

**Actividad antiinflamatoria de los
coproductos de cacao (*Theobroma cacao*) en
células humanas cancerígenas (HT-29)**

Katherine Nicolle Chávez Velásquez

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano

Honduras

Noviembre, 2015

ZAMORANO
CARRERA AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

**Actividad antiinflamatoria de los
coproductos de cacao (*Theobroma cacao*) en
células humanas cancerígenas (HT-29)**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar por el
título de Ingeniera en Agroindustria Alimentaria en el grado académico de
Licenciatura

Presentado por

Katherine Nicolle Chávez Velásquez

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2015

Actividad antiinflamatoria de los coproductos de cacao (*Theobroma cacao*) en células humanas cancerígenas (HT-29)

Presentado por:

Katherine Nicolle Chávez Velásquez

Aprobado:

Jorge Cardona, Ph.D.
Asesor Principal

Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Director
Departamento de Agroindustria
Alimentaria

Adriana Hernández, D.S.P.
Asesora

Raúl H. Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

Actividad antiinflamatoria de los coproductos de cacao (*Theobroma cacao*) en células humanas cancerígenas (HT-29)

Katherine Nicolle Chávez Velásquez

Resumen: Cáncer de colon es el tercer cáncer más común a nivel mundial y lo han tratado con el grano de cacao ya que poseen una cantidad importante de polifenoles, sin embargo, no se han evaluado otras partes del fruto. El objetivo de este estudio fue cuantificar e identificar polifenoles en cinco partes del fruto de cacao y evaluar su actividad antiinflamatoria. Se usaron diseños completamente al azar para proliferación de células cancerígenas de colon HT-29 (cinco extractos y cinco concentraciones); proliferación de células intestinales de miofibroblasto CCD-18 (dos extractos y cinco concentraciones); generación de especies oxígeno reactivo (ROS) y expresión genética (dos extractos y dos concentraciones). Los extractos de granos de cacao y cáscara presentaron mayores concentraciones de polifenoles y fueron utilizados para continuar el estudio. Ambos extractos suprimieron la proliferación de HT-29 sin afectar la de CCD-18 con mejores resultados para el extracto de cáscara. Ninguno de los extractos pudo evitar la formación de ROS presentando datos similares al control. Se observó reducción en expresión de marcadores de inflamación (IL-6 y IL-1 β) y un incremento en la expresión de tres marcadores de apoptosis (Citocromo C, Caspasa 3 y Caspasa 9) que aceleran muerte celular. Se recomienda continuar esta investigación in vivo.

Palabras clave: Apoptosis, expresión genética, fruta, polifenoles, subproductos.

Abstract: Colon cancer is the third most common cancer worldwide and it has been treated with cacao dried beans due the important amount of polyphenols they have, however, the rest of the fruit has not been evaluated. The objective of this study was to identify and quantify polyphenols of 5 parts of the cacao fruit and evaluate its anti-inflammatory activities. Completely randomized designs were used for colon cancer cell proliferation HT-29 (five extracts and five concentrations); intestinal myofibroblast cell proliferation CCD-18 (two extracts and five concentrations); reactive oxygen species (ROS) and gene expression (two extracts and two concentrations). The dried beans and fruit husk extracts presented the highest amounts of polyphenols and were used for the rest of the experiment. Both extracts suppressed HT-29 proliferation without harming CCD-18 cells showing better results with the fruit husk. None of the extracts decreased the formation of ROS that presented similar data to the control. A decrease on the expression of inflammation markers (IL-6 y IL-1 β) was shown while an increase on the expression of apoptosis markers (Citocromo C, Caspasa 3 y Caspasa 9) was demonstrated. It is recommended to continue this investigation in vivo.

Keywords: Apoptosis, fruit, gene expression, polyphenols, sub products.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de cuadros y figuras	v
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MATERIALES Y METODOS	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	12
4. CONCLUSIONES	26
5. RECOMENDACIONES	27
6. LITERATURA CITADA	28

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros	Página
1. Diseño experimental de proliferación de células de cáncer de colon (HT-29).....	3
2. Diseño experimental de proliferación de células intestinales de miofibroblasto (CCD-18).	4
3. Diseño experimental de especies reactivas al oxígeno (ROS) en células de cáncer de colon (HT-29).	4
4. Diseño experimental de especies reactivas al oxígeno (ROS) en células de colon saludables (CCD-18) y expresión genética en células cancerígenas de colon (HT-29).....	5
5. Análisis de espectrometría de masas de los compuestos en ($\mu\text{g/mL}$) presentes en los cinco extractos de cacao.	14

Figuras	Página
1. Ejemplo estructurales de un monómero (catequina), dímeros (procianidina B2) y trímeros (procianidina polimérica).....	12
2. Ejemplos estructurales de los alcaloides teobromina y cafeína.	13
3. Proliferación de células cancerígenas de colon (HT-29) en presencia de cinco extractos de cacao.	15
4. Proliferación de células benignas de colon (CCD-18) en presencia de dos extractos de cacao.	15
5. Generación de especies reactivas a oxígeno (ROS) en células cancerígenas de colon tratadas con cinco extractos de cacao; Cáscara Seca, Mucílago Seco, Pergamino Seco, Grano Fermentado, y Grano Seco.....	18
6. Generación de especies reactivas a oxígeno (ROS) en células del miofibroblasto CCD-18Co, tratadas con extracto de cáscara seca y grano seco. ...	19
7. Efecto de diferentes tratamientos en células cancerígenas de colon (HT-29) en la expresión del primer IL-1B.	21
8. Efecto de diferentes tratamientos en células cancerígenas de colon (HT-29) en la expresión del primer IL-6.....	22
9. Efecto de diferentes tratamientos en células cancerígenas de colon (HT-29) en la expresión del primer de apoptosis Citocromo C.	23
10. Efecto de diferentes tratamientos en células cancerígenas de colon (HT-29) en la expresión del primer de apoptosis Caspase 9.....	24
11. Efecto de diferentes tratamientos en células cancerígenas de colon (HT-29) en la expresión del primer de apoptosis Caspase 3.....	25

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad creciente en número y tipos. El cáncer es un grupo de células anormales que crecen fuera de control (American Cancer Society, 2014). Las células presentan su anormalidad en el ADN que forma los genes que contienen los cromosomas en el núcleo de la célula (American Cancer Society, 2014). Cuando los genes de las células sufren un trauma, obliga a la célula a emitir señales erróneas en las cuales ordena multiplicación celular. Las nuevas unidades formadas por células con ADN dañado, contienen el mismo defecto en el ADN, toman vida propia, y se multiplican de una manera caótica hasta formar un tumor. Las células anormales pierden el control de su crecimiento porque han perdido la propiedad de apoptosis. Apoptosis es la muerte programada que tienen todas las células saludables con el propósito de identificar cuando la célula ya cumplió su función y necesita morir. Este proceso permite que los tejidos mantengan su forma y sus respectivas funciones con el tiempo (Jordán, 2003). Así, las células saludables tienen un tiempo determinado de vida a diferencia de las células cancerígenas que no logran hacer esa identificación. Crecen fuera de control e invaden tejidos ajenos en donde empezó el cáncer (American Cancer Society, 2014).

Entre las causas de cáncer entran: herencia de genes anormales, exposición a virus, intoxicaciones, productos químicos, radiación, sol y hábitos no saludables (American Cancer Society, 2014). Sin embargo desde el siglo diecinueve se ha vinculado el crecimiento de tumores en lugares donde existe inflamación crónica (Mantovani *et al.*, 2008). Entre todos los tipos de cáncer, el cáncer de colon ha sido uno de los más estudiados y vinculados con inflamación (Shacter y Weitzman, 2002). Las enfermedades de inflamación crónicas que predisponen las células a posibles anomalías son colitis de úlcera crónica y la enfermedad de Crohn's (Shacter y Weitzman, 2002). Se estima que para el año 2015 el cáncer de colon será el tercer caso más detectado (American Cancer Society, 2015) de los 132,700 nuevos casos de cáncer (American Cancer Society, 2014).

Los tratamientos para el cáncer de colon (cirugía, quimioterapia y radioterapia) provocan efectos secundarios bastante riesgosos para la vida humana. En un intento de buscar opciones alternas a estas se han usado extractos de varias frutas con el fin de reducir la proliferación celular de cáncer sin perjudicar la proliferación de células saludables (Arlorio, 2009). Estas frutas tienen altos contenidos de fotoquímicos fenólicos, los compuestos responsables de reducción de la proliferación cancerígena (Martin, 2013). Sin embargo, se ha comprobado que el cacao tiene un contenido fenólico tres veces más alto que muchas de las frutas utilizadas con el mismo fin (Lim, 2012). Un fenol en

composición química es un anillo aromático con un grupo hidroxilo (Lim, 2012). Los polifenoles que están ampliamente distribuidos en las plantas comestibles y que son conocidos por sus beneficios nutricionales son encontrados en el cacao como la principal fracción de antioxidantes activos de este fruto (Arlorio, 2009). Dado su rico contenido de polifenoles el cacao también provoca una actividad que puede prevenir el daño al ADN reduciendo la actividad de carcinogénesis que es el principio del desarrollo de todos los tipos de cáncer (Lim, 2012). Ya se ha comprobado la reducción de proliferación de células cancerígenas con el grano de cacao en distintos estados del mismo (tostado y no tostado). Sin embargo el grano tostado también reduce levemente la proliferación normal de las células saludables y provoca una pérdida significativa de polifenoles solubles que resulta en una pérdida de actividad (Arlorio, 2009).

En los estudios investigados solo se ha usado el grano de cacao excluyendo los co-productos del mismo fruto. Los co-productos serían; la cáscara de todo el fruto, el mucílago, y el pergamino de los granos del cacao. De estos tres, la cáscara del fruto y el pergamino de los granos han sido usados como extractos de pectina y fibra dietética respectivamente. Estos dos también han sido opciones ambientales y económicas de fertilizantes dado su riqueza en N, K, Ca, y P. Sin embargo, en la mayoría de países en donde crece este cultivo aun es visto como un desperdicio y no le dan ningún uso (Lateef *et al.*, 2008).

