal brain*. Mech Ageing Dev, 2002. **123**(5): p. 455-62.
27. Tinsley, J.M., et al., *Primary structure of dystrophin-related protein*. Nature, 1992. **360**(6404): p. 591-3.
28. Weir, A.P., et al., *A- and B-utrophin have different expression patterns and are differentially up-regulated in mdx muscle*. J Biol Chem, 2002. **277**(47): p. 45285-90.
29. Chakkalakal, J.V., et al., *Expression of utrophin A mRNA correlates with the oxidative capacity of skeletal muscle fiber types and is regulated by calcineurin/NFAT signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(13): p. 7791-6.
30. Winder, S.J., *The complexities of dystroglycan*. Trends Biochem Sci, 2001. **26**(2): p. 118-24.
31. Ramirez-Sanchez, I., et al., *Expression analysis of the SG-SSPN complex in smooth muscle and endothelial cells of human umbilical cord vessels*. J Vasc Res, 2005. **42**(1): p. 1-7.
32. Sciandra, F., et al., *Identification of the beta-dystroglycan binding epitope within the C-terminal region of alpha-dystroglycan*. Eur J Biochem, 2001. **268**(16): p. 4590-7.
33. Bozzi, M., et al., *A synthetic peptide corresponding to the 550-585 region of alpha-dystroglycan binds beta-dystroglycan as revealed by NMR spectroscopy*. FEBS Lett, 2001. **499**(3): p. 210-4.
34. Jung, D., et al., *Identification and characterization of the dystrophin anchoring site on beta-dystroglycan*. J Biol Chem, 1995. **270**(45): p. 27305-10.

35. Yang, B., et al., *SH3 domain-mediated interaction of dystroglycan and Grb2*. J Biol Chem, 1995. **270**(20): p. 11711-4.
36. Yoshida, T., et al., *Bidirectional signaling between sarcoglycans and the integrin adhesion system in cultured L6 myocytes*. J Biol Chem, 1998. **273** (3): p. 1583-90.
37. James, M., et al., *Adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of (beta)-dystroglycan regulates its interaction with utrophin*. J Cell Sci, 2000. **113** ( Pt 10): p. 1717-26.
38. Sotgia, F., et al., *Tyrosine phosphorylation of beta-dystroglycan at its WW domain binding motif, PPxY, recruits SH2 domain containing proteins*. Biochemistry, 2001. **40**(48): p. 14585-92.
39. Henry, M.D. and K.P. Campbell, *Dystroglycan: an extracellular matrix receptor linked to the cytoskeleton*. Curr Opin Cell Biol, 1996. **8**(5): p. 625-31.
40. Ahn, A.H., et al., *Cloning of human basic A1, a distinct 59-kDa dystrophin-associated protein encoded on chromosome 8q23-24*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(10): p. 4446-50.
41. Peters, M.F., M.E. Adams, and S.C. Froehner, *Differential association of syntrophin pairs with the dystrophin complex*. J Cell Biol, 1997. **138**(1): p. 81-93.
42. Gorecki, D.C., et al., *Differential expression of syntrophins and analysis of alternatively spliced dystrophin transcripts in the mouse brain*. Eur J Neurosci, 1997. **9**(5): p. 965-76.
43. Claudepierre, T., et al., *Characterization of the intermolecular associations of the dystrophin-associated glycoprotein complex in retinal Muller glial cells*. J Cell Sci, 2000. **113** Pt 19: p. 3409-17.
44. Loh, N.Y., et al., *Role of beta-dystrobrevin in nonmuscle dystrophin-associated protein complex-like complexes in kidney and liver*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(21): p. 7442-8.
45. Buechler, C., et al., *The carboxyterminus of the ATP-binding cassette transporter A1 interacts with a beta2-syntrophin/utrophin complex*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **293**(2): p. 759-65.
46. Piluso, G., et al., *Gamma1- and gamma2-syntrophins, two novel dystrophin-binding proteins localized in neuronal cells*. J Biol Chem, 2000. **275**(21): p. 15851-60.
