



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODÓNTOLÓGICAS Y DE LA SALUD
FACULTAD DE MEDICINA

**"Efecto del consumo de un concentrado de cocoa sobre la expresión
y metilación del gen SOD2"**

T E S I S

Para optar por el grado de:

Maestro en Ciencias de la Salud

P R E S E N T A

L.N. Paloma Karina Barrera Reyes

TUTOR PRINCIPAL

Dra. María Elizabeth Tejero Barrera

Instituto Nacional de Medicina Genómica



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I. RESUMEN

Antecedentes: La capacidad que tienen componentes de la alimentación de influenciar la expresión de genes es un tema de actual investigación, que se sustenta en la heterogeneidad de los resultados obtenidos tanto en estudios poblacionales, como en estudios experimentales. Las investigaciones circundantes al consumo de polifenoles no son la excepción. Queda claro sin embargo, que los grupos poblacionales que se distinguen por tener un elevado consumo de alimentos ricos en polifenoles, presentan beneficios a la salud en términos de menor incidencia de enfermedades cardiovasculares y probablemente cáncer. Los mecanismos moleculares que explican estos acontecimientos aún no están claramente definidos, lo que dificulta el entendimiento de su función en el organismo y el alcance de sus beneficios. Se sugiere sin embargo, que es a través de modificar la expresión de genes objetivo. El gen antioxidante *SOD2*, protege al organismo en contra de los efectos dañinos de ROS, generadas a partir de la respiración oxidativa. El incremento en la concentración de ROS por niveles arriba de lo normal, coloca al individuo en un estado de estrés oxidativo, que es un factor de riesgo para la aparición y desarrollo de enfermedades con alteraciones metabólicas. **Objetivo:** Evaluar el efecto del consumo de un concentrado de cocoa en términos de modulación de la expresión del gen mitocondrial *SOD2* en CMSP. **Metodología:** Ensayo clínico cruzado, controlado, aleatorizado y cegado en 24 individuos aparentemente sanos. La intervención consiste en el consumo de un concentrado de cocoa rico en polifenoles y un placebo. Cada individuo fue citado en dos ocasiones con una semana de blanqueamiento entre citas. **Resultados:** El 50% de los voluntarios recibió los tratamientos en secuencia Yellow-Orange y el 50% Orange-Yellow. La diferencia en la expresión del gen *SOD2* fue estadísticamente diferente entre tratamientos. **Discusión:** Utilizando cocoa como vehículo de administración, los resultados sugieren que el consumo agudo de flavanoles es capaz de modular la expresión de genes asociados a vías de control antioxidante y defensa inmunológica como *SOD2*. Es necesario identificar si este cambio en la expresión obedece a una respuesta temporal, y si la suplementación crónica tendría un efecto permanente, mediado probablemente, por modificaciones en el perfil de metilación.

ÍNDICE

I. Resumen	
II. Marco Teórico	2
II.1 Cocoa	2
II.2 Superoxido Dismutasa Dependiente de Manganeso 2 (<i>SOD2</i>)	16
III. Planteamiento del Problema	23
IV. Hipótesis	25
V. Objetivos	25
VI. Metodología	26
VII.1 Estrategia general	26
VII.2 Diseño del estudio	26
VII.3 Selección de la población.....	27
VII.4 Cálculo de muestra	29
VII.5 Definición de la intervención	30
VII.6 Desarrollo del material para la intervención	31
VII.7 Estrategia de acción	32
VII.8 Variables de estudio	34
VII. Análisis estadístico	35
VIII. Resultados	37
IX. Discusión	49
X. Bibliografía	59
XI. Anexos	70
ANEXO A. Consentimiento Informado	71
ANEXO B. Historia clínica	77
ANEXO C. Recordatorio de 24 horas	81
ANEXO D. IPAQ	82
ANEXO E. SNUT	91
ANEXO F. CocoaPure45%	100
ANEXO G. Métodos de laboratorio	102
ANEXO H. Operacionalización y conceptualización	105
ANEXO I. Tríptico y póster	111

II. MARCO TEÓRICO

El interés por comprender de qué manera el ambiente, la dieta y el estilo de vida afectan la salud humana, ha aumentado en las últimas décadas. Un considerable número de componentes de la alimentación se ha ligado a la prevención o inducción de diferentes enfermedades. Por ejemplo: el consumo excesivo de sal se ha asociado a hipertensión, eventos cardiovasculares, y cáncer gástrico (Shaldon and Vienken, 2009); la ingestión de vitamina E y selenio contribuyen a la prevención de cáncer de próstata; y el consumo de alimentos ricos en polifenoles, como la cocoa, disminuyen el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares (Floriano-Sánchez E, 2010; Guarrera, 2007).

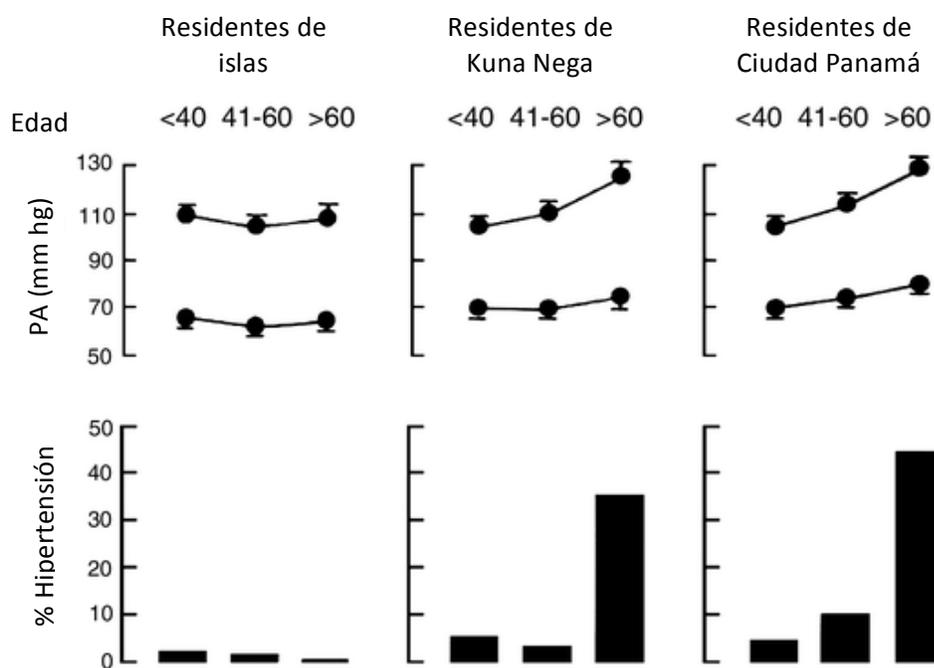
II.1 COCOA

Evidencia epidemiológica

A pesar de que la mayor parte de los estudios sobre los polifenoles de la cocoa son ensayos clínicos, existen estudios observacionales que dan soporte a la evidencia experimental. Los Indígenas Kuna de las islas de San Blas de Panamá, por ejemplo, consumen un promedio de tres tazas de bebida de cocoa al día, logrando una ingestión de aproximadamente 1880 mg de polifenoles (Chevaux *et al.*, 2001). Este grupo, tiene una de las menores prevalencias de hipertensión (2.2%), y mortalidad por enfermedad cardiovascular en el mundo (9.2 ± 3.1 vs 83.4 ± 0.7 por cada 100,000 muertes ajustadas por edad) (Bayard, 2007). Además, sus niveles de presión sanguínea no aumentan con la edad. Los Kuna también tienen más bajas tasas de diabetes mellitus, infarto al miocardio y cáncer que el resto de los Panameños. La prevalencia de hipertensión de los Kuna que migran a zonas urbanas es más alta (10.7%), alcanza hasta el 45% en personas mayores de 60 años (Fig. 1) (Hollenberg *et al.*, 1997). Se ha propuesto, que el elevado consumo de cocoa puede ser parcialmente responsable de la baja incidencia de enfermedad cardiovascular entre los indígenas que habitan en los archipiélagos. Al comparar su ingestión con los residentes de la Ciudad de Panamá, se

encontró que los primeros consumen dos veces más fruta, cuatro veces más pescado, y hasta 10 veces más cocoa (Hollenberg *et al.*, 1997; McCullough *et al.*, 2006).

Fig. 1: Presión sanguínea y prevalencia de hipertensión entre Indígenas Kuna residentes de islas y zonas urbanas.



PA: Presión arterial

La primera cohorte concerniente a los beneficios del consumo de cocoa y salud cardiovascular se publicó en 2006 (n=470). Los datos se obtuvieron del Zutphen Elderly Study. Se encontró una asociación inversa entre el consumo de cocoa y presión diastólica (p=0.03) y diastólica (p=0.06). El consumo de cocoa se asoció con un menor mortalidad cardiovascular por todas las causas (Buijsse *et al.*, 2006).