El cacao es un fruto tropical de tres variedades, criollo (elaboración de chocolates gourmet), forastero (tiene el índice más alto de producción pero la menor calidad), y el trinitario (cruce entre criollo y trinitario). La variedad trinitario es el más producido y procesado en Honduras. Sin embargo, la cáscara y el mucílago constituyen 75% del fruto (FHIA, 2014). Aunque en algunos países le han encontrado uso, todavía no son usados por completo ni permanecen en proceso constante. En Honduras es tirado como desperdicio cuando se podría usar con fines investigativos. Ya que aún no han sido evaluados como extractos de polifenoles para reducir proliferación cancerígena, este estudio está encaminado a evaluar la factibilidad de estos co-productos como tratamiento médico natural de cáncer de colon.

Los objetivos del estudio fueron:

- Evaluar el contenido de polifenoles en extractos de diferentes partes del cacao.
- Determinar el efecto de extractos con diferentes concentraciones en proliferación celular y en especies de oxígeno reactivo (ROS).
- Evaluar expresión genética de marcadores de inflamación y apoptosis en células tratadas con los extractos más efectivos en reducción de proliferación celular.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima. Para el estudio se utilizaron todas las partes del fruto del cacao (cáscara de cacao, mucílago, pergamino de grano seco, grano fermentado, y grano seco) provistas por la Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA) en Atlántida, Honduras. Las materias fueron deshidratadas en horno de secado para cacao. El grano fermentado quedó en una humedad menor al 40% y el resto de materias quedaron en una humedad menor al 8% antes de ser enviadas vía aérea a Estados Unidos para sus análisis.

Localización del estudio. Este proyecto se llevó a cabo en la Universidad Texas A&M, College Station, Texas, Estados Unidos. La primera etapa del estudio se realizó en el Laboratorio de Química de Alimentos y la segunda etapa en el Laboratorio de Nutrición Humana y Ciencia de los Alimentos.

Diseños del estudio. El estudio se desarrolló en tres etapas. La primera fue evaluar la proliferación de células cancerígenas de colon (HT-29) durante tres días. Se usó diseño completo al azar (DCA) con arreglo factorial de 5×5 de cinco extractos; (cáscara de cacao, mucílago, pergamino de grano seco, grano fermentado, y grano seco) y cinco concentraciones para cada extracto (5, 10, 25, 50, o 100 µg/mL). Dichas concentraciones se eligieron de acuerdo a la efectividad de las mismas en estudios previos (Banerjee *et al.*, 2013) y (Martinez *et al.*, 2013). Además, los tratamientos fueron comparados con un control al que no se aplicó ningún extracto. Hubo un total de 25 tratamientos evaluados siete veces por repetición y 3 repeticiones obteniendo así 525 unidades experimentales (Cuadro 1).

Cuadro 1. Diseño experimental de proliferación de células de cáncer de colon (HT-29).

Extractos	Concentraciones (µg/mL)				
	5	10	25	50	100
Cáscara seca	TRT 1	TRT 2	TRT 3	TRT 4	TRT 5
Mucílago seco	TRT 6	TRT 7	TRT 8	TRT 9	TRT 10
Pergamino seco	TRT 11	TRT 12	TRT 13	TRT 14	TRT 15
Grano fermentado	TRT 16	TRT 17	TRT 18	TRT 19	TRT 20
Grano seco	TRT 21	TRT 22	TRT 23	TRT 24	TRT 25

†TRT: tratamiento.

Continuando la primera etapa se evaluó el crecimiento de células intestinales de miofibroblasto (CCD-18). Se usó un diseño completo al azar (DCA) con arreglo factorial de 2×5. Dos extractos; el más efectivo reduciendo proliferación celular para HT-29 que resulto ser la cáscara de cacao comparado con el extracto de grano seco utilizado actualmente en la industria alimentaria con fines de investigación. Cada extracto con cinco concentraciones (5, 10, 25, 50, o 100 µg/mL) (Cuadro 2). Dichas concentraciones se eligieron de acuerdo a la efectividad de las mismas en estudios previos (Banerjee *et al.*, 2013). Además, los tratamientos fueron comparados con un control en el cual no se aplicó ningún extracto para un total de nueve tratamientos con dos repeticiones.

Cuadro 2. Diseño experimental de proliferación de células intestinales de miofibroblasto (CCD-18).

Extractos	Concentraciones (µg/mL)				
	5	10	25	50	100
Cáscara seca	TRT 1	TRT 2	TRT 3	TRT 4	TRT 5
Grano seco	TRT 6	TRT 7	TRT 8	TRT 9	TRT 10

†TRT: tratamiento.

La segunda etapa constó de medir las especies reactivas al oxígeno para ambas líneas celulares. En las células cancerígenas se usó un diseño completo al azar (DCA) con arreglo factorial de 2 × 2 (Cuadro 3). Dos extractos con dos concentraciones cada uno (5 o 10 µg/mL) (Noratto *et al.*, 2011). Son cuatro tratamientos comparados con un control al cual no se le agregó ningún extracto.

Cuadro 3. Diseño experimental de especies reactivas al oxígeno (ROS) en células de cáncer de colon (HT-29).

Extractos	Concentraciones (µg/mL)	
	5	10
Cáscara seca	TRT 1	TRT 2
Grano seco	TRT 3	TRT 4

† TRT: tratamiento.

Para ROS en las células de miofibroblasto de colon (CCD-18) se usó un diseño completo al azar (DCA) con arreglo factorial de 2×2 (Cuadro 4). Dos extractos con dos concentraciones cada uno (10 o 20 µg/mL) (Noratto *et al.*, 2011). Son cuatro tratamientos los cuales fueron comparados con el control positivo (células sin extracto pero con TNF-α que las indujo a inflamación) y el control negativo (el cual no tiene presencia de extractos ni fueron inducidas con TNF-α).

Para la tercera etapa, en expresión genética de las células cancerígenas de colon (HT-29) se usó el mismo diseño experimental de ROS de las células de miofibroblasto de colon CCD-18.

Cuadro 4. Diseño experimental de especies reactivas al oxígeno (ROS) en células de colon saludables (CCD-18) y expresión genética en células cancerígenas de colon (HT-29).

Extractos	Concentraciones (µg/mL)	
	10	20
Cáscara seca	TRT 1	TRT 2
Grano seco	TRT 3	TRT 4

† TRT: tratamiento.

Preparación de muestras. Se inició pesando y licuando cinco gramos de cada parte del cacao con una licuadora de mano (HamiltonBeach®) con el objetivo de romper las paredes celulares de todas las partes del cacao y dejar los compuestos químicos disponibles. Posteriormente se dejó en agua reposando un día con el fin de suavizar las muestras para molerlos con el textumizador.

Contenido de fenoles totales (Folin-Ciocalteu). Se midió la cantidad total de polifenoles solubles en la Fase I de este experimento, a través de la medición de la capacidad reductora de la muestra. Se utilizó 0.1 mL de la muestra a analizar, y a este se le adicionó 1 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu (0.25M). Luego se mezcló y dejó reposar por tres minutos. A la mezcla se le adicionó 1 mL de carbonato de sodio 1M (Na₂CO₃ 1M), se mezcló y dejó reposar por siete minutos. Posterior a esto, se adicionó a la mezcla 5 mL de agua, se mezcla y deja reposar 45 minutos, pasado este tiempo se leyó absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 726 nm. Se realizó una curva estándar de ácido gálico utilizando diferentes concentraciones con el objetivo de obtener la pendiente de este y utilizar la fórmula [1], para calcular la concentración total de polifenoles solubles. Los resultados fueron reportados en mg/kg de equivalentes de ácido gálico (Reyes 2014).

$$\text{Concentración (ppm)} = (\text{Absorbancia/Pendiente}) \times \text{Factor de dilución. [1]}$$

Preparación de los cinco extractos. Se molieron cinco gramos de cada material con 15mL de agua para ablandar al mismo. Una vez reposado por 24 horas, a cada muestra se le retiró el agua y se preparó la solución que consistía en 1mL de ácido acético al 40%, 500mL de metanol y 500mL de agua. Se agregó 10mL de solución a cada muestra y se usó el textumizador para suavizar las partículas del cacao y así estas liberaron los polifenoles. Se dejó reposar por 24 horas a oscuras.

Se filtró con gasa para separar la pulpa del cacao de los solventes mezclados con los compuestos químicos del cacao. Se evaporaron los solventes en el evaporador rotatorio (Bunchi®Rotovapor II) para obtener los compuestos químicos del cacao y el agua que queda en el extracto (Reyes 2014).

Se realizó una segunda extracción utilizando la pulpa que quedo en la gasa en el proceso de filtración, se le adicionó metanol y acetona en proporciones 2:1:1 para realizar una segunda extracción, se dejó reposar 30 minutos, luego fue filtrado utilizando un embudo büchner con papel filtro FisherScientific® Q8 y una bomba de vacío. Se evaporaron los solventes en el evaporador rotatorio (Bunchi®Rotovapor II), se realizó una tercera extracción utilizando la misma pulpa usada en la segunda extracción y el mismo procedimiento. Finalmente, se mezcló el producto de las tres extracciones con el fin de obtener un solo extracto (Reyes 2014). Se transfirió el extracto ya concentrado a tubos de 2 ml para facilitar su almacenamiento a -20 grados Celsius.

Metodología de cromatografía de líquidos de alto rendimiento/espectrometría de masas (HPLC/MS). El método de HPLC/MS fue utilizado para identificar y cuantificar los compuestos de los cinco extractos de cacao ya que Anderson y Markham aseguraron en su libro en el 2006 que es el método más efectivo para la medición de flavonoides. El HPLC hace una fácil y rápida identificación de los compuestos de los extractos. Las dos fases móviles usadas en este estudio fueron de metanol y agua. Se usó una separación de fase reversa en una columna kinetex phenomenex® C-18 con las medidas de 150×4.6, 2.6 µm. Después de que cada extracto atravesó la identificación del HPLC, se cuantifico cada compuesto en el espectrómetro de masas por medio de una trampa de iones.