47. Crosbie, R.H., et al., *Membrane targeting and stabilization of sarcospan is mediated by the sarcoglycan subcomplex*. J Cell Biol, 1999. **145**(1): p. 153-65.
48. Holt, K.H. and K.P. Campbell, *Assembly of the sarcoglycan complex. Insights for muscular dystrophy*. J Biol Chem, 1998. **273**(52): p. 34667-70.
49. Liu, L.A. and E. Engvall, *Sarcoglycan isoforms in skeletal muscle*. J Biol Chem, 1999. **274**(53): p. 38171-6.
50. Straub, V., et al., *epsilon-sarcoglycan replaces alpha-sarcoglycan in smooth muscle to form a unique dystrophin-glycoprotein complex*. J Biol Chem, 1999. **274**(39): p. 27989-96.
51. Anderson, R.G., *The caveolae membrane system*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 199-225.

52. Smart, E.J., et al., *Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(11): p. 7289-304.
53. Shaul, P.W. and R.G. Anderson, *Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction*. Am J Physiol, 1998. **275**(5 Pt 1): p. L843-51.
54. Kurzchalia, T.V., et al., *VIP21, a 21-kD membrane protein is an integral component of trans-Golgi-network-derived transport vesicles*. J Cell Biol, 1992. **118**(5): p. 1003-14.
55. Rothberg, K.G., et al., *Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats*. Cell, 1992. **68**(4): p. 673-82.
56. Parolini, I., et al., *Expression of caveolin-1 is required for the transport of caveolin-2 to the plasma membrane. Retention of caveolin-2 at the level of the golgi complex*. J Biol Chem, 1999. **274**(36): p. 25718-25.
57. Tang, Z., et al., *Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle*. J Biol Chem, 1996. **271**(4): p. 2255-61.
58. Monier, S., et al., *VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro*. Mol Biol Cell, 1995. **6**(7): p. 911-27.
59. Tagawa, A., et al., *Assembly and trafficking of caveolar domains in the cell: caveolae as stable, cargo-triggered, vesicular transporters*. J Cell Biol, 2005. **170**(5): p. 769-79.
60. Pelkmans, L. and M. Zerial, *Kinase-regulated quantal assemblies and kiss-and-run recycling of caveolae*. Nature, 2005. **436**(7047): p. 128-33.
61. Bu, J., et al., *Glutamate regulates caveolin expression in rat hippocampal neurons*. J Neurosci Res, 2003. **72**(2): p. 185-90.
62. Harris, J., et al., *Expression of caveolin by bovine lymphocytes and antigen-presenting cells*. Immunology, 2002. **105**(2): p. 190-5.
63. Liu, L. and P.F. Pilch, *A critical role of cavin (polymerase I and transcript release factor) in caveolae formation and organization*. J Biol Chem, 2008. **283**(7): p. 4314-22.
64. Hill, M.M., et al., *PTRF-Cavin, a conserved cytoplasmic protein required for caveola formation and function*. Cell, 2008. **132**(1): p. 113-24.
65. Hayer, A., et al., *Biogenesis of caveolae: stepwise assembly of large caveolin and cavin complexes*. Traffic. **11**(3): p. 361-82.
66. Wanaski, S.P., B.K. Ng, and M. Glaser, *Caveolin scaffolding region and the membrane binding region of SRC form lateral membrane domains*. Biochemistry, 2003. **42**(1): p. 42-56.
67. Dudzinski, D.M., et al., *The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2006. **46**: p. 235-76.
68. Alderton, W.K., C.E. Cooper, and R.G. Knowles, *Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition*. Biochem J, 2001. **357**(Pt 3): p. 593-615.
69. Michel, T. and P.M. Vanhoutte, *Cellular signaling and NO production*. Pflugers Arch. **459**(6): p. 807-16.
70. Shaul, P.W., et al., *Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae*. J Biol Chem, 1996. **271**(11): p. 6518-22.
71. Dudzinski, D.M. and T. Michel, *Life history of eNOS: partners and pathways*. Cardiovasc Res, 2007. **75**(2): p. 247-60.