En 2009, Janszky *et al.*, siguieron pacientes hospitalizados de alto riesgo (con infarto al miocardio) durante 8.6 años. Identificaron que aquellos que comían al menos el doble de chocolate por semana, tenían 66% menos probabilidad de sufrir muerte cardiaca,

comparados con aquellos que reportaron nunca consumir chocolate. Al ajustar los resultados por variables demográficas y socioeconómicas, consumo de café e ingestión de dulces, la asociación entre consumo de chocolate y mortalidad cardiaca fue linealmente inversa ($p=0.01$).

En 2010, se realizaron dos cohortes de 8 ($n=19,357$) y 9 años ($n=31,823$) de seguimiento. La primera demostró una reducción del riesgo de infarto al miocardio e infarto fulminante asociado al consumo de chocolate (Buijsse et al., 2010). La segunda encontró que las mujeres que consumían de 1-3 raciones de chocolate al mes, o de 1-2 a la semana, tenían menores tasas de hospitalización o muerte por falla cardiaca, comparadas con aquellas que no consumían chocolate (RM, 0.74; 0.68, respectivamente) (Mostofsky et al., 2010).

Estudios observacionales similares, también han encontrado beneficios asociados al consumo de chocolate o cocoa y la disminución en el riesgo de padecer diabetes, disminución en los niveles de proteína C-reactiva, y mejor salud psicológica en población Japonesa (Oba et al., 2010), Italiana (di Giuseppe et al., 2008) y Finlandesa (Strandberg et al., 2008), respectivamente.

Por último, el análisis transversal de 2,217 participantes del NHLBI Family Heart Study, identificó una asociación inversa entre el consumo de chocolate y la placa aterosclerótica calcificada en las arterias coronarias. Las personas que consumían chocolate dos o más veces por semana, tenían 32% menos prevalencia de placa aterosclerótica calcificada, que las personas que nunca consumían chocolate. La razón de momios disminuyó conforme aumentó la frecuencia en el consumo de chocolate. El modelo estadístico fue ajustado por edad, sexo, consumo de energía, relación cintura-cadera, educación, tabaquismo, consumo de alcohol, colesterol total:HDL, consumo de dulces y diabetes (Djousse et al., 2011).

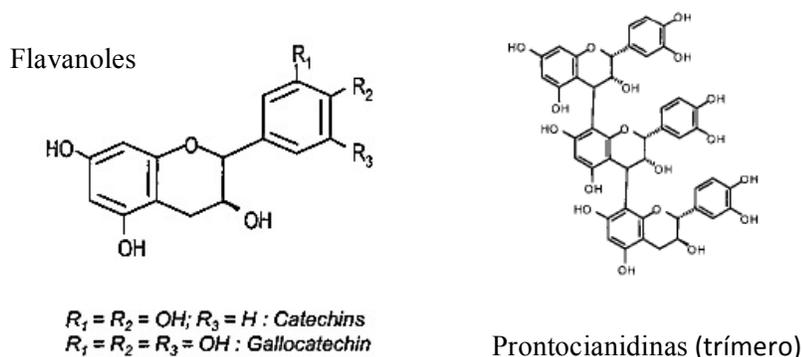
Como se puede observar, la mayor parte de las investigaciones sobre los beneficios de chocolate y cocoa, se ha llevado a cabo en la última década. El enfoque principal ha sido el consumo de cocoa y salud cardiovascular. Investigaciones más recientes proveen datos de posibles beneficios asociados al consumo de cocoa en otras patologías (Katz *et al.*, 2011).

Absorción y metabolismo

Los polifenoles son metabolitos secundarios de las plantas relacionados generalmente con la defensa en contra de radiación ultravioleta y agresión por patógenos. Existen cuatro subclases de polifenoles: ácidos fenólicos, flavonoides, lignanos y estilbenos. Los dos primeros son los de mayor frecuencia en la dieta (Manach *et al.*, 2004). Los polifenoles de la cocoa pertenecen a la subclase de los flavonoides y se llama flavanoles (flavan-3-ols). Consisten en 2 anillos aromáticos (A y B), unidos por 3 átomos de carbono formando un heterociclo oxigenado (anillo C) (Manach *et al.*, 2005).

Las fracciones monoméricas de los flavanoles son la catequina y epicatequina. Los oligómeros de los flavanoles están formados por la unión de dos o más monómeros y se llaman prontocianidinas (Fig.2) (Steinberg *et al.*, 2003; Bravo, 1998). Se ha estimado que la ingestión diaria de catequinas y dímeros y trímeros de prontocianidinas oscila entre 18-50 mg/d, siendo las fuentes más abundantes los derivados de cocoa, el té verde, manzanas, peras, uvas y vino tinto (Manach *et al.*, 2005).

Fig.2: Estructura química de los flavanoles.



Los productos de cocoa contribuyen con el 20% del total de catequinas y prontosocianidinas consumidas en población holandesa (Arts et al., 2000). Mientras que en España el Departamento de Agricultura, Pesca y Alimentación, estimo que los niños y adolescentes ingieren de entre 6-8 kg/niño de polvo de cocoa al año (Ministerio de Agricultura, 2002). Es importante señalar que los datos varían demográficamente, siendo extrapolables únicamente a poblaciones que tienen una dieta similar a la de referencia. En México no se encontraron datos al respecto.

La cocoa proviene del cacao (*Theobroma cacao*), que es un árbol originario de los bosques de México y Centroamérica, actualmente se cultiva en todo el mundo, especialmente a las regiones cercanas al ecuador de Asia y África (Steinberg et al., 2003). A partir de las semillas del cacao trituradas, se obtienen productos de consumo popular como es la cocoa en polvo y el chocolate. El primero está hecho básicamente de sólidos de cocoa, que es la fracción no grasa de las semillas del cacao, en donde se encuentran concentrados los polifenoles. El segundo, es una mezcla de sólidos de cocoa y manteca de cocoa; mientras mayor sea la proporción de sólidos de cocoa, más amargo y oscuro será el chocolate, y mayor será su contenido en polifenoles (Coe SD, 1996; Dillinger et al., 2000).

La concentración de polifenoles de la cocoa varía dependiendo de la variedad botánica, y de su procesamiento industrial. Factores como el manejo post-cultivo, la fermentación, secado y tostado del grano, producen que la cantidad de polifenoles del cacao difiera substancialmente de la cocoa en polvo o el chocolate. La fermentación y secado del grano resulta en una pérdida de polifenoles. Las altas temperaturas y el incremento en el tiempo de tostado, también disminuyen su contenido. Ambas degradaciones están asociadas a mecanismos enzimáticos y no enzimáticos de oxidación que ocurren durante la manufactura (Tomas-Barberan et al., 2007).

El contenido de equivalentes de epicatequina de la cocoa ha sido comparado con el de otros alimentos. Lee *et al.*, encontraron que era 3.5, 12 y 16.6 veces mayor que el del té verde, el té negro, y el vino tinto. La capacidad antioxidante de la cocoa también fue mayor 4.4, 2.5, y 1.8 veces respectivamente. La cocoa por lo tanto, es el alimento que mayor concentración de polifenoles (peso seco) y actividad antioxidante tiene, 2 veces la del vino tinto, 2-3 veces la del te verde, y 4-5 la del te negro (Tabla 1) (Lee *et al.*, 2003).

Tabla 1. Contenido de Flavanoles y Capacidad Antioxidante* de Alimentos y Bebidas

	Flavanoles + Procianidinas (mg)	ORAC mmol (Equivalentes Trolox)
Sólidos de cocoa		
Por 100 g	1400.0	40.0
Chocolate oscuro (Semidulce)		
Por 100 g	140.0	13.1
Por 100 kcal	85	2.7
Chocolate con leche		
Por 100 g	70.0	6.7
Por 100 kcal	14.0	1.3
Manzanas		
Por 100 g	106	0.2
Por 100 kcal	130	0.3
Cockael de jugo de arándano		
Por 100 g	12.6	0.2
Por 100 kcal	20	0.4
Vino tinto		
Por 100 g	22	0.7
Por 100 kcal	25	0.9
Infusión de te negro		
Por 2 bolsas/200 ml de agua [^]	40	1.6

Adaptada de Katz *et al.*

* Capacidad antioxidante se reporta como capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC) y se expresa como mmol de equivalentes de Trolox. Los datos estan en relación a equivalentes de peso y kcal para facilitar la comparación entre alimentos.

[^]Los datos de se te presentan en proporciones similares a lo normalmente consumido

No todos los productos derivados de la cocoa aportan la misma cantidad de polifenoles (Tabla 2). El chocolate blanco y el chocolate con leche carecen de éstos y aportan cantidades significativas de calorías e hidratos de carbono (HC). Por el contrario, el chocolate oscuro o amargo, es una excelente fuente de polifenoles y su contenido en azúcares es considerablemente menor (Steinberg et al., 2003; Bravo, 1998). Los endulzantes, especialmente azúcares (glucosa y sacarosa), son importantes como constituyentes de las bebidas con base cocoa, esto se debe a que mejoran el sabor amargo del producto y aumentan la solubilidad y dispersabilidad de la mezcla, además, son relativamente baratos y disponibles para los consumidores (Lee et al., 2002). La adición de azúcares no altera el contenido ni la absorción de flavanoles, pero sí contribuyen a la ingestión de HC. Un consumo elevado de HC se asocia con el desarrollo de caries dental, obesidad, y enfermedad metabólica asociada a obesidad. El uso de edulcorantes artificiales es una alternativa viable para la preparación de polvos de cocoa, ya que permite conservar las propiedades físicas y sensoriales, así como potencializar los beneficios ya conocidos del producto (Belscak-Cvitanovic et al., 2010).