Siembra de células y cambio de medio. Para los procesos de proliferación celular, especies reactivas al oxígeno, expresión genética y expresión proteica se siguieron los lineamientos planteados según León (2014). En este estudio se utilizó células de cáncer de colon HT-29 y células intestinales de miofibroblasto CCD-18Co (ATCC Manassas, VA) siguiendo el protocolo de Noratto *et al.* 2011. Las células cancerígenas se cultivaron en un medio de 500mL de McCoy, 50mL de FBS y 5mL de penicilina. Para las células saludables se hizo 500mL de medio de alta glucosa (Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM) (Invitrogen, Carlsbad, CA), el cual fue suplementado con soluciones de 1% penicilina/estreptomina, 1% aminoácidos no esenciales (10mL), 1% piruvato de sodio (100mL) y 20% suero bovino fetal. Todos los insumos antes mencionados fueron suplidos por Invitrogen (Carlsbad, CA).

Las soluciones utilizadas fueron buffer de fosfato salino (PBS) 10% en 90% de agua des ionizada. FBS 10% suero bovino fetal (Invitrogen, Carlsbad, CA) en 90% solución de PBS. 0.25% de tripsina para células saludables y 0.50% de tripsina para células cancerígenas (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las soluciones y el medio fueron filtrados

previos a su uso para eliminar contaminación. Se utilizó las soluciones antes mencionadas en los diferentes estudios realizados.

Para los ensayos realizados fue necesario tener una cantidad específica de células a utilizar, la confluencia a utilizar dependió del ensayo, en el caso de división celular en platos de 100mL se buscó una confluencia de 90% para poder dividirlos. Al inicio de cada siembra se calentó las soluciones y el medio a 37 °C a baño maría ISOTemp 210. Se extrajo viales de células CCD18 y HT-29 del tanque de nitrógeno líquido, las cuales se dejaron descongelar a temperatura ambiente hasta que estuvieran completamente descongeladas, simultáneo al descongelamiento se preparó la cámara de flujo laminar (Forma 1400 Series Biological Safety and Cabinet, AEX 127905, Thermo Electron Corporation) se desinfectó con etanol al 70% los guantes, el medio y las soluciones extraídas del baño maría simultáneamente para obtener un área estéril donde no hubiera cabida a contaminación. Las células descongeladas fueron extraídas del vial (1 mL) y colocadas en un plato. Con la ayuda de una pipeta, se agregó medio DMEM (8 mL) para las células CCD18 y medio McCoy (8 mL) en cada plato sembrado. Se agitó los platos para lograr una buena homogenización y se llevó a la incubadora (Hepa class 100 forma series II, Thermo electron Corporation) por 24 horas. Se rotuló los platos con las iniciales del que siembra las células, la fecha de siembra, el pasaje encontrado en los viales y el nombre de la línea celular. Pasadas las 24 horas, se observó los platos bajo el microscopio esperando que las células estuvieran adheridas al fondo del plato posteriormente se aspiró el medio, se enjuagó con PBS (8 mL) para eliminar la solución con la que se congeló a las células y se incubó por 48 horas a 37 °C y 5% CO₂.

Después de 48 horas de incubación se observó la confluencia (población celular dada en porcentaje de manera empírica) de los platos sembrados, la cual debe encontrarse entre un 85-90% para que estos fueran aptos para su división. Cuando la confluencia fue baja se reemplazó el medio cada 48 horas, en este caso se aspiró el medio, se enjuagó con solución salina PBS (8mL) para eliminar células muertas, posteriormente se aspiró el PBS y se agregó medio nuevo (8mL).

Se escogieron los platos aptos para división, se aspiró el medio antiguo de estos y se agregó 8 mL PSB (para enjuagar las células), posteriormente se aspiró el PBS y se agregó 1 mL de tripsina al 0.25% para las CCD18 y tripsina al 0.50% para las HT-29 el plato se incubó por cinco minutos, durante esto la tripsina actuó desnaturalizando las proteínas, posteriormente se observó el plato bajo el microscopio asegurándonos que las células se desprendieron, posteriormente se agregó 8mL de FBS para inhibir la acción de la tripsina y se transfirió con la ayuda de una pipeta a un tubo tipo Falcon de 50mL, con mucho cuidado de no dejar células adheridas al plato, posteriormente se centrifugó a 1,200 rpm por dos minutos a 25 °C en la Jovan CR3: Centrifuga multifunción, Thermo Electron Corporation. La centrifugación sedimentó las células al fondo del tubo tipo Falcon, del cual cuidadosamente se aspiró la solución flotante y se agregó 2mL de medio por cada

plato utilizado, se mezcló cuidadosamente. Se rotularon los platos nuevos, con la ayuda de una pipeta se tomó del tubo tipo Falcon 1 mL de células y se agregó al nuevo plato, también se le agregó 8 mL de medio se mezcló bien y se incubó por 48 horas a 37 °C y 5% de CO₂ en incubadora de CO₂, Hepa class 100 forma series II, Thermo Electron Corporation, se tomó en cuenta que cada plato con 85- 90% de confluencia que se dividió, se obtuvo dos platos más, con un pasaje superior al anterior.

Preparación de células. Se tomó de la incubadora la cantidad de platos necesarios dependiendo de su confluencia. Se aspiró el medio antiguo y se agregó 8 mL PBS (para enjuagar las células), este se aspiró y se agregó 1 mL de tripsina al 0.25% para los ensayos de las células CCD18 y 0.50% de tripsina para las HT-29. Se incubó el plato por cinco minutos, donde la tripsina hidrolizó los péptidos, una vez terminado los cinco minutos, se observó el plato bajo el microscopio asegurándonos que las células se desprendieron, posteriormente se agregó 8 mL de FBS, así se inhibió la acción de la tripsina y con la ayuda de una pipeta se transfirió todo el contenido del plato a un tubo tipo Falcon de 50 mL con mucho cuidado de no dejar células adheridas al plato, el tubo se centrifugó a 1,200 rpm por dos minutos a 25 °C en la Jovan CR3: Centrífuga multifunción, Thermo Electron Corporation. La centrifugación sedimentó las células al fondo del tubo tipo Falcon, del cual cuidadosamente se aspiró la solución flotante y se agregó 1mL de medio por cada plato utilizado, se mezcló cuidadosamente.

Para la siembra de platos primero se realizó el conteo de células. Para ello, se tomó una cubeta de 10 mL de solución isotónica y 50 µL de suspensión de células, se mezcló y se llevó al contador de células (Z2 Contador y Analizador de Células. Beckman Coulter). Con el número de células obtenidas se calculó la cantidad de medio y de suspensión celular que se utilizó para la posterior siembra. Para cada ensayo se usaron diferentes cantidades de células.

Proliferación celular. Este ensayo se realizó con CellTiter 96® para las células HT-29 y CellTiter 24® para las células CCD18 Aqueous One Solution (Promega, Madison, WI). Se sembraron las células CCD18 en platos Petri de 24 pocillos con un total de 5,00 células por pocillo. Las células HT-29 se sembraron en platos Petri de 96 pocillos con 10,000 células por pocillo. Se colocó 100 µL de mezcla en cada pocillo, se incubó el plato por 24 horas hasta ser adheridas en el fondo del plato. Al día siguiente se agregaron los extractos, en cada una de las concentraciones previamente calculadas.

Las concentraciones para CCD18 fueron: 10, 20, 50 y 100 ppm con dos replicas para cada concentración y cinco controles. Para HT-29 las concentraciones fueron: 5, 10, 25, 50 y 100 ppm con siete réplicas para cada concentración y siete controles. Para las células HT-29 se aspiró el medio antiguo y se agregó el medio con las concentraciones antes provistas, se colocó 100 µL en cada pocillo de la nueva mezcla. El conteo celular se realizó dos días posteriores, se aspiró el medio de cada pocillo y se añadió 100 µL PBS y

se aspiró. Se agregó 30 μ L sustancia de Alamar Blue en cada pocillo, se incubó por tres horas. Para su posterior lectura a una absorbancia de 490nm (BMG Labtech Inc., Durham, NC). El conteo de células se efectuó con un contador de partículas electrónico FLUOstar Omega microplate reader (BMG Labtech Inc, Durhan, NC) el cual otorgó un conteo de crecimiento celular menor al control, ya que el crecimiento debió ser inhibido por el extracto. Para la proliferación celular de las células CCD18 el conteo final se hizo en el Muse Cell Analyzer Counter tras haber rasguñado las células de los pocillos y ponerlas en tubos tipo flask de 2 mL. Se absorbió el medio y se agregó el solvente Muse que permitió un conteo de crecimiento celular igual a los controles.

Generación de especies reactivas a oxígeno (ROS). Para las células CCD-18 se sembró a una densidad de 5,000 células por pocillo. Para ambos ensayos se sembró en platos de 96 pocillos. Para el ensayo de CCD18 se colocó 100 μ L de mezcla en cada pocillo, se incubó por 24 horas hasta ser adheridas en el fondo del plato. Al día siguiente se absorbió el medio antiguo y se le agregó 100 μ L de los extractos con las concentraciones previamente calculadas (10 y 20 ppm). Se incubó durante una hora y posteriormente, se aspiró el medio y se agregó 100 μ L de extracto. Después de 24 horas se añadió el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α 10ng/ml) para inducir inflamación, se colocó en incubación a 37 °C durante tres horas, se retiró de incubación, se enjuagó con 100 μ L de PBS, se aspiró el PBS y se agregó 10 μ L 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) se incubó durante 30 minutos a 37 °C, para su posterior lectura a 520 nm de emisión y 480 nm de excitación en el FLUOstar Omega microplate reader (BMG Labtech Inc, Durhan, NC).

Para las células HT-29 se sembró a una densidad de 8,000 células por pocillo. Después de 24 horas se trató cada pocillo con 200 μ L de tratamiento con las concentraciones de 5 y 100 ppm de extracto. Después de 24 horas se aspiró el medio y se lavó con 100 μ L de PBS dos veces. Se aspiró el PBS y se agregó 10 μ L 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) se incubó durante 30 minutos a 37 °C, para su posterior lectura a 520nm de emisión y 480nm de excitación en el FLUOstar Omega microplate reader (BMG Labtech Inc, Durhan, NC).