72. Michel, J.B., et al., *Caveolin versus calmodulin. Counterbalancing allosteric modulators of endothelial nitric oxide synthase*. J Biol Chem, 1997. **272**(41): p. 25907-12.
73. Ju, H., et al., *Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity*. J Biol Chem, 1997. **272**(30): p. 18522-5.
74. Chen, P.F. and K.K. Wu, *Characterization of the roles of the 594-645 region in human endothelial nitric-oxide synthase in regulating calmodulin binding and electron transfer*. J Biol Chem, 2000. **275**(17): p. 13155-63.
75. Bauer, P.M., et al., *Compensatory phosphorylation and protein-protein interactions revealed by loss of function and gain of function mutants of multiple serine phosphorylation sites in endothelial nitric-oxide synthase*. J Biol Chem, 2003. **278**(17): p. 14841-9.
76. Fulton, D., J.P. Gratton, and W.C. Sessa, *Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough?* J Pharmacol Exp Ther, 2001. **299**(3): p. 818-24.
77. Michell, B.J., et al., *Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase*. J Biol Chem, 2001. **276**(21): p. 17625-8.
78. Fleming, I., et al., *Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity*. Circ Res, 2001. **88**(11): p. E68-75.
79. Shaul, P.W., *Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location*. Annu Rev Physiol, 2002. **64**: p. 749-74.
80. Hoffman, E.P., R.H. Brown, Jr., and L.M. Kunkel, *Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus*. Cell, 1987. **51**(6): p. 919-28.
81. Roberds, S.L., et al., *Missense mutations in the adhalin gene linked to autosomal recessive muscular dystrophy*. Cell, 1994. **78**(4): p. 625-33.
82. Lim, L.E., et al., *Beta-sarcoglycan: characterization and role in limb-girdle muscular dystrophy linked to 4q12*. Nat Genet, 1995. **11**(3): p. 257-65.
83. Noguchi, S., et al., *Mutations in the dystrophin-associated protein gamma-sarcoglycan in chromosome 13 muscular dystrophy*. Science, 1995. **270**(5237): p. 819-22.
84. Coral-Vazquez, R., et al., *Disruption of the sarcoglycan-sarcospan complex in vascular smooth muscle: a novel mechanism for cardiomyopathy and muscular dystrophy*. Cell, 1999. **98**(4): p. 465-74.
85. Wheeler, M.T. and E.M. McNally, *Sarcoglycans in vascular smooth and striated muscle*. Trends Cardiovasc Med, 2003. **13**(6): p. 238-43.
86. Sudano, I., et al., *Protection of endothelial function: targets for nutritional and pharmacological interventions*. J Cardiovasc Pharmacol, 2006. **47 Suppl 2**: p. S136-50; discussion S172-6.
87. Rassaf, T., et al., *Evidence for in vivo transport of bioactive nitric oxide in human plasma*. J Clin Invest, 2002. **109**(9): p. 1241-8.
88. de Belder, A.J., et al., *Effects of S-nitroso-glutathione in the human forearm circulation: evidence for selective inhibition of platelet activation*. Cardiovasc Res, 1994. **28**(5): p. 691-4.



89. Libby, P., P.M. Ridker, and A. Maseri, *Inflammation and atherosclerosis*. *Circulation*, 2002. **105**(9): p. 1135-43.
90. Loscalzo, J., *Nitric oxide and vascular disease*. *N Engl J Med*, 1995. **333**(4): p. 251-3.
91. Marti, V., et al., *Coronary endothelial dysfunction and myocardial cell damage in chronic stable idiopathic dilated cardiomyopathy*. *Int J Cardiol*, 2002. **82**(3): p. 237-45.
92. Endemann, D.H. and E.L. Schiffrin, *Endothelial dysfunction*. *J Am Soc Nephrol*, 2004. **15**(8): p. 1983-92.
93. Martínez-Flórez, S., et al., *Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes*. *Nutrición Hospitalaria*, 2002. **XVII**(6): p. 271-278.