Tabla 2. Contenido de polifenoles y capacidad antioxidante de productos de cocoa comercialmente disponibles

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

Adaptado de Miller *et al.*

Los valores totales se presentan como media y desviación estándar

* Polifenoles totales se expresa como equivalentes de ácido galico

SCNG: Solidos de cocoa no grasos

Biodisponibilidad y absorción

La evidencia señala que los monómeros catequina y epicatequina son capaces de atravesar la barrera gastrointestinal y llegar al torrente sanguíneo. Los dímeros y trímeros también se

han detectado en plasma aunque en menor cantidad (van Amelsvoort et al., 2001; Meng et al., 2001). El mecanismo de absorción de estas estructuras no está completamente descrito, se ha sugerido que se absorben mediante difusión pasiva. Posterior a su absorción, la (-)-epicatequina sufre múltiples transformaciones a metabolitos conjugados. Estos metabolitos difirieren estructuralmente de la forma aglicón encontrada en los alimentos (Arts et al., 2000; Manach et al., 2005). Se calcula que la proporción de metabolitos conjugados de (-)-epicatequina que llegan al torrente sanguíneo, posterior al consumo de chocolate, son epicatequin-sulfatos ($33 \pm 4\%$), epicatequin-glucoronidos ($28 \pm 5\%$) y epicatequin-O-metil sulfatos ($33 \pm 4\%$) (Actis-Goretta et al., 2012). La conjugación de los flavanoles altera sus propiedades físico-químicas y afecta la actividad biológica. Contrario a la creencia general, la conjugación no siempre tiene un efecto negativo, hay extremos estructurales que no se afectan, y hay extremos cuya conjugación aumenta o invierte la actividad al compararse con la forma aglicón. Los efectos difiere dependiendo del tipo y posición conjugada, la concentración de flavanoles, los extremos estudiados, etcétera (Bekmann., 2012).

Las prontocianidinas son polifenoles más complejos y de mayor tamaño, no se absorben en el intestino delgado, sino que viajan por el tracto intestinal y ejercen efecto antioxidante sobre la microbiota del colon (Fogliano., 2011). Al respecto, Schuier et al., analizaron el efecto de las prontocianidinas de la cocoa sobre la secreción intestinal de cloro (Cl^-), mediado por el regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística (CFTR por sus siglas en inglés), en líneas celulares de epitelio de colón humano T84. CFTR es una proteína transmembranal relacionada con el transporte de iones Cl^- al lumen intestinal. El bloqueo farmacológico de CFTR resulta en una inhibición de la pérdida de agua y sal durante la diarrea. Los resultados de los investigadores sugieren que las prontocianidinas interaccionan con CFTR, inhibiendo medianamente la secreción de Cl^- . Al final del estudio, los investigadores proponen intervenciones dietéticas a través del uso de alimentos o bebidas ricas en flavanoles como coadyuvantes en el tratamiento de la diarrea (Schuier et al., 2005). Tzounis et al., realizaron un ensayo cruzado controlado con 494 mg vs 23 mg de flavanoles de cocoa al día durante cuatro semanas. Posterior al periodo de blanqueamiento, se cruzaron los tratamientos. El consumo de 494 mg de flavanoles aumentó

significativamente la cantidad de *bifidobacterias* y *lactobacillus* intestinales. Estos efectos fueron paralelos a la disminución de *clostridia* en intestino, triglicéridos plasmáticos y proteína C reactiva. Se propone que el consumo de flavanoles de cocoa ejerce efecto prebiótico, que benefician el crecimiento flora microbiana específica en humanos (Tzounis et al., 2011).

Efecto del consumo de polifenoles de la cocoa

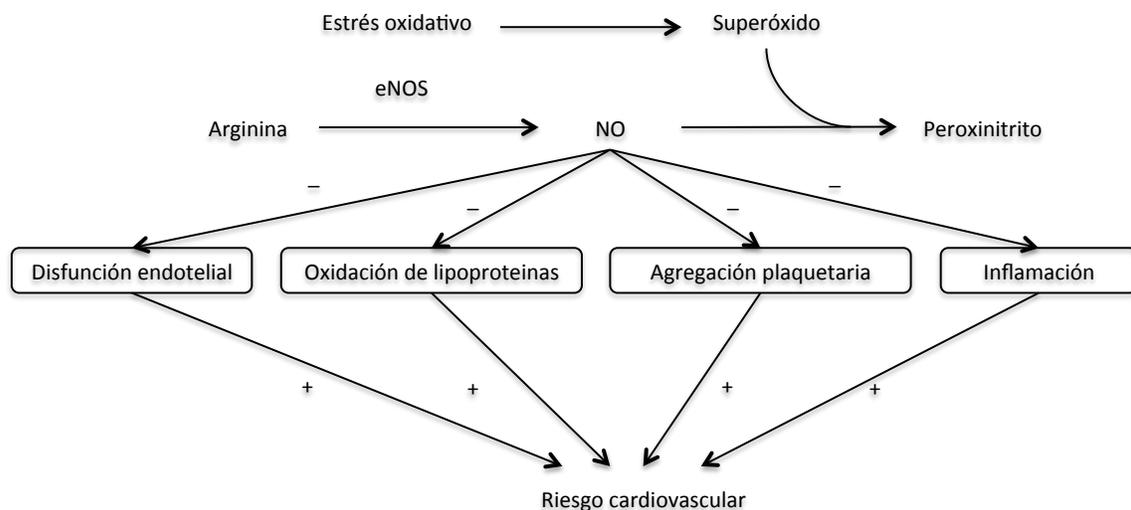
El contexto en el que los flavanoles de la cocoa han mostrado mayores beneficios, es en relación a su actividad antioxidante y salud cardiovascular (Joshipura., 2001). Su efecto también se ha estudiado en metabolismo de HC, inflamación, cáncer, resistencia a la insulina y actividad cognitiva (Maskarinec G 2009). Es importante señalar que la interpretación de estudios *in vitro* debe tomarse con consideración, por dos razones. Primera, la mayor parte de estos estudios, estimulan líneas celulares con flavanoles en su forma aglicón o, con extractos ricos en polifenoles. *In vivo*, ni el plasma, ni los tejido se exponen a estas formas. Como se mencionó anteriormente, los flavanoles sufren conjugaciones en la primer fase de su metabolismo. Son precisamente los metabolitos conjugados los que llegan al torrente sanguíneo y tejidos. Segundo, las concentraciones de flavanoles estudiadas. Para una correcta interpretación de resultados, las dosis deben ser similares a las máximas concentraciones encontradas en plasma después de consumir un alimento rico en estos polifenoles (Kroon., 2004, Beekman., 2012). El cambio máximo en las variables antes mencionadas, se ha observado con dosis de 500 mg/d de flavanoles (Visioli., 2009; Shrimel., 2011; Tokede, 2011).

El efecto antioxidante de los flavanoles está determinado por su estructura tricíclica. Los anillos aromáticos neutraliza los radicales libres, metales quelantes (Fe^{2+} y Cu^{+}) que aumentan la producción de sustancias reactivas de oxígeno (ROS), inhiben enzimas, y estimulan la respuesta antioxidante. Las enzimas inhibidas por los flavanoles de la cocoa incluyen xantino-oxidasa, NADPH-oxidasa, tirosin-cinasa y protein-cinasa. El aumento en

la capacidad antioxidante sérica producida por el consumo de cocoa, protege el endotelio de estrés oxidativo y ROS endógenos (Katz *et al.*, 2011).

Independientemente del efecto antioxidante, los polifenoles también son capaces de promover factores de vasodilatación como el óxido nítrico (NO por sus siglas en inglés), prostaciclina y factor hiperpolarizante derivado del endotelio, además de inhibir los factores pro-angiogénicos endotelina-1 y factor de crecimiento endotelial vascular (Keen *et al.*, 2005; Nogueira., 2012). El NO derivado del endotelio, es crítico para la función vascular, ya que regula la vasodilatación y las condiciones ambientales de la pared de los vasos sanguíneos (Fig.3). El NO del endotelio es producido por la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS por sus siglas en inglés). La disminución en la biodisponibilidad de NO derivado de la eNOS produce disfunción endotelial, que se asocia a los principales factores de riesgo para aterosclerosis (Schewe., 2002; Heptinstall., 2006). Se cree que estimular la vía de eNOS, puede ser una estrategia efectiva en la prevención y tratamiento de aterosclerosis (Flammer *et al.*, 2007; Li and Forstermann., 2009). Además de producir vasodilatación, el NO previene la adhesión y migración de leucocitos, la proliferación celular del músculo liso, y la agregación y adhesión plaquetaria.