Evaluación de expresión genética. Para la extracción de ácido ribonucleico (ARN) se utilizó platos de 12 pocillos a una densidad de 150,000 células/pocillo, en cada pocillo se colocó un volumen de 1 mL de mezcla, el cual se incubó por 24 horas hasta que las células se adhirieran al plato. Pasadas las 24 horas, se aspiró el medio con el que se sembró las células y se agregó el medio con extracto en las concentraciones de 10 y 20 ppm con 1mL en cada pocillo, el plato se colocó en incubación Hepa class 100 forma series II. Thermo Electron Corporation a 37 °C y 5% de CO₂, por cuatro horas, Después de las cuatro horas se aspiró la mezcla y se agregó 0.5 mL de solución de PBS para lavar las células, luego se aspiró la solución y se agregó 350 μ L de RLT Lisis Buffer posteriormente se congeló a -80 °C por 24 horas.

Utilizando el Mini Kit RNeasy, QIAGEN Sample & Assays technology, Cat. # 74104, se raspó cada pocillo tratando de extraer todas las células que estaban adheridas al fondo del pocillo, se transfirió a columnas Qia Shredder spin, para su centrifugación utilizando Micro centrífuga, (Accuspin Micro 17R Fisher Scientist), a 8,000 g por dos minutos. Se descartó el sobrenadante y se agregó 250 μ l de etanol al 70% a cada columna RNeasy mini spin se centrifugó a 8,000 g durante 15 segundos y se descartó el fluido. Se agregó 700 μ L de buffer RW1 en cada columna, se centrifugó a 8,000 g durante 15 segundos y se descartó el fluido. Se agregó 500 μ L de Buffer RPE, se centrifugó a 8,000 g durante 15 segundos y se descartó el fluido. Se agregó nuevamente 500 μ L de Buffer RPE se centrifugó a 8,000 g durante 15 segundos, posterior a esto se cambió los tubos de colección por otros para ser centrifugado a 13,000 rpm durante un minuto para eliminar cualquier residuo de las soluciones. Se colocó nuevos tubos de colección de 1.5 mL, en la mini centrífuga previamente utilizada y se agregó a cada uno de los tubos 30 μ L de agua libre de nucleasas, se centrifugó a 8,000 g durante 1 minuto para así finalmente obtener en los tubos de 1.5 mL el ARN extraído de las células, el cual se colocó en hielo y se descartó las columnas RNeasy Mini spin.

Posterior a esto se midió la calidad y concentración del ARN obtenido de cada muestra, para esto se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 Thermo Scientific. El ARN obtenido se utilizó para el análisis de reacción en cadena de polimerasa (PCR) en tiempo real.

Reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (RT PCR). Esta es una técnica de biología molecular cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo. en este estudio con las concentraciones y la calidad de ARN que se obtuvo, se calculó la cantidad de agua y ARN (10 μ L en total de toda la mezcla) necesarios a utilizar para realizar la reacción en cadena de polimerasa.

Se prepararon los mini tubos de RT-PCR previamente rotulados con el número de muestra y se agregó la cantidad de agua y ARN necesarias, se prepararon dos mezclas maestras (I, II) provenientes de Applied Biosystems (Foster City, Ca) y se agregaron 2 μ L de la mezcla maestra I a cada tubo, se colocaron en incubación durante cinco minutos a 65 °C. Luego se agregaron 7.8 μ L de mezcla maestra II a cada tubo, se incubaron durante una hora a 50 °C, una vez concluido esto, se agregaron 100 μ L de agua a las muestras, para tener suficiente muestra, se colocaron las muestras en hielo para prevenir la degradación.

Durante la incubación de las muestras, se prepararon las mezclas de los primers o cebadores en el plato para PCR con 8 μ L cada pocillo y 2 μ L de la muestra para un total de 10 μ L, se escogieron cinco primers (para inflamación IL-6, IL-1B y para apoptosis Citocromo C, Caspase 9 y Caspase 3) (Integrated DNA Technologies, Inc. San Diego, CA) a utilizar, cada uno diseñado con un objetivo en específico para la transcripción del

mRNA. Cada primer (en pares) por lo cual se tiene el anterior y el posterior, estos fueron mezclados de la siguiente forma: 10 μ L de anterior, 10 μ L del posterior y 80 μ L de agua.

El plato para PCR con 10 μ L con la mezcla de muestra y primers en cada pocillo se centrifugó a 3,000 \times g por cinco minutos a 22 $^{\circ}$ C, para su posterior lectura de PCR utilizando el Equipo de PCR en tiempo Real (7900 HT Fast Real Time, Sequence detection system, Applied Biosystems) durante dos horas. Se realizó una cuantificación relativa y se basó los datos reportados en la relación de microARN de un gen específico respecto a la cantidad de otro gen (control) que en este caso fue GPDH, la presencia de este gen en comparación con los primers anteriormente nombrados, indican la cantidad de inflamación que se tiene es decir si fue inducida o reducida. También se indicó la existencia o carencia de una inducción de apoptosis.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un fenol es un anillo aromático unido a un grupo hidroxilo (OH). Los polifenoles son varios de estos anillos unidos por enlaces covalentes. En este estudio se encontraron cuatro tipos de polifenoles. Monómeros, dímeros, trímeros y tetrameros. Sus diferencias radican en la cantidad de polifenoles unidos. Un monómero es un solo polifenol, en este caso epicatequina. Un dímero es dos polifenoles unidos y así sucesivamente con trímeros y tetrameros. La figura 1 es un ejemplo de un monómero (catequina) y como se unen los dímeros y trímeros a partir de ella. Aparte de polifenoles en este estudio se encontraron dos alcaloides: teobromina y cafeína. Los alcaloides también son anillos benceno con la diferencia que incluyen un nitrógeno dentro de la estructura cíclica los cuales se pueden apreciar en la figura 2.

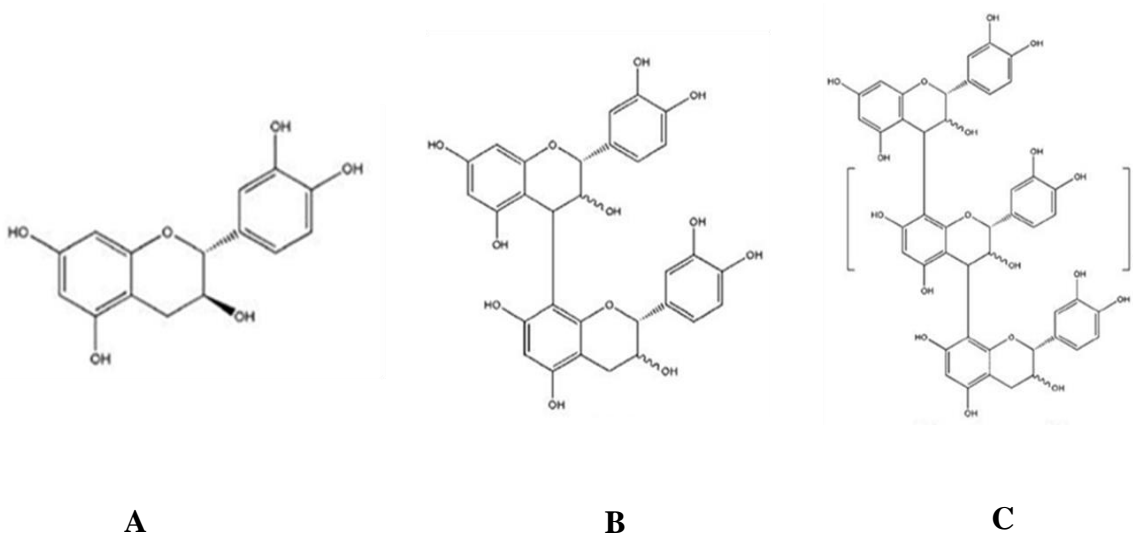


Figura 1. Ejemplos estructurales de un monómero (A), dímero (B) y trímero (C) (Coleman 2004).

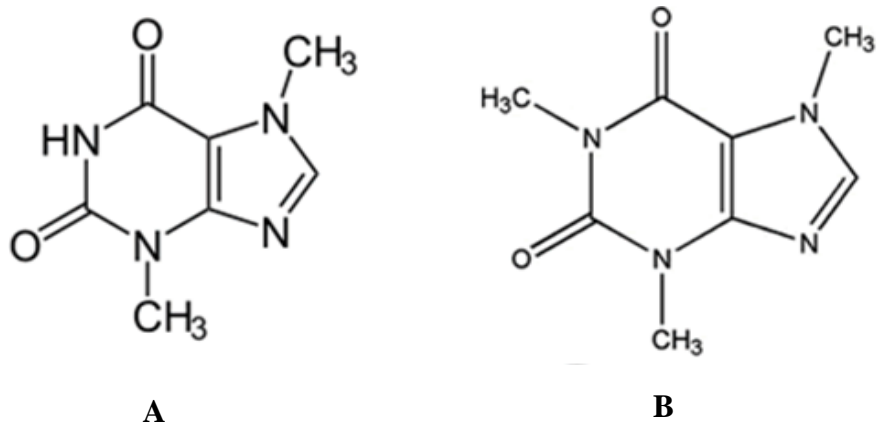


Figura 2. Ejemplos estructurales de los alcaloides teobromina (A) y cafeína (B) (Coleman 2004).

El contenido total de polifenoles en cacao se debe al origen (Othman *et al.*, 2005). Según Elwers (2009), los polifenoles encontrados en el grano de cacao de las diferentes variedades como forastero, criollo y trinitario no son significativamente diferentes en polifenoles totales y en la sustancia fenólica dominante. Cabe mencionar que los dos polifenoles encontrados comúnmente en el cacao son epicatequina y catequina. Aparte de los polifenoles, teobromina y cafeína son de los fitoquímicos más encontrados en el cacao (Vinson, 1999). Cabe recalcar que los datos brindados en el cuadro 5 fueron cortesía del laboratorio de Química de Alimentos de Texas A&M que realizaron una cuantificación única de los extractos de cacao de este estudio.