94. Adamson, G.E., et al., *HPLC method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity*. *J Agric Food Chem*, 1999. **47**(10): p. 4184-8.
95. Keen, C.L., et al., *Cocoa antioxidants and cardiovascular health*. *Am J Clin Nutr*, 2005. **81**(1 Suppl): p. 298S-303S.
96. Spencer, J.P., et al., *Epicatechin and its in vivo metabolite, 3'-O-methyl epicatechin, protect human fibroblasts from oxidative-stress-induced cell death involving caspase-3 activation*. *Biochem J*, 2001. **354**(Pt 3): p. 493-500.
97. Hollenberg, N., *Vascular action of cocoa flavanols in humans: the roots of the story*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2006. **47 Suppl 2**: p. S99-102; discussion S119-21.
98. Mink, P.J., et al., *Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality: a prospective study in postmenopausal women*. *Am J Clin Nutr*, 2007. **85**(3): p. 895-909.
99. 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.
100. Heiss, C., et al., *Endothelial function, nitric oxide, and cocoa flavanols*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2006. **47 Suppl 2**: p. S128-35; discussion S172-6.
101. Jaffe, E.A., et al., *Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria*. *J Clin Invest*, 1973. **52**(11): p. 2745-56.
102. Schroeter, H., et al., *(-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(4): p. 1024-9.
103. Ding, E.L., et al., *Chocolate and prevention of cardiovascular disease: a systematic review*. *Nutr Metab (Lond)*, 2006. **3**: p. 2.
104. Cohn, R.D., et al., *Prevention of cardiomyopathy in mouse models lacking the smooth muscle sarcoglycan-sarcospan complex*. *J Clin Invest*, 2001. **107**(2): p. R1-7.
105. Ramirez-Sanchez, I., et al., *(-)-Epicatechin induces calcium and translocation independent eNOS activation in arterial endothelial cells*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2011. **300**(4): p. C880-7.

106. Ramirez-Sanchez, I., et al., *(-)-epicatechin activation of endothelial cell endothelial nitric oxide synthase, nitric oxide, and related signaling pathways*. Hypertension, 2010. **55**(6): p. 1398-405.
107. Marin, V., et al., *Endothelial cell culture: protocol to obtain and cultivate human umbilical endothelial cells*. J Immunol Methods, 2001. **254**(1-2): p. 183-90.
108. Richelle, M., et al., *Plasma kinetics in man of epicatechin from black chocolate*. Eur J Clin Nutr, 1999. **53**(1): p. 22-6.
109. Rein, D., et al., *Epicatechin in human plasma: in vivo determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status*. J Nutr, 2000. **130**(8S Suppl): p. 2109S-14S.
110. Ignjatovic, T., et al., *Kinin B1 receptors stimulate nitric oxide production in endothelial cells: signaling pathways activated by angiotensin I-converting enzyme inhibitors and peptide ligands*. Mol Pharmacol, 2004. **66**(5): p. 1310-6.
111. Simons, K. and E. Ikonen, *Functional rafts in cell membranes*. Nature, 1997. **387**(6633): p. 569-72.
112. Li, W.P., et al., *Cell-specific targeting of caveolin-1 to caveolae, secretory vesicles, cytoplasm or mitochondria*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 7): p. 1397-408.
113. Ghosh, S., et al., *Interaction between caveolin-1 and the reductase domain of endothelial nitric-oxide synthase. Consequences for catalysis*. J Biol Chem, 1998. **273**(35): p. 22267-71.
114. Garcia-Cardena, G., et al., *Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: implications for nitric oxide signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(13): p. 6448-53.
115. Andries, L.J., D.L. Brutsaert, and S.U. Sys, *Nonuniformity of endothelial constitutive nitric oxide synthase distribution in cardiac endothelium*. Circ Res, 1998. **82**(2): p. 195-203.
116. Fleming, I., *Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS*. Pflugers Arch. **459**(6): p. 793-806.
117. Sinha, B., et al., *Cells respond to mechanical stress by rapid disassembly of caveolae*. Cell. **144**(3): p. 402-13.