Fig.3: Diagrama del probable efecto de los polifenoles sobre el sistema vascular, con NO como vía principal.



Adaptada de Cooper *et al.*

Los factores derivados del endotelio, como el NO, son esenciales para el control vascular, no solo en la circulación periférica, sino también cerebral. La deficiencia de NO se ha asociado al aumento del riesgo cardiovascular en condiciones como diabetes tipo 2, síndrome metabólico, hipertensión, y aterosclerosis (Gewaltig and Kojda, 2002). Los mecanismos específicos a través de los cuales los flavanoles de la cocoa mejoran la función vascular son tema de actual investigación, sin embargo, la evidencia que hay sobre el metabolismo de NO parecen ser más concreta que su efecto antioxidante; la enzima NADPH-oxidasa parece ser el principal sitio de acción.

NADPH-oxidasa está involucrada en la disfunción endotelial, sus isoformas generan O_2^- que recluta NO. Los polifenoles de la cocoa podrían ayudar a mantener la actividad de NADPH-oxidasa a niveles lo suficientemente bajos como para no afectar el endotelio vascular. Se ha demostrado, que la epicatequina aumenta la biodisponibilidad de NO al inhibir la NADPH-oxidasa. La exposición a (-)-epicatequina aumenta los niveles celulares de NO y GMPc y protege en contra del estrés oxidativo generado por la oxidación de LDL. Schewe *et al.*, postularon que el efecto sobre la función endotelial puede ser resultado de cambios en la expresión de genes y síntesis o degradación de proteínas (Schewe et al., 2008).

Otros beneficios asociados al consumo de cocoa están relacionados con cambios en el perfil del lípidos. Resultados de ensayos clínicos muestran una disminución significativa del colesterol LDL ($p=0.038$), y un aumento del colesterol HDL ($p=0.037$). La magnitud del cambio en las variables antes mencionadas, está influida por la edad de los participantes (las personas > 50 años no tuvieron el mismo efecto que los más jóvenes), la duración de la suplementación (intervenciones por más de 4 semanas modifican los niveles de HDL), y la cantidad de grasa consumida en la dieta. No se han encontrado resultados contundentes en cuanto a cambios en colesterol total (CT), triglicéridos (TG), índice de masa corporal (IMC) y glucosa posterior a la suplementación. La resistencia a la insulina (HOMA-IR)

disminuye significativamente ($p < 0.001$), mientras que la dilatación vascular mediada por flujo (FMD por sus siglas en inglés) aumenta ($p < 0.001$).

La evidencia que hay con relación a flavanoles y cáncer es tema de actual controversia. El cáncer es resultado de un desequilibrio en la homeostasis del organismo. Etapas tumorales tempranas, se caracterizan por un aumento en la proliferación celular, que induce la activación y/o sobre-expresión de enzimas asociadas a la síntesis de nucleótidos y ADN. Durante esta etapa, se produce una sobreproducción de ROS, principalmente por la sobre-expresión de enzimas pro-oxidantes. Esto conlleva a un estado de estrés oxidativo, daño celular y mutaciones de la cadena de ADN (D'Archivio et al., 2008).

Los polifenoles pueden afectar el proceso de carcinogénesis por diferentes mecanismos. En especial, compensando la aparición de estrés oxidativo, y así, contribuyendo a prevenir la aparición y desarrollo del cáncer. De acuerdo a estudios *in vitro*, los flavanoles son capaces de a. Suprimir la expresión de enzimas pro-oxidantes implicadas en el desarrollo del cáncer; b. Inhibir la activación de factores de transcripción, regulando así, genes objetivo asociados a supervivencia celular y proliferación; c. Inducir apoptosis; d. Inhibir metaloproteinasas de matriz y factor de crecimiento endotelial vascular, alterando el proceso de angiogénesis relacionado a metástasis (Noe et al., 2004; Lambert et al., 2005; Guarrera et al., 2007; D'Archivio et al., 2008).

Estudios en líneas celulares de cáncer, estimuladas con flavanoles, han logrado cambios significativos en la expresión de genes asociados a vías de control antioxidante, proliferación celular y reparación de ADN tejido-específico (Noe et al., 2004; Mao et al., 2000; Fang et al., 2007; Fang et al., 2003; Flammer et al., 2007). Uno de los mecanismos epigenéticos a través del cual se puede modificar la expresión génica, es la metilación del ADN. Los polifenoles catequina (cocoa y té verde) (Johanning et al., 2002; van et al., 2003; Lee et al., 2002), y la genisteína (soya) (Day et al., 2002), mostraron ser capaces de

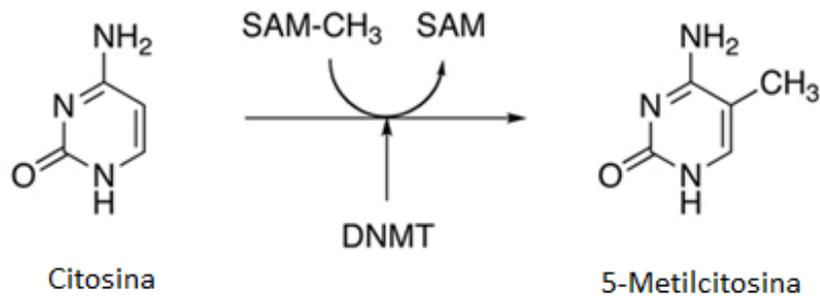
modificar la expresión por metilación en células humanas de cáncer de piel, pulmón, esófago, colon, próstata y mama (Link et al., 2010; Yang et al., 2008; D'Archivio et al., 2008).

Los polifenoles neutralizan el exceso en la producción de ROS. Como consecuencia, disminuyen la expresión de genes de respuesta a estrés oxidativo e inhiben la proliferación de células cancerosas (Mao., 2002; Mao., 2002; Cocchi., 2008). Se cree que los polifenoles también pueden inducir la formación de ROS para alcanzar niveles de estrés oxidativo intolerables para la célula. Cuando las células cancerosas sobrepasan el umbral tolerable de estrés oxidativo, componentes celulares específicos, como el ADN, son dañados irreparablemente. Se activan entonces los genes involucrados en la detención del ciclo celular y/o apoptosis. Por lo tanto, los polifenoles pueden neutralizar ROS constitutivos o, paradójicamente, generar cantidades adicionales de ROS para inhibir la proliferación de células cancerosas. Ambos mecanismos de acción parecen estar estrechamente asociados a las concentraciones y condiciones experimentales de los polifenoles (Loo et al., 2003; Martin., 2006). En líneas celulares de adenocarcinoma de colon, se encontró que el estímulo con epicatequina de cocoa, modifica significativamente la expresión de más de 40 genes asociados a vías de control antioxidante, reparación de ADN y respuesta inmune. El análisis de expresión se llevo a cabo utilizando tecnología de microarreglos (Noé et al., 2004).

Evidencia de estudios en humanos han mostrado que la expresión de la enzima antioxidante mitocondrial superóxido dismutasa (MnSOD) es modulada por la dieta. MnSOD es codificada por el gen Super Óxido Dismutasa 2 (*SOD2*), este gen está implicado en la defensa mitocondrial contra ROS y respuesta inmune. Thaler et al., identificaron una mayor expresión de *SOD2* en vegetarianos vs omnívoros. Los autores postulan que componentes de la alimentación como son los folatos y los polifenoles, modulan la expresión de *SOD2* por metilación. Al respecto, los flavanoles han mostrado ser capaces de influenciar la metilación de ADN al alterar la estructura de las histonas y cromatina (Thaler R, 2010).

La metilación de ADN consiste en la transferencia de una molécula metil de la S-adenosilmetionina (SAM) en la posición 5' de las citosinas en ciertos dinucleótidos CpG (citosina y guanina enlazados por fosfatos). Esta reacción es catalizada por las ADN metiltransferasas (DNMTs) (Fig.4). La metilación del ADN es el mecanismo epigenético que primero se identificó y por lo tanto, el mejor caracterizado. Investigaciones *in vivo* e *in vitro* indican que en general, mientras exista mayor grado de metilación en la región de regulación genética, mayor probabilidad de encontrar una actividad génica a la baja y viceversa, aunque existen algunas notables excepciones a esta teoría (Pray L.A., 2008; Tollefsbol T.O., 2011).

Fig.4: Conversión de citosina a 5-metilcitosina por la DNMT.



La DNMT cataliza la transferencia de un grupo metil (CH₃) de la S-adenosilmetionina (SAM) al carbono de la posición-5 de la citosina.