En el cuadro 5 el pergamino seco no contiene dos trómeros y la cáscara seca no contiene los dos alcaloides (cafeína y teobromina), epicatequina y un trómero. La ausencia de alcaloides es común en las cáscaras de varios frutos aunque el interior del fruto como el cacao sea rico en ellos (Vinson, 1999). El alto contenido de polifenoles del grano seco ya ha sido expuesto en estudios anteriores como en estudios de Arlioro (2009) y Vinson (1999). En cambio Karim (2014), es de los pocos que ha realizado un estudio de análisis completo de la cáscara de cacao. El expuso que la actividad antioxidante de la cáscara seca para la piel humana es dos veces más alta que otras fuentes de antioxidante utilizados en cosméticos para mujeres. Sin embargo en ningún estudio se ha comparado el contenido fenólico de todas las partes del cacao por separado como en este estudio. En el que se obtuvo que el grano seco poseé el contenido fenólico más alto y la cáscara seca con apenas el 46% de polifenoles totales que el grano seco es el segundo más alto.

Cuadro 5. Análisis de espectrometría de masas de los compuestos en ($\mu\text{g/mL}$) presentes en los cinco extractos de cacao.

Compuesto	Extractos ($\mu\text{g/mL}$)				
	pergamino seco	grano seco	grano fermentado	cáscara seca	mucílago seco
Cafeína	247	270	134	NE	240
Teobromina	309	219	137	NE	183
Epicatequina	9	111	12	NE	24
Dímero 1	2652	9779	2597	4480	3647
Dímero 2	343	2092	728	591	646
Trimero-1	437	3295	618	1665	1008
Trimero-2	1726	7112	3908	4038	3345
Trimero-3	NE	880	401	NE	267
Trimero-4	NE	1079	340	313	311
Tetrámero	106	813	344	689	225
Polifenoles totales	5,274	25,161	8,948	11,776	9,472

† NE: No encontrado

Proliferación Celular (HT-29 y CCD-18). En la primera etapa, en el ensayo de células cancerígenas se encontró diferencias en la viabilidad de las células de acuerdo a la presencia de los extractos a diferentes concentraciones ($P < 0.05$). Sin embargo entre repeticiones del ensayo no se encontró mayor variación lo cual indica que se realizó un buen control de los factores como el tiempo de incubación, medio utilizado y pipeteo.

Cabe mencionar que actualmente para estudios con fines investigativos médicos, la única parte del cacao que se ha usado es el grano. En cambio en este estudio fueron usados cinco extractos del fruto del cacao (cáscara seca, mucílago seco, pergamino seco, grano seco, y grano fermentado) fueron usados con las concentraciones 5, 10, 25, 50, o 100 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 3).

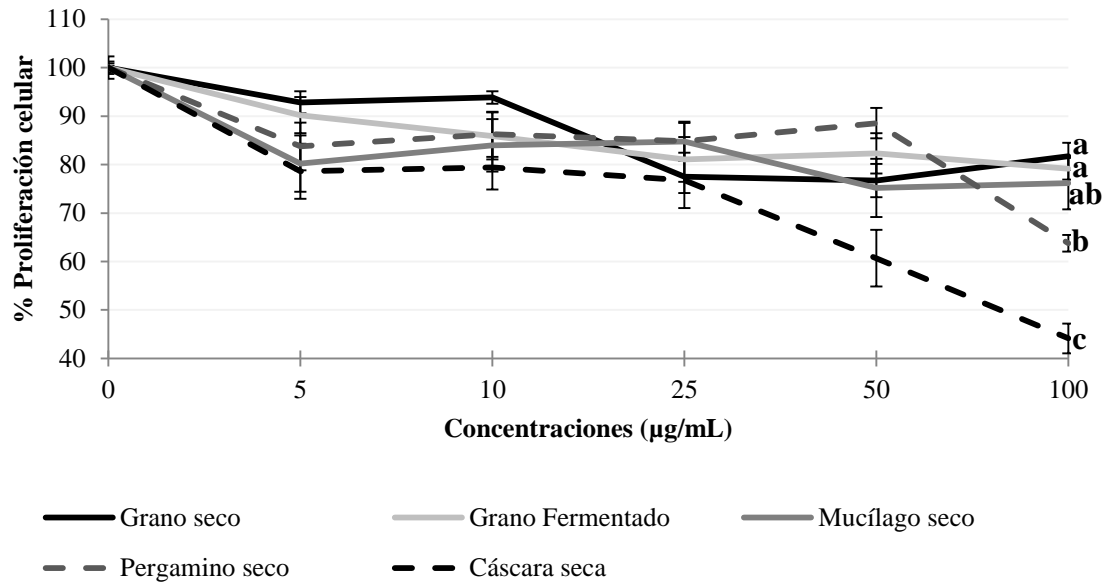


Figura 3. Proliferación de células cancerígenas de colon (HT-29) en presencia de cinco extractos de cacao.

†a: Diferencia significativa en reducción de crecimiento celular en comparación con los demás extractos.

Las dos líneas punteadas del pergamino seco y cáscara seca redujeron en mayor cantidad la proliferación de células cancerígenas con 36% y 56% respectivamente. Sin embargo, fue el último el que mostro diferencia significativa de los demás extractos. Es importante notar que estos dos extractos fueron los únicos que presentaron ausencia de algunos polifenoles y la cáscara seca el único extracto que no contiene teobromina ni caféina. En cambio el grano seco aun conteniendo la mayor cantidad de polifenoles entre los extractos fue el extracto de menor efectividad con un 18% de inhibición celular.

Estos resultados concuerdan con Herbert (1996), que planteaba que no se trata de la cantidad de fotoquímicos que le administremos al cuerpo si no la calidad de los mismos supliendo las necesidades de nuestro cuerpo en las concentraciones correctas. Los polifenoles demostraron una vez más ser eficientes reduciendo el crecimiento de células cancerígenas como en el estudio de Arlioro (2009), que redujo proliferación celular con extractos de polifenoles del grano de cacao. También se concuerda con Del Follo (2012) que con extracto de polifenoles de Acaí fue capaz de reducir más la proliferación celular a medida aumentaba la concentración del extracto.

Para la proliferación celular de las células saludables de colon (CCD-18) se utilizó el extracto más efectivo en que inhibió el crecimiento de células cancerígenas (cáscara seca de cacao) y el extracto que actualmente se utiliza para tratar cáncer y que está

ampliamente investigado que es el extracto de polifenoles del grano seco del fruto de cacao.

No se encontró diferencias ($P=0.2427$) en la viabilidad celular en presencia de los extractos a diferentes concentraciones (Figura 4). En los resultados obtenidos no se encontró mayor variación entre repeticiones, lo cual indica que se realizó un buen control de los diferentes factores como tiempo de incubación, medio utilizado y pipeteo.

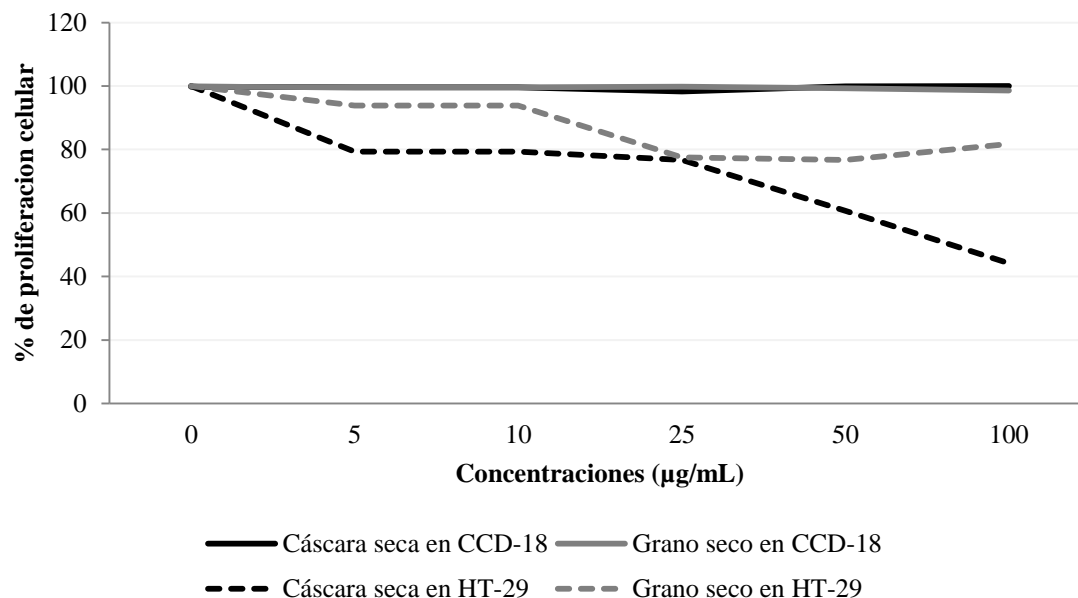


Figura 4. Proliferación celular de células CCD-18Co células del miofibroblasto y células cancerígenas de colon HT-29 en presencia de extractos de cáscara seca y grano seco. †Sin presencia de letras en la línea celular CCD-18 representa: no diferencias significativas en el decrecimiento de células saludables de colon respecto al control.

Los resultados indicaron que ningún extracto con las dosis aplicadas inhibió el crecimiento celular de CCD-18 en cambio, los dos mismos extractos redujeron la proliferación celular de las células cancerígenas de colon (HT-29). Las células CCD-18 tampoco demostraron ninguna tendencia de mayor concentración, menor proliferación celular o inversamente. Esto se pudo deber a que los polifenoles actúan como antioxidantes, y al no existir condiciones de estrés oxidativo que produzcan radicales libres a los que donar electrones, los polifenoles no tuvieron ningún tipo de actividad sobre las células humanas saludables. Los resultados de este estudio concuerdan con resultados de otros estudios como los de Dell Follo y Arlioro que redujeron la proliferación de células cancerígenas. Así mismo, concuerda con estudios como los de Scalbert (2005), que demostraron que la acción protectora de los polifenoles va más allá de solo modular el estrés oxidativo. The American Clinical Nutrition (2005) también

publico evidencia de que los polifenoles actúan como un mecanismo de protección para las células benignas en contra de epidemias.