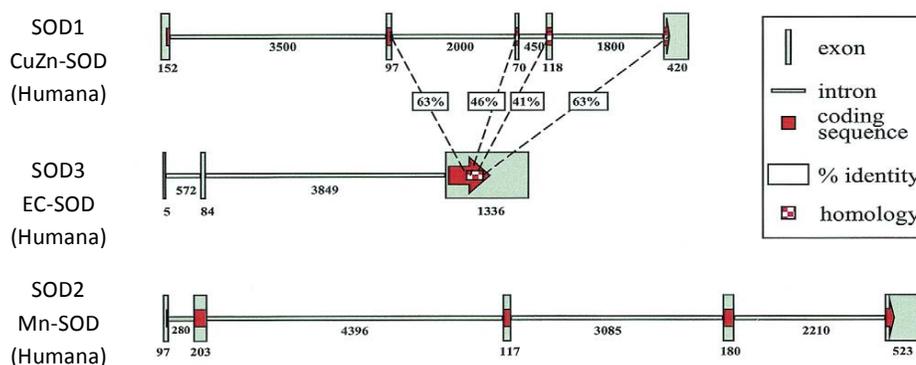
Los perfiles de expresión génica pueden permanecer estables durante varios ciclos celulares, incluso pueden mantenerse a través de generaciones, para después ser reprogramados en puntos precisos del desarrollo o en respuesta a factores ambientales mediante mecanismos epigenéticos. Las investigaciones muestran que los micronutrientes pueden interactuar con el genoma, modificar la expresión de genes y alterar la composición de proteínas y metabolitos dentro de la célula (Subbiah, 2008; Feil, 2006). La influencia que tiene la dieta sobre el genoma tiene un efecto gradual y ocurre a lo largo de la vida. La expresión de genes es, sin embargo, un proceso complejo, específico por tejido y modulado por una amplia variedad de factores ambientales como la radiación, nutrición, actividad física y el tabaquismo.

II.2 GEN SUPERÓXIDO DISMUTASA 2 (*SOD2*)

Los organismos que evolucionaron para poder sobrevivir en un medio ambiente rico en oxígeno, requieren un sistema de defensa que los proteja en contra de ROS, que son producidas a partir de la reducción de un electrón de este elemento. Concentraciones fisiológicas de ROS en organismos aeróbicos son benéficas ya que están implicadas en vías de señalización celular y sobrevida en contra de patógenos invasores, sin embargo, la pérdida del balance, con concentraciones elevadas de ROS predispone a un estado de estrés oxidativo, que contribuye al desarrollo de varias enfermedades como cáncer, hipertensión, diabetes, aterosclerosis, inflamación y envejecimiento prematuro (Zelko, 2002).

Las superóxido dismutasas (SODs) son la primera y más importante línea de enzimas antioxidantes que defienden al organismo en contra de las ROS, particularmente de los radicales superóxido. A la fecha, se han identificado tres isoformas diferentes de SOD en mamíferos, y su estructura genómica, ADNc, y proteínas han sido previamente descritas. Dos isoformas utilizan Cu y Zn en su centro catalítico y son localizadas en compartimientos citoplasmicos (CuZn-SOD o SOD1) o en elementos extracelulares (EC-SID o SOD3). Una tercera isoforma de SODs utiliza manganeso (Mn) como cofactor y ha sido localizada en la mitocondria de células aeróbicas (Mn-SOD o *SOD2*) (Fig.5) (Weisiger, 1973).

Fig.5: Organización genómica de los tres miembros conocidos de la familia de enzimas SOD.



Se colocó a SOD3 en medio con la finalidad de señalar áreas homólogas en la secuencia de aminoácidos entre SOD1 y SOD3. SOD2 no tiene secuencias de aminoácidos homólogas con SOD1 o SOD3. El tamaño de cada exón e intrón, en pares de bases, se muestra en asociación con los datos del fragmento. Traducida de Miao, 2009).

Estructura genética

La estructura de *SOD2* ha sido determinada para el humano (DiSilvestre, 1995), el ratón (Jones, 1995), la rata (Ho, 1991) y el bovino (Meyrick, 1994). Todas estas especies muestran marcadas estructuras y secuencias conservadas (Meyrick, 1994). Físicamente el gen *SOD2* está conformado por 5 exones y 4 intrones, la región promotora no contiene caja TATA o CAAT y tiene regiones ricas en GC en todas las especies, estas características son típicas de genes “housekeeping” (Zelko, 2002). Tanto el humano como el ratón contienen el elemento de regulación transcripcional NF- κ B, así como múltiples copias de secuencias Sp1 y AP2.

Localización cromosomal y función principal

El gen *SOD2* está localizado en cromosoma 6 región q25.3. Este gen codifica para la enzima mitocondrial Superóxido Dismutasa dependiente de Manganeso (MnSOD), que cataliza la dismutación de aniones superóxido (O_2^-) a peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y oxígeno (O_2). La MnSOD trabaja en conjunto con otras enzimas antioxidantes para proteger a la célula en contra del daño asociado a la exposición a sustancias reactivas de oxígeno (ROS). Existen reportes en la literatura que indican que el mRNA de MnSOD, proteína y actividad están disminuidas en muchos tipos de tumores primarios en humanos (MacMillan-Crow, 2001). Se destaca la pérdida significativa de la expresión de MnSOD en células de cáncer por los resultados de estudios que demuestran que una sobre-expresión de MnSOD puede llegar a atenuar fenotipos malignos. En conjunto, estos hallazgos han conducido a la hipótesis de por sus funciones, *SOD2* pueden actuar como gen de supresión tumoral (Hitchler, 2006).

Regulación de la transcripción

El gen *SOD2* codifica para la enzima dependiente de manganeso MnSOD. A pesar de que este gen se expresa en diferentes tipos de células y tejidos a niveles relativamente elevados, su regulación depende tanto de factores intracelulares como ambientales. Los resultados de

análisis computacionales han revelado elementos de regulación transcripcional cercanos a las regiones promotoras del gen *SOD2*, que son sitios de unión para factores de transcripción como el factor nuclear-KappaB (NF-κB), Ap1, Ap2 y Sp1, y tienen papel importante en la regulación de los niveles de expresión constitutivos o inductivos de las tres SODs (Miao, 2009).

Factor Nuclear-KappaB (NF-κB):

Este factor de transcripción es sensible a estados de óxido-reducción (REDOX), actúa como regulador de genes al fungir como “respondedor inmediato” al estímulo de daño celular. Los elementos de respuesta a NF-κB han sido encontrados en regiones promotoras e intrónicas de las tres SODs. La inducción de *SOD2* en respuesta al estrés oxidativo ha sido ampliamente documentada en organismos, tejidos y células creciendo bajo condiciones de estrés. Los estímulos como radiación ionizante, 12-O-tetradecanoiforbol (TPA), interferón gamma (IFN-γ), y citoquinas pro-inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral α (TNF α), interleucina-1-beta (IL-1 β), interleucina-4 (IL-4) e interleucina-6 (IL-6), pueden rápidamente modular la transcripción del gen *SOD2*. Estudios realizados por Miao *et al.*, muestran que los estímulos que elevan los niveles de mRNA de MnSOD son regulados a nivel transcripcional. En uno de sus estudios, se identificó al NF-κB como el factor de transcripción más crucial en la regulación de la inducción de MnSOD. De manera interesante, estudios funcionales del mismo grupo de investigación han demostrado que mientras que el sitio de NF-κB localizado dentro del segundo intron de *SOD2*, es necesario para la inducción de la expresión de MnSOD inducida por citoquinas, p50, un miembro de la familia de NF-κB, ejerce un efecto negativo en la expresión *SOD2* (Miao, 2009; Zelko, 2002).

Proteína específica 1 (Sp1):

Sp1 es un factor de transcripción que actúa uniéndose directamente al ADN y es esencial para la expresión constitutiva e inducida de MnSOD. Se sabe que la región promotora del gen *SOD2* es rica en motivos Sp1, y mientras que hace algunos años se pensaba que este factor de transcripción promovía de manera positiva la transcripción de MnSOD (Zhu, 2001), ahora se sabe que interactúa con otros factores como NF-κB, para ejercer efecto tanto

positivo o negativo sobre la expresión de *SOD2*. Las complejas relaciones que hay entre todos estos motivos pueden dar explicación a las alteraciones que tiene este gen en su expresión y en el desarrollo de enfermedades.

Proteína de activación -1 y -1 (Ap-1 y Ap-2)

Ap-1 es una proteína homo- o hetero-dimérica, actúa como un regulador transcripcional que modula la transcripción de procesos relacionados con la transformación y proliferación celular. *Ap2* es un factor de transcripción que ejerce un efecto negativo sobre la baja expresión de MnSOD al suprimir la transcripción dependiente de Sp1. Cuando el sitio de unión de *Ap2* en el promotor se encuentra metilado, se disminuye su unión al ADN y la expresión de MnSOD se recupera de la represión transcripcional. Por lo tanto, la unión de *Ap2* al promotor de *SOD2* puede tener un efecto negativo sobre la expresión de MnSOD (Huang, 1997). Consistente con esta posibilidad, la disminución en la proporción de Sp-1/*Ap2* tiene un efecto importante en la pérdida de regulación de la actividad del promotor de *SOD2* (Miao, 2009). Consecuentemente, la pérdida de la actividad de *Ap2* en varios tipos de cáncer en humanos puede dar explicación a los elevados niveles de MnSOD encontrados en estos cánceres.

Proteínas de unión a CCAAT (C/EBP):

Las proteínas de unión C/EBP interactúan con motivos presentes en la caja CCAAT en la región promotora de múltiples genes. Estas proteínas están implicadas en la regulación de la expresión de MnSOD inducida por citoquinas.

Regulación epigenética

Domann *et al.*, demostraron mediante una serie de experimentos en células de cáncer de mama y otras células transformadas, la influencia que tienen los mecanismos epigenéticos como la metilación de las citosinas y la de-acetilación de histonas, en la condensación de la estructura de la cromatina asociada con el silenciamiento de la expresión de *SOD2* (Hitchler, 2006; Hitchler, 2008). Estos hallazgos han sido confirmados en otras líneas

celulares, por ejemplo, células de carcinoma pancreático y células de mieloma múltiple humano KAS 6/1, en donde un inhibidor de la ADN metiltransferasa (DNMT) fue capaz de revertir el estado metilado del promotor de *SOD2* en las islas CpG y restaurar los niveles de MnSOD (Hurt, 2007; Hodge, 2005).

Implicaciones biomédicas

Un estado REDOX anormal se ha asociado a muchas enfermedades. De entre las tres isoformas de SOD, MnSOD es la única que ha probado ser esencial para la supervivencia de organismos aerobios. El efecto fisiológico de MnSOD como una enzima cito-protectora, está ampliamente confirmado en ratones knockout para MnSOD, los cuales murieron al poco tiempo de nacidos por enfermedad cardíaca y neurodegeneración (Li, 1995; Lebovitz, 1996).

Más allá de la supervivencia al medio ambiente aerobio, la importancia de MnSOD se ha probado en otros contextos patológicos, por ejemplo, en el desarrollo de cáncer, que se relaciona con la activación oncogénica o inactivación de genes de supresión tumoral. En etapas tempranas del cáncer, se ha señalado que tanto el estrés oxidativo como los niveles relativamente bajos de enzimas antioxidantes, resultan en daño al ADN y a las estructuras celulares. Ya que MnSOD juega un papel crítico en la defensa del organismo en contra del daño oxidativo y de apoptosis en el rápido crecimiento de células de cáncer, es considerada como proteína de supresión tumoral única (Kinnula, 2004).

El efecto de supresión tumoral de MnSOD se ha demostrado en numerosos tipos celulares con fenotipos malignos vía modulación de los factores de transcripción regulados por estímulo REDOX. Sin embargo, una vez que el cáncer ha progresado, la expresión de MnSOD puede ser mayor en cánceres agresivos comparado con su contraparte benigna. Estos hallazgos han sido reportados en tejidos de cáncer avanzado y muestras de leucemia en sangre. Un nivel significativamente mayor de MnSOD en cáncer de ovario maligno

comparado con muestras de epitelio normal y lesiones benignas también ha sido identificado utilizando análisis con microarreglos de diferentes tejidos (Oberley, 2005; Miao, 2009). Las ROS hacen que las células cancerosas sean parcialmente dependientes de la función de superóxido dismutasa para protegerse del daño causado por las elevadas cantidades de radicales superóxido. La necesidad de aliviar el estrés de ROS provee una explicación del porqué aumentan los niveles de MnSOD en algunos tipos de células con cáncer en estadios avanzados (Hu, 2005).

Dado el papel fundamental de la mitocondria y MnSOD en la regulación de muerte celular y el desarrollo del cáncer, las alteraciones de la actividad y nivel de MnSOD podría ser un objetivo para intervenciones terapéuticas. Se ha identificado la asociación del polimorfismo genético de *SOD2* con varias enfermedades incluyendo diabetes tipo II, asma, enfermedad obstructiva crónica (EPOC) e hipertensión (Mikhak, 2008; Janssen-Heininger, 2005; Pietras, 2010).

En conclusión, los resultados de diversos estudios realizados *in vitro* y en humanos, sugieren que componentes de la alimentación tienen efecto en la modulación de genes previamente silenciados por metilación, estos resultados son cada vez más contundentes. El impacto que tiene en el organismo el silenciamiento de genes involucrados en la reparación del ADN, en la regulación del ciclo celular, apoptosis, en las vías de señalización, entre otros, es abundante y causa propuesta de la aparición de múltiples enfermedades. La causa de la metilación de estos genes, y la manera de revertir este mecanismo son temas actuales de investigación.

Definitivamente, un desafío para la próxima década será la traducción de los datos nutrigenómicos a predicciones correctas sobre el efecto benéfico o adverso de los componentes de la alimentación. Los nutrientes son señales alimentarias que son

detectadas por sistemas de sensores celulares que influyen la expresión de genes y proteínas, así como los productos metabólicos subsecuentes (Simopoulos AP, 2004).

Dado los efectos previamente conocidos de la cocoa, y el abundante consumo de sus derivados en México y el mundo, resulta importante conocer si este alimento es capaz de modular la expresión de genes claves en el organismo, y que han sido previamente silenciados por mecanismos epigenéticos como la metilación, tal es el caso del gen *SOD2*. Las consecuencias de este impacto deberán ser examinadas como una posible estrategia con enfoque dietético para minimizar las consecuencias de la exposición del organismo a los efectos tóxicos del ambiente, por ejemplo el hábito tabáquico.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El conocimiento actual establece que los genes contribuyen a la susceptibilidad a una enfermedad o condición, y los factores ambientales como la dieta y el ejercicio, determinan quién de entre los susceptibles la desarrollará. Las interacciones entre las experiencias ambientales del individuo y su estructura genética, son factores que determina el patrón de salud y enfermedad (Domain J.S., 2000; National Center for Biotechnology Information, 2011).

La regulación de la expresión de genes es un proceso complicado, los perfiles de expresión pueden permanecer estables durante varios ciclos celulares, incluso pueden mantenerse a través de generaciones, para después ser reprogramados en puntos precisos del desarrollo en respuesta a factores ambientales (Simopoulos A.P., 2004). El gen *SOD2*, pieza clave del equilibrio REDOX del organismo, ha mostrado alteraciones en su perfil de enfermedades con altas tasas de morbi-mortalidad, que tienen como característica, una elevada producción intrínseca de ROS, como el cáncer. Aunque *SOD2* se ha propuesto como gen de supresión tumoral, su papel en el inicio y evolución de estas patologías es aún elusivo (Miao, 2009).

Las vías propuestas, que podrían explicar la influencia de componentes del ambiente, sobre la expresión de *SOD2*, son dos. La primera incluye todos aquellos elementos que están involucrados en las vías de regulación anti-, pro-oxidante, y cuya función se ve afectada por la concentración de ROS (Hitchler, 2006; Miao, 2009). La segunda, es por efecto de fitoquímicos como los flavanoles, que han demostrado ser capaces de modular la expresión de genes por metilación *in vitro*, probablemente mediante la regulación de mecanismos epigenéticos como la metilación (Feig, 1994; Lee, 2002; Belinsky, 2006; Mao, 2000; Rein, 2000 77; Keen, 2005).

Aunque los resultados de estudios *in vitro* son clara evidencia del impacto que tienen los flavanles sobre la expresión de genes, los resultados no son totalmente comparables con el efecto fisiológico de los flavanoles *in vivo*. Esto se debe a la conjugación de los flavanoles

en el tracto gastrointestinal, proceso que modifica la actividad biológica de los fitoquímicos.

Los beneficios que ofrece al organismo el consumo de flavanoles está documentado en estudios epidemiológicos y experimentales, sin embargo, los procesos moleculares que explican este fenómeno son desconocidos. Es por lo tanto necesario, identificar si el consumo de agudo de flavanoles es capaz de modificar la expresión de genes in vivo. Las consecuencias de este impacto deberán ser examinadas como una posible estrategia con enfoque dietético para minimizar las consecuencias de la exposición del organismo a los efectos tóxicos del ambiente, por ejemplo el hábito tabáquico.

IV. HIPÓTESIS GENERAL

El consumo de suplemento de cocoa aumenta la expresión del gen *SOD2* en CMSP.

Hipótesis Específicas

- El consumo de polifenoles contenidos en un concentrado de cocoa aumenta la actividad antioxidante en plasma.
- Las personas con mayor actividad antioxidante en plasma tienen una mayor expresión de *SOD2* en CMSP.

V. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto que tiene el consumo de un suplemento de cocoa sobre el cambio en la expresión del gen mitocondrial *SOD2* de CMSP.

Objetivos específicos

- Evaluar el porcentaje de cambio en la capacidad antioxidante del plasma posterior al consumo de un concentrado de cocoa.
- Identificar las fuentes de consumo más frecuentes de polifenoles, catequinas y vitaminas antioxidantes en la muestra estudiada.