Especies reactivas de oxígeno (ROS). Estas especies incluyen iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos orgánicos e inorgánicos. Son moléculas muy pequeñas altamente reactivas debido a la presencia de una capa de electrones de valencia no apareada. Estas especies se forman de manera natural como subproducto del metabolismo natural del oxígeno. Sin embargo, sus niveles pueden aumentar en ambientes de estrés como sucede en células cancerígenas y resulta en incrementos de daños estructurales a las células. Las células se defienden mediante antioxidantes y el cuerpo tiene mecanismos para contrarrestar sus efectos siempre y cuando se mantengan en concentraciones bajas (Halliwell, 1989). Así, los polifenoles actúan como antioxidantes al eliminar radicales libres reduciendo los niveles de estrés oxidativo.

Las concentraciones en el ensayo de ROS para HT-29 (Figura 5) se escogieron basados en concentraciones utilizadas en estudios anteriores (Noratto *et al.*, 2011) y también escogiendo las concentraciones en las que al menos en un extracto fueron capaces de reducir del 20-30% de proliferación celular en las células HT-29. Ya que las concentraciones 5, 10 y 25 $\mu\text{g/mL}$ redujeron en al menos un extracto los porcentajes de proliferación antes mencionados se utilizó solo el 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$ por fines prácticos.

Los dos extractos que causaron más estrés oxidativo ($P < 0.05$) fueron los extractos cáscara seca y pergamino seco con los porcentajes de ROS de 153.15 y 173.64%, respectivamente. Estos dos extractos no demostraron efectividad reduciendo el estrés oxidativo. Sin embargo, también fueron los dos extractos más efectivos en inhibir la proliferación celular de HT-29. Los resultados de este estudio coinciden con los de Noratto y colaboradores (2011) que exponen que las células humanas expuestas a bajas concentraciones de polifenoles el estrés oxidativo aumenta. Y cuando se le administran concentraciones altas, arriba de 25 $\mu\text{g/mL}$, el estrés oxidativo se reduce significativamente. Aunque en este ensayo no se estudiaron más de dos concentraciones en ROS, si sigue con la tendencia que obtuvo Noratto si se aumentan las concentraciones el estrés oxidativo se reduciría. También se cumpliría lo que planteó Szuster-Ciesielska (2000) al demostrar que niveles excesivamente altos de ROS inducen a apoptosis, lo que produce que en esas concentraciones altas exista una muerte celular tal y como se observa que sucedió en la Figura 3.

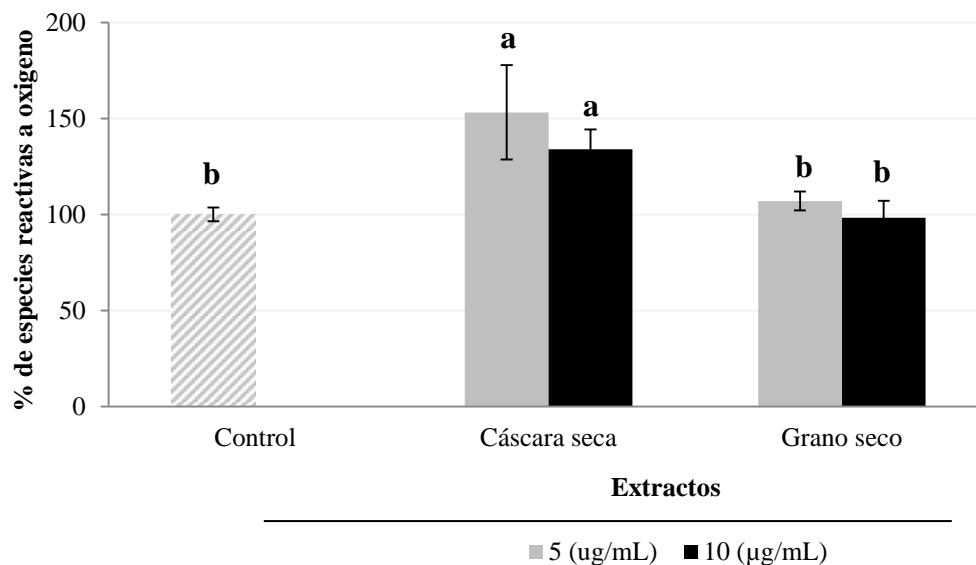


Figura 5: Generación de especies reactivas a oxígeno (ROS) en células cancerígenas de colon tratadas con cinco extractos de cacao; Cáscara Seca, Mucílago Seco, Pergamino Seco, Grano Fermentado, y Grano Seco.

†Diferentes letras indican diferencia estadística entre letras ($P < 0.05$).

†Control: indica el porcentaje de ROS sin ningún extracto.

Para el ensayo de ROS de CCD-18, células del miofibroblasto del intestino (Figura 6) las concentraciones escogidas fueron dos concentraciones entre los 5 y 25 µg/mL. Concentraciones que en la etapa de proliferación celular pudieron reducir en al menos un extracto del 10-30%. Aparte de cumplir ese parámetro, ya que los extractos no fueron eficientes reduciendo ROS para HT-29, se duplicaron las concentraciones para evaluar si reducían las especies reactivas de oxígeno sin dañar las células benignas. Se hizo de esa manera ya que los resultados de Angel-Morales (2012) y Del Follo (2012) demostraron que a mayores concentración menor porcentaje de especies reactivas al oxígeno. Así las concentraciones escogidas fueron 10 y 20 µg/mL. Estas células fueron inducidas a estrés oxidativo mediante el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), donde las células se indujeron a inflamación sin la aplicación de extractos. Después de una hora se aplicó los respectivos extractos para evaluar el incremento en porcentaje de ROS en comparación al control negativo sin TNF- α y sin extracto (Figura 6).

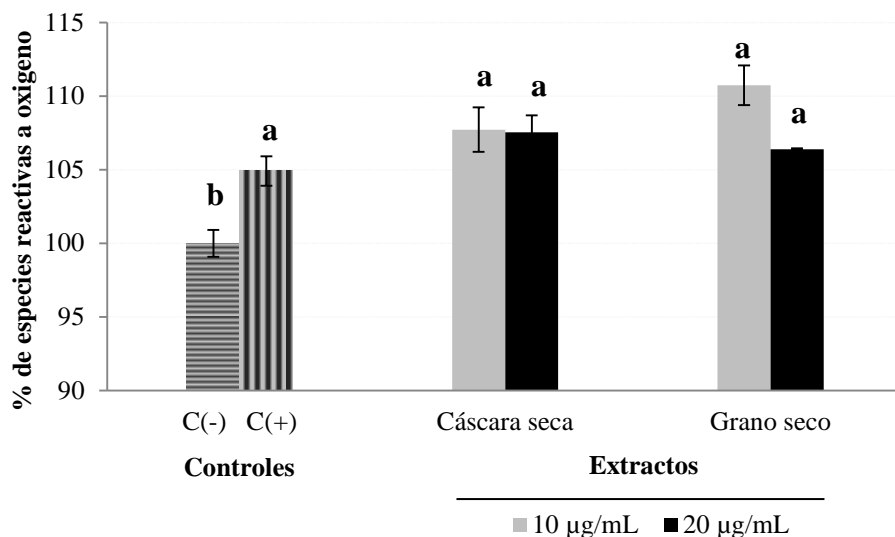


Figura 6. Generación de especies reactivas a oxígeno (ROS) en células del miofibroblasto CCD-18Co, tratadas con extracto de cáscara seca y grano seco.

C (-) Control negativo: crecimiento de células no inflamadas con TNF- α y ausencia de extractos.

C (+) Control positivo: crecimiento de células inflamadas con TNF- α (10 $\mu\text{g/mL}$) y ausencia de extractos.

†: Diferentes letras indican diferencias entre tratamientos ($P < 0.05$).

Se encontraron diferencias en los extractos en comparación con el control negativo. Idealmente el porcentaje de ROS tendría que reducir con los extractos. Sin embargo, las células tratadas con los extractos no presentaron diferencia en comparación al control positivo, lo que indica que los extractos no reducen la producción de especies reactivas al oxígeno. En segundo lugar, los extractos no afectan el comportamiento para generar más ROS. Sin embargo si se sigue la tendencia de mayor concentración de extracto a partir de 25 $\mu\text{g/mL}$ el nivel de ROS reduciría como en los estudios de Morales (2012) y Dell Follo (2012)

Expresión celular de la reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR) inducidas a inflamación. Datos obtenidos en extracción de ARN fueron variables, debido a la cantidad de ARN analizada. Estos resultados pudieron deberse a mala extracción, desinfección deficiente, calidad de agua, pipetas y pipeteo que influenciaron en la cantidad de ARN utilizada. Sin embargo, lo importante fue la calidad de ARN obtenido durante la extracción, el cual se determinó por la relación de absorbancia 260/280, la cual se debe encontrar arriba de 2.0, indicando pureza o carencia de polisacáridos (Garrido *et al.*, *s.f.* y FBMC). Sin embargo, generalmente la calidad del ARN está determinada por su aplicación (Armijos *et al.*, 2013).

MicroARN (miARN) son pequeñas cadenas de ARN no codificado que controla la expresión de los genes del ARN mensajero (mARN) desencadenando la represión de la traducción y la degradación del ARN, esta expresión puede desencadenar inflamación y posterior a esto diferentes enfermedades incluyendo cáncer (Iorio *et al.*, 2005). El ARN mensajero (mARN) de alta calidad fue usado para la síntesis de cADN, el cual es un ADN de cadena doble, el mismo que posteriormente fue utilizado para realizar RT-15 PCR con el uso de los primers o cebadores IL-6 y IL-1 β , que son los encargados de iniciar la reacción de PCR en cadena (Armijos *et al.*, 2013).

La inflamación es una respuesta natural del cuerpo frente a una infección causada por un factor interno o externo (Arbizu 2013), en este caso el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-KB) (Armijos *et al.*, 2013) es el regulador clave de la inflamación que conduce a la expresión de citoquinas y enzimas como TNF- α , IL-6 y IL-1B, entre otros, los cuales están involucrados en el desarrollo de carcinogénesis (Arbizu 2013). Especies reactivas a oxígeno contribuyen a la inflamación, cuando la activación de NF-KB ocurre, causando inflamación en la mucosa intestinal y provocando inflamación del intestino (Kaplan *et al.*, 2007). Las células cancerígenas de colon (HT-29) ya poseen estas inflamaciones. Basándonos en esto, se analizaron los efectos de los extractos de la cáscara seca y el grano seco para esta tercera etapa con las concentraciones de 10 y 20 $\mu\text{g/mL}$. Las dos cualidades analizadas fueron inflamación y apoptosis. Para inflamación se analizaron los primers: IL-6, y IL-1B.

Entre los miembros de la familia de TNF- α , se encuentran las citoquinas inflamatorias tales como interleucinas (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18) y quimioquinas (MMP-9, VEGF, COX-2) todas ellas reguladas por la traducción de TNF- α (Balkwill y Mantovani, 2001), las cuales se encuentran ligadas a la tumorigenesis (Aggarwal *et al.*, 2006). Además de considerarse a IL-6 and IL-1 β importantes mediadores de la inflamación (Tamm, s.f.) La IL-6 es una citoquina relacionada a la inflamación, lo que indica que cuando el ADN y ARN son atacados por diferentes virus y bacterias, el IL-6 es inducido, aumentando los niveles de esta citoquina rápidamente cuando el cuerpo tiene una infección (Tamm, s.f.).

Para que la inflamación en un cuerpo humano se desarrolle se necesita que el NF-KB pase a su forma activa (pNF-KB) y libere los marcadores iniciadores de inflamación: TNF- α , IL-6, y IL-1B. En la Figura 7 se observa una reducción del marcador de IL-1B con ambos extractos. Se nota que para el extracto de grano seco la reducción es la misma independiente de la concentración. Sin embargo, para el extracto de cáscara seca se muestra una reducción más eficiente con 20 $\mu\text{g/mL}$.

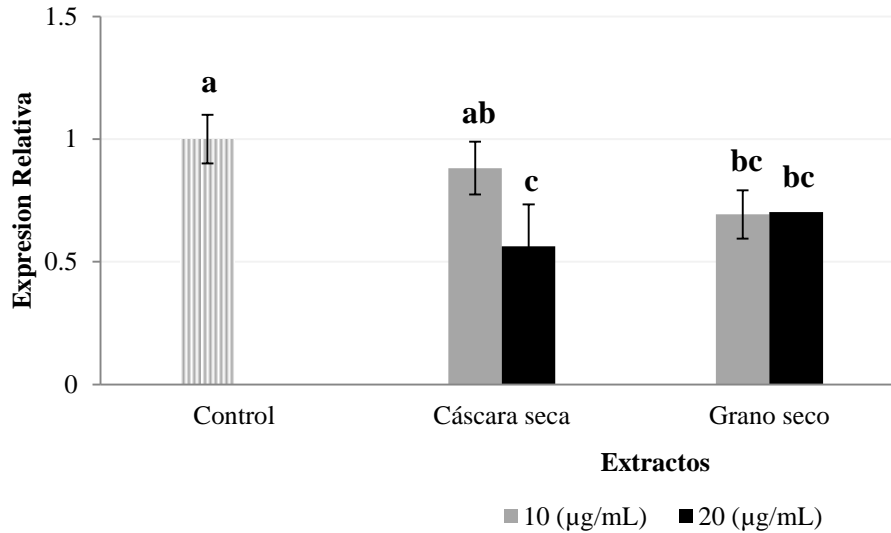


Figura 7. Efecto de diferentes tratamientos en células cancerígenas de colon (HT-29) en la expresión del primer IL-1B. †Diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($P < 0.05$).

Para el segundo primer de inflamación; IL-6 (Figura 8) el extracto de grano seco no mostró reducción. Sin embargo, el extracto de cáscara seca redujo la inflamación con ambas concentraciones siendo la concentración 20 µg/mL más efectiva que la concentración de 10 µg/mL.

La reducción de la expresión relativa de los marcadores moléculas de IL-1B e IL-6 demuestran una reducción en la inflamación de las células cancerígenas de colon. Lo cual es de suma importancia ya que si se es capaz de controlar estos marcadores que inician la inflamación, la misma puede ser congelada en células humanas.

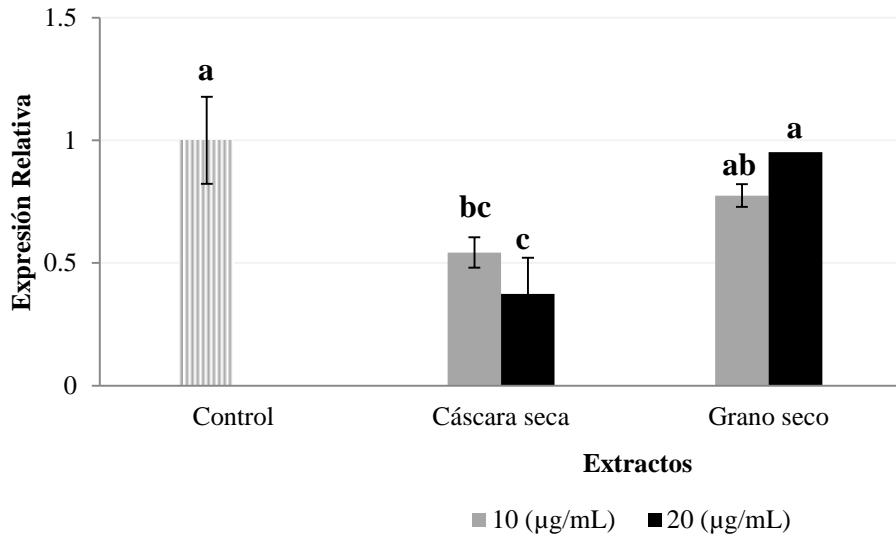


Figura 8. Efecto de diferentes tratamientos en células cancerígenas de colon (HT-29) en la expresión del primer IL-6.

†Diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($P < 0.05$).

Apoptosis es el proceso por el que las células malignas identifican que son dañinas al cuerpo humano y se mueren para no seguirlo haciendo. Las células cancerígenas tienden a perder esta cualidad por lo que se evaluó toda la secuencia metabólica de apoptosis en expresión genética en las células cancerígenas de colon una vez tratadas con los extractos de la cáscara seca y grano seco. La secuencia metabólica del apoptosis consta de tres partes: la iniciación con la activación del Citocromo C (Figura 9), la continuación con la liberación de Caspase 3 (Figura 10) y la finalización (o muerte celular total en la Figura 11) con Caspase 9.

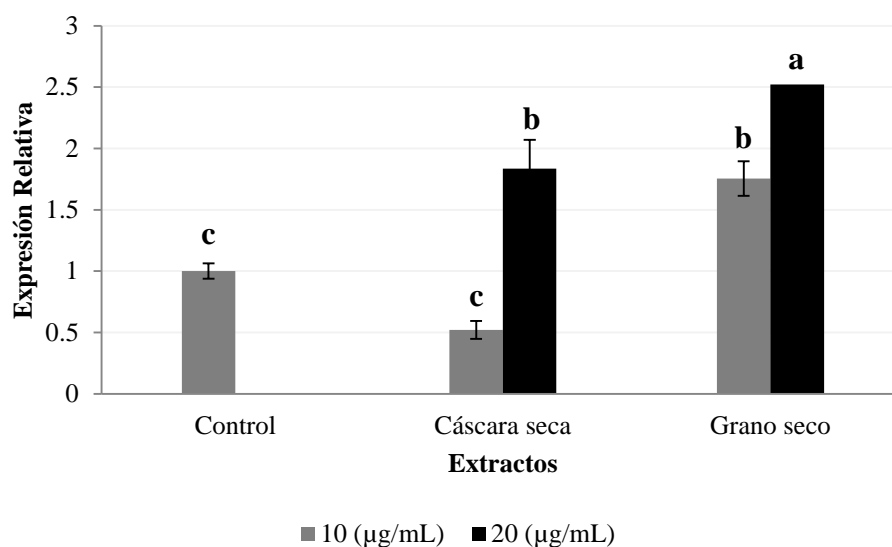


Figura 9. Efecto de diferentes tratamientos en células cancerígenas de colon (HT-29) en la expresión del primer Citocromo C.

†Diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($P < 0.05$).

En la figura 7 se aprecia la promoción de apoptosis con el extracto de cáscara seca con 20 µg/mL y en el extracto de grano seco con ambas concentraciones, siendo la concentración de 20 µg/mL más efectiva. Estos resultados concuerdan con los resultados de Arlioro que discutió la activación del citocromo C a las células cancerígenas tratadas con extracto de polifenoles del grano del cacao. Esto debido a las acciones protectoras que presentan los polifenoles del cacao a las células.

En la figura 8 se aprecia la expresión relativa de Caspase 9, el marcador de apoptosis que mide la propagación de apoptosis una vez haya iniciado. Los resultados indican que el camino de apoptosis se continúa con ambos extractos tratados a las células. El extracto de cáscara seca lo continúa con 20 µg/mL y el extracto de grano seco lo continúa con ambas concentraciones siendo una vez más efectiva la concentración de 20 µg/mL.

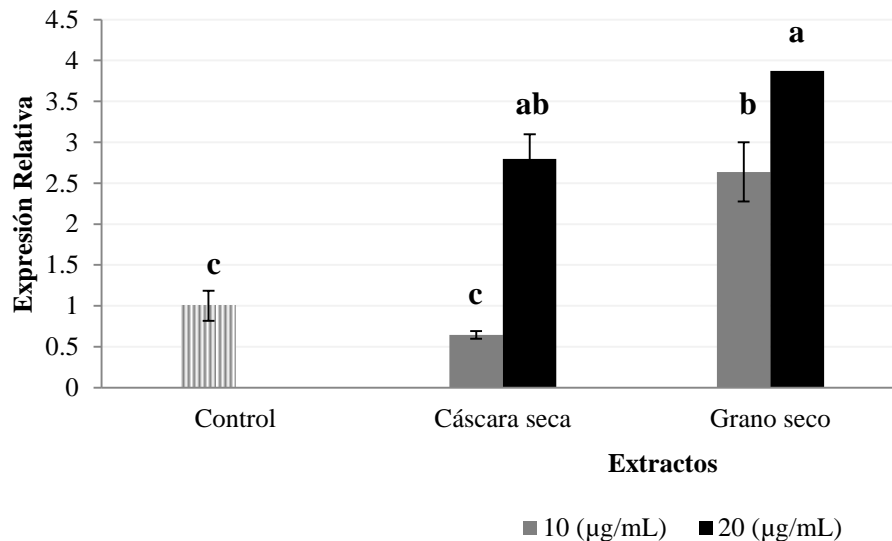


Figura 10. Efecto de diferentes tratamientos en células cancerígenas de colon (HT-29) en la expresión del primer Caspase 9.

†Diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($P < 0.05$).

Caspase 3 también se midió. Este es el marcador que indica que la célula llegó al final de su vida. Por lo tanto es el indicador de la finalización de la secuencia metabólica de apoptosis. A diferencia de los marcadores Citocromo C y Caspase 9. Ambos extractos fueron igual de efectos induciendo apoptosis. La cáscara seca con 20 µg/mL y el grano seco con 10 µg/mL. Lo que indica que no importa que extracto se administre a la célula, ambos finalizan el proceso de apoptosis con la misma expresión. Estos resultados concuerdan una vez más con los resultados de Arlioro que argumento de los polifenoles del grano de cacao inducen apoptosis exitosamente desde la activación del Citocromo C, a la continuación del Caspase 9 y la finalización de Caspase 3.

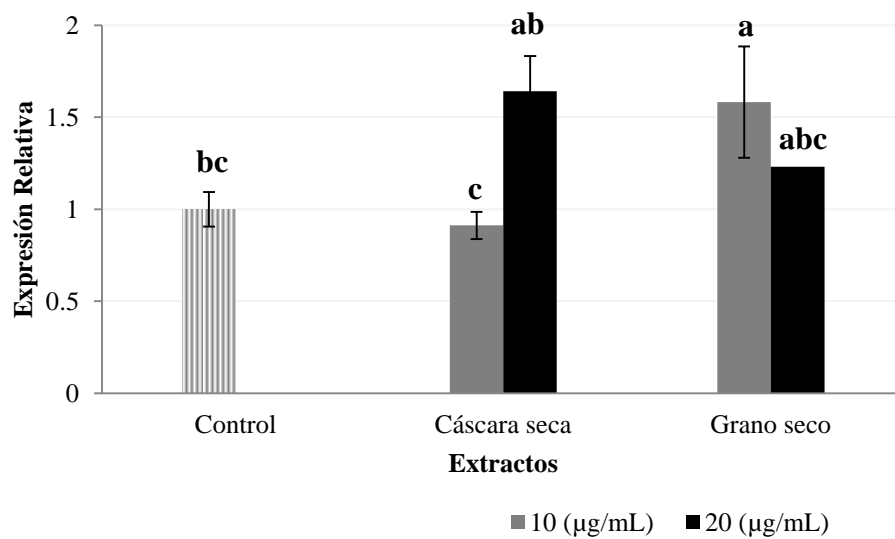


Figura 11. Efecto de diferentes tratamientos en células cancerígenas de colon (HT-29) en la expresión del primer Caspase 3.

†Diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($P < 0.05$).

4. CONCLUSIONES

- El extracto de grano seco y cáscara seca presentaron los niveles más altos de polifenoles, siendo el extracto de cáscara el único extracto con ausencia de alcaloides.
- El extracto de cáscara seca fue el más eficiente inhibiendo el crecimiento de las células cancerígenas de colon.
- Ninguno de los extractos evaluados fueron eficientes reduciendo la cantidad de especies reactivas al oxígeno.
- Los extractos de grano seco y cáscara seca redujeron la expresión de los marcadores de inflamación (IL-6 y IL-1B) y promovieron el desarrollo de marcadores de apoptosis (Citocromo C, Caspase 9 y Caspase 3).

5. RECOMENDACIONES

- Remover los alcaloides de todos los extractos para comparar su efectividad reduciendo el crecimiento de células cancerígenas de colon.
- Continuar el estudio *in vivo* para evaluar la reacción de un organismo complejo viviente ante los tratamientos proporcionados en este ensayo.
- Evaluar especies reactivas al oxígeno a mayores concentraciones para determinar si dichas concentraciones inhiben estas especies sin dañar las células humanas saludables.

6. LITERATURA CITADA

Aggarwal, Shishodia, Sandur, Pandey y Sethi. 2006. Inflammation and cancer. *Biochemical Pharmacology* 2006, 72, 1605-1621.

American Cancer Society. 2014. Cancer Basics. What Is Cancer? Available: <http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/what-is-cancer>.

American Cancer Society. 2015. Cancer Statistics 2015. Available: <http://www.cancer.org/research/cancerfactsstatistics/cancerfactsfigures2015/index>.

Arbizu, 2013. Antiinflammatory and cytotoxic activities of mango (*Mangifera indica* L. var. keit) polyphenols in cancer and non-cancer breast fibroblast in vitro.

Arlorio, 2009. Protective Activity of *Theobroma cacao* L. Phenolic Extract on AML12 and MLP29 Liver Cells by Preventing Apoptosis and Inducing Autophagy.

Armijos, Cardona, Bueso y Mertens-Talcott, 2013. Actividades antiinflamatorias del nopal y la tuna en el crecimiento de células endoteliales (HUVEC). Tegucigalpa, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano.

Balkwill, y Mantovani. 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow? *The Lancet* 2001, 357, 539-545.

Banerjee, 2013. Pomegranate polyphenolics suppressed azoxymethane-induced colorectal aberrant crypt foci and inflammation: possible role of miR-126/VCAM-1 and miR-126/PI3K/ AKT/mTOR. Interdisciplinary Program of Toxicology, Department of Nutrition & Food Science and Department of Veterinary Physiology & Pharmacology.

Brito, 2000. Structural and chemical changes in cocoa (*Theobroma cacao* L) during fermentation, drying and roasting. *Journal of the science of food and agricultural*. 281-288 pg.

Coleman, 2004. Chocolate: Theobromine and Caffeine. *Journal of Chemical Education*. Available: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ed081p1232>.

Del Follo-Martinez, 2013. Resveratrol and Quercetin in Combination Have Anticancer Activity in Colon Cancer Cells and Repress Oncogenic microRNA-27a. Nutrition and Cancer. Texas A&M University, College Station, TX, USA.

Elwers, 2009. Differences between the content of phenolic compounds in Criollo, Forastero and Trinitario cocoa seed (*Theobroma cacao* L.).

FHIA 2014. Fundacion Hondureña de Investigacion Agricola.

Garrido, Ramos, Payán, Maldonado y I.C.E. Estrada, s.f. Aislamiento de ARN de alta calidad a partir de células en cultivo en suspensión de café (*Coffea arábica* L.).

Iorio, Ferracin, Liu, Veronese, Spizzo, Sabbioni, Magri, Pedriali, Fabbri, Campiglio, Ménard, Palazzo, Rosenberg, Musiani, Volinia, Nenci, Calin, Querzoli, Negrini y Croce, 2005. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. American Association for Cancer Reserch. 65: (16).

Jordán, 2003. Apoptosis: muerte celular programada. Pg 100.

Kaplan, Mutlu, Benson, Fields, Banan y Keshavarzian, 2007. Use of herbal preparations in the treatments of antioxidant- mediated inflammatory disorders. Complementary Therapies in Medicine 15 (3): 207-216.

Karim, 2014. Phenolic composition, antioxidant, anti-wrinkles and tyrosinase inhibitory activities of cocoa pod extract.

Lateef, 2008. Improving the quality of agro-wastes by solid-state fermentation: enhanced antioxidant activities and nutritional qualities. Available: <http://link.springer.com/article/10.1007/s11274-008-9749-8#page-2>

Leon, 2014. Actividades antiinflamatorias del camote morado (*Ipomea batatas*) y zanahoria negra (*Daucus carota* ssp. *sativus*) en las células intestinales del miofibroblasto (CCD-18Co). Zamorano.

Lim, 2012. Edible medicinal and non medicinal plants; Volume 3, Fruits.

Mantovani, 2008. Cancer-related inflammation. nature International weekly journal of science. 454.

Martin, 2013. Potential for preventive effects of cocoa and cocoa polyphenols in cancer. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S02786915130012>

Noratto, Kim, Talcott y Mertens-Talcott, 2011. Flavonol-rich fractions of yaupon holly leaves (*Ilex vomitoria*, Aquifoliaceae) induce microRNA-146a and have anti-

inflammatory and chemopreventive effects in intestinal myofibroblast CCD-18Co Cells. Elsevier, fitoterapia. College Station, Texas, USA. 557-569p.

Noratto, Talcott y Mertens-Talcott, 2011. Polyphenolics from Acai' (Euterpe oleracea Mart.) and Red Muscadine Grape (Vitis rotundifolia) Protect Human Umbilical Vascular Endothelial Cells (HUVEC) from Glucose- and Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Inflammation and Target MicroRNA-126. Texas A&M University, College Station, TX, USA.

Othman, 2005. Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. Food Chemistry. Elsevier.

Reyes, 2014. Efecto de procesamiento sobre la estabilidad de polifenoles en extracto de mango Liliana Sofía Reyes Aguilar. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano Honduras.

Shacter, y Weitzman, 2002. Chronic Inflammation and Cancer. Colorectal Cancer, Oncology Journal.

Szuster-Ciesielska, 2000. The inhibitory effect of zinc on cadmium-induced cell apoptosis and reactive oxygen species (ROS) production in cell cultures. Toxicology. 159-171 pg. Elsevier.

Tamm, s.f. IL-6: Current research and new questions. virology laboratory. The Rockefeller University. New York, New York 10021.

Vinson, 1999. Journal of agricultural and food chemistry. Phenol Antioxidant Quantity and Quality in Foods: Cocoa, Dark Chocolate, and Milk Chocolate. Volume 47. Number 12.