VI. METODOLOGÍA

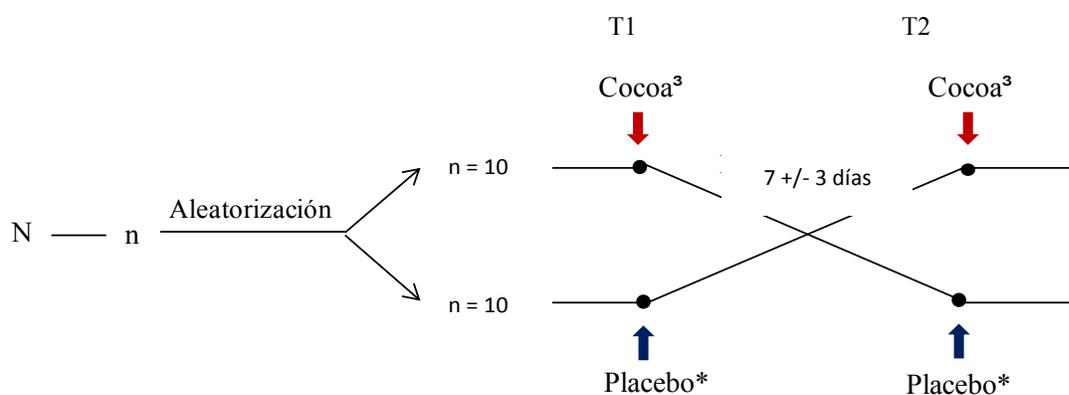
IV.1 Estrategia General

Se llevará a cabo un ensayo clínico experimental cruzado, en 24 voluntarios aparentemente sanos. Cada voluntario deberá asistir a dos citas. En la primera consumirá un concentrado de cocoa y en la segunda un placebo, o viceversa. Todos los voluntarios, sin excepción, deberán consumir ambos tratamientos. La asignación del primer tratamiento se hará mediante aleatorización sistemática. Se tomarán cuatro muestras de sangre: dos en estado de ayuno y dos posteriores al consumo del tratamiento. Durante la primera visita, se aplicarán cuestionarios de consumo de alimentos, actividad física e historia clínica; se tomarán medidas antropométricas y se realizará un análisis de composición corporal. La recolección de las muestras se llevará a cabo tanto en la Clínica de Nutrición de la Universidad Iberoamericana (UIA), como en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN).

VI.2 Diseño del estudio

El presente estudio tiene un diseño de ensayo clínico, controlado, aleatorizado, cegado. Fig. 6.

Fig. 6: Esquema del diseño de estudio.

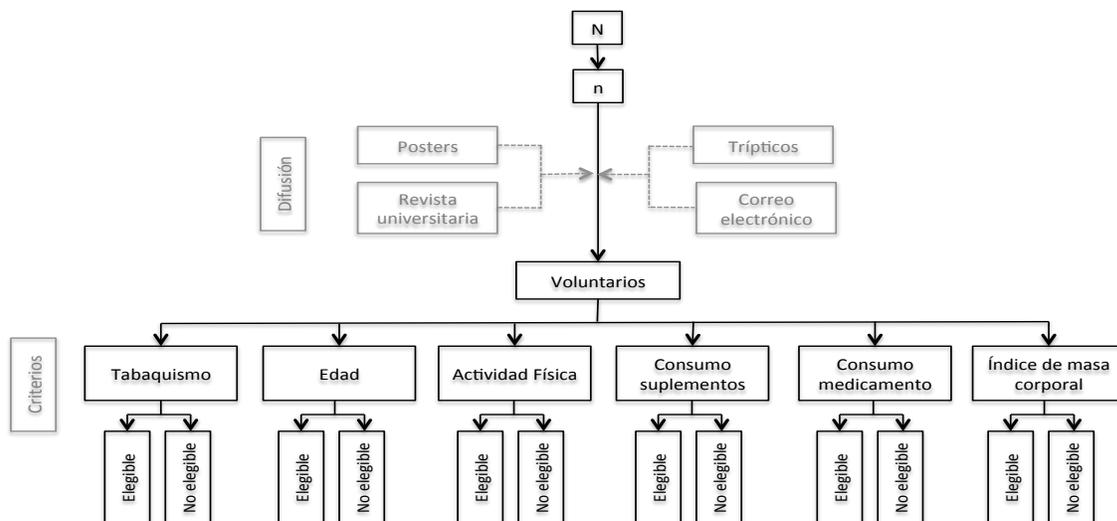


Un *ensayo clínico*, es un experimento controlado, en donde se administra un nuevo tratamiento, y se compara con otro denominado control. En este caso, el control fue un placebo, que es un producto inocuo, cuya preparación es similar en presentación, tamaño, color, textura y sabor, al tratamiento activo. La asignación de la maniobra de intervención se establecerá mediante *aleatorización sistemática*, en sujetos con características homogéneas que permite garantizar la comparabilidad entre los grupos. Por ser un diseño cruzado, el periodo en el que los voluntarios consuman el placebo, fungirá como *control* del periodo en donde consuman el *activo*. De esta forma, variables de confusión como es el fondo genético individual, queda controlado. Por último, el estudio cumple con el criterio de *triple ciego*, dado que ni los voluntarios ni el investigador, ni el analista está consiente de cuál de los tratamientos es el placebo y cuál es el activo. Los productos fueron cegados e identificados como tratamiento Yellow y tratamiento Orange. Las características antes mencionadas permiten disminuir los posibles sesgos asociados al estudio y posibilita la comparabilidad de la información.

VI.3 Selección de la población

El proceso a través a través del cual se seleccionó a la población de estudio se esquematiza en la Fig. 7. Los criterios se establecieron considerando características relevantes previamente reportadas en la literatura.

Fig. 7: Proceso de difusión y selección de la muestra de estudio.



Criterios de selección:

- Hombres y mujeres sanos de entre 18-40 años de edad.
- Que acepten participar en el estudio voluntariamente.
- IMC menor que 30 y mayor a 18.5 kg/m².
- Actividad física de sedentaria a moderada. .
- No fumadores.

Criterios de exclusión:

- Consumo de fármacos en las últimas 2 semanas
- Consumo de multivitamínicos
- Personas con enfermedad crónica
- Historia de abuso de drogas o alcohol
- Deportistas de alto rendimiento

Criterios de eliminación:

- Personas que consuman alimentos entre las dos muestras
- Personas con cuestionarios incompletos
- Personas que no asistan a todas las evaluaciones
- Personas que sean detectadas como enfermas en el momento del estudio
- Personas que cambien su hábito tabáquico

VI.4 Cálculo de muestra

El cálculo de la muestra se hizo utilizando la fórmula de Hulley S.B. (Hulley S.B, 2001) como se muestra a continuación:

$$n = \frac{(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 \bar{p} (1 - \bar{p}) (r + 1)}{(d)^2 r}$$

En donde:

n = Tamaño de la muestra

Z_{α} = Valor z correspondiente al error alfa (p 0.05 = 1.96)

Z_{β} = Valor z correspondiente al error beta (20% = 1.036)

\bar{p} = Promedio ponderado de P_1 y P_2 : $[(P_2 + r P_1) / (1 + r)]$

p_1 = Valor de la proporción esperada en el grupo de referencia “control” (0.15)

p_2 = Valor de la proporción esperada en el grupo de estudio “experimental” (0.80)

r = razón de sujetos por grupo (1)

d = Valor (no nulo) de las diferencias de porcentaje, o magnitud de las diferencias que se pretende probar ($P_2 - P_1$)

Sustitución:

$$\hat{n} = \frac{(1.96 + 1.036)^2 * 0.475 * 0.525 * 2}{(0.65)^2 * 1}$$

$\hat{n} = 10$ personas por grupo

Se considerarán para el estudio un total de 24 personas (10 en cada grupo más un 20% por posibles pérdidas)

VI.5 Definición de la intervención

El estudio pretende comparar el efecto que tienen dos tratamientos en términos de cambio en la expresión del gen antioxidante *SOD2*. Se determinará por lo tanto, la expresión basal del voluntario y se contrastará con la expresión posterior al consumo del tratamiento.

Cada intervención tendrá una duración de aproximadamente 3 horas. La primera consiste en 6 procedimientos: (1). Extracción de ≈ 20 ml de sangre de la vena del brazo en condiciones de ayuno que servirá para análisis de ARN, ADN, parámetros bioquímicos y capacidad antioxidante en plasma (CAP); (2). Consumo de cuatro cápsulas correspondientes al tratamiento asignado; (3). Aplicación de los siguientes cuestionarios: a) Historia clínica (*Anexo B*), b) Recordatorio de 24 horas (*Anexo C*), c) Actividad física (IPAQ, *Anexo D*), d) Frecuencia de consumo de alimentos (SNUT, *Anexo E*); (4). Análisis de composición corporal (InBody); (5). Toma de medidas antropométricas (peso, talla, circunferencia de cintura); (6). Extracción de ≈ 20 ml de sangre dos horas posteriores al consumo del suplemento que servirán para análisis de ARN, ADN y capacidad antioxidante en plasma. Al término del procedimiento, se le ofrecerá al voluntario el desayuno.

La segunda visita se programa 7 (+/- 2) días después y consiste en únicamente en 3 procedimientos: (1). Extracción de ≈ 20 ml de sangre de la vena del brazo en condiciones de ayuno, (2). Consumo de cuatro cápsulas correspondientes al tratamiento contrario al asignado la primera vez, (3). Extracción de ≈ 20 ml de sangre dos horas posteriores al consumo del suplemento. Al término de la segunda visita se le ofrecerá el desayuno al voluntario.

Durante la intervención el único alimento que el voluntario podrá consumir es agua. Cada cápsula contiene ≈ 0.33 g de producto, por lo que el voluntario consume ≈ 1.32 g de producto por visita.

VI.6 Desarrollo de materiales para la intervención

El concentrado de cocoa fue proporcionado por la compañía Naturex (CocoaPure™ 45%); se extrae del árbol *Theobroma cacao*. De manera general, el producto contiene > 45-50% de polifenoles, de los cuales: > 20% está presente en forma de catequina y > 10% se encuentran como catequina, epicatequina, B1 y B2 (las especificaciones del producto se podrán encontrar en el Anexo F).

El placebo también fue proporcionado Naturex y consiste básicamente en maltodextrinas. Ni el concentrado de cocoa, ni el placebo, tienen sabor o aroma fuerte debido a que la materia prima no ha sido fermentada ni tostada (Tomas-Barberan, 2007).

El encapsulado y aleatorización de los tratamientos lo realizó un laboratorio externo al INMEGEN. Las cápsulas contienen ≈0.33 g de producto cada una (concentrado de cocoa o placebo). La dosis administrada a los participantes será 4 cápsulas y el equivalente de polifenoles por dosis es de 611 mg/g de suplemento de cocoa (Tabla 1). La dosis fue establecida con base en la literatura, es considerada como segura para consumo humano. (Manach, 2005; Rein, 2000; Schramm, 2001; Williams, 2009)

Tabla 3. Contenido de polifenoles y purinas (mg/g) de CocoaPure™ 45%

Componente	No.	CocoaPure 45%
Teobromina	1	66,64
B1 (dimerio)	2	13,80
Trimerio	3	8,74
Tetramero	5	5,48
Tetramero	6	5,25
Catequina	7	24,23
Cafeína	8	16,46
Trimerio	9	16,35
B2 (dimerio)	10	91,28
Tetramero	11	21,26
Epicatequina	12	96,19
Trimerio	13	47,66
Tetramero	14	40,69
Pentamero	15	18,08
Dimerio	16	26,96
Oligomeros + polimeros	17	33,60
Procianidinas totales		449,18

VI.7 Estrategia de acción

El proyecto se promocionará a través de mails, trípticos y posters (*Anexo I*) que contienen información general; objetivo, criterios de inclusión, beneficios obtenidos, procedimientos a realizar y datos de contacto (teléfono y correo electrónico).

El primer contacto con el voluntario surge cuando se comunica con nosotros vía teléfono o correo electrónico. Posteriormente se verifica que cumplan con los criterios protocolarios pre-establecidos. Se entrega la hoja de consentimiento informado (*Anexo A*), y se explica detalladamente los procedimientos que se realizarán; la manipulación, uso y almacenamiento de las muestras; el volumen de sangre que se extraerá; así como los posibles riesgos y beneficios asociados. La participación en el proyecto es voluntaria y de así quererlo, el participante podrá desertar en el momento que lo desee. Los datos personales y muestras recolectadas se manejarán con estricta confidencialidad, se identificarán con un código individual, y se almacenarán en un bio-banco de ADN ubicado en el INMEGEN. Solo los investigadores principales tendrán acceso a los datos de identificación personal.

Las mediciones antropométricas se realizarán por personal estandarizado con un coeficiente de variación menor al 5%. Se llevarán a cabo los procedimientos de control de calidad recomendados para cada método. Durante el tiempo de espera, los participantes podrán consumir únicamente agua. Al término del estudio, se les proporcionará a los participantes asesoría en materia de Nutrición, estudios de glucosa en ayuno, perfil de lípidos, antropometría y el desayuno.

- *Recolección y manejo de muestras biológicas*

La recolección de las muestras se llevará a cabo en dos sedes; la Clínica de Nutrición de la Universidad Iberoamericana ubicada en Prolongación Paseo de la Reforma 880,

Col Lomas de Santa Fe, y el laboratorio de Nutrigenómica y Nutrigenética del INMEGEN, localizado en Periferico sur 4124, Col. Ex Rancho Anzalde.

Los sustratos colectados serán empleados de la siguiente forma:

Células de sangre periférica:

- Tubo EDTA: Se extraerá un tubo de 6 mL con EDTA, mismo que se utilizará para determinación de glucosa en ayuno, perfil de lípidos, hemoglobina glucosilada e insulina. El buffy coat de este tubo se utilizará para extracción de ADN (QIAamp Blood Mini Kit Qiagen).

Tubo CPT: Se extraerán 8 mL de sangre que servirán para extraer ARN a partir de CMSP mediante el método de Trizol (Invitrogen). Se formara ADN complementario (ADNc por sus siglas en inglés) a partir de la cadena de ARN mediante transcripción reversa (RT por sus siglas en inglés) (First Strand Synthesis Kit, Fermentas). La expresión genética será cuantificada utilizando la técnica TaqMan para RT-PCR de tiempo real. El ADNc será normalizado utilizando como controles internos la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (*SOD2*), la fracción ribosomal 18S y actina, empleando el ciclo estándar en el bioanalizador VIIA 7 (Applied Biosystem). Las condiciones del termociclador serán la misma para todos los genes: 95°C por 3 minutos, seguida por cuarenta y cinco ciclos a 95° por 30 segundos y 67°C por 45 segundos. Todos los kits serán usados de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

- Tubo Heparina de Litio: Se extraerán 6 ml de sangre en un tubo con heparina de litio. Se separarán 200 µl de plasma para análisis de capacidad antioxidante por el método de Trolox (Sigma Aldrich). El resto del plasma se congelará a -80° C con ácido ascórbico para determinación de epicatequina en en plasma.

Las técnicas de laboratorio utilizadas en la extracción y manejo de las muestras de laboratorio se describen en el *Anexo G*.

VI.8 Variables de estudio

Las variables incluidas en el estudio están clasificadas de acuerdo a temporalidad y la relación entre ellas. Para ver la definición conceptual y operacional detallada ver el *Anexo H*.

- Variables descriptivas: Dieta, edad, IMC, porcentaje de masa grasa, porcentaje de masa corporal, parámetros bioquímicos (glucosa, colesterol, triglicéridos)
- Variables independientes: Consumo del concentrado de cocoa alto en polifenoles.
- Variables intermedias: Cambio en la actividad antioxidante en plasma.
- Variable dependiente: Cambio en la expresión del gen *SOD2*.

VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Este estudio sigue un diseño de *dos-tratamientos, dos-periodos* o 2 x 2. En él, cada sujeto recibe dos tratamientos (uno de los cuales es placebo), en periodos diferentes. La principal ventaja del diseño cruzado es que la comparación de los tratamientos se hace intra-sujeto. Es decir, cada sujeto provee una comparación directa de los tratamientos que recibió, logrando eliminar o remover variables confusoras como el fondo genético entre los contrastes realizados. Para llevar a cabo adecuadamente un estudio cruzado, es necesario tener claro el fenómeno biológico que se pretende estudiar; la aleatorización y el cegamiento son medidas que permiten controlar potenciales sesgos confusores.

El objetivo principal del estudio, es el evaluar el efecto agudo que tiene un concentrado de cocoa con alto contenido en polifenoles sobre la salud, en términos de cambios en la expresión del gen mitocondrial *SOD2* en CMSP. La terminología empleada en el análisis y descripción de resultados será la siguiente:

- Tratamientos, con niveles “Yellow” y “Orange”,
- Periodos, con niveles “1” y “2”,
- Secuencia, con niveles “Yellow-Orange” y “Orange-Yellow”.

De tal manera que:

Grupo 1	Yellow en periodo 1	Orange en periodo 2
Grupo 2	Orange en periodo 1	Yellow en periodo 2

Se aplicará estadística descriptiva que permita explorar el la distribución de las principales variables de estudio. Las variables con distribución normal se analizarán

mediante una prueba t-Student para muestras relacionadas y se comparan los efectos de los tratamientos. Se explorará la presencia de un “efecto de acarreo” al evaluar las diferencias entre voluntarios que consumieron el tratamiento en secuencia Yellow-Orange y los que lo consumieron Orange-Yellow. Por último, se analizará si hay un efecto sexo-dependiente y la probable presencia de interacciones entre variables asociadas al cambio en la expresión de *SOD2*.

La confiabilidad de la metodología antes propuesta será verificada durante la revisión de datos cegados. Si los resultados de los datos no están normalmente distribuidos, se puede llevar a cabo una transformación o un abordaje no paramétrico en el plan de análisis.

Hipótesis a probar:

- El efecto de acarreo entre periodos. $H_0: \lambda_1 = \lambda_2 = 0$
- Efecto del periodo: = $H_0: \pi_1 = \pi_2 = 0$
- El efecto directo del tratamiento. $H_0: T_1 = T_2 = 0$

VIII. RESULTADOS

El reclutamiento de voluntarios inicio en Abril del 2012 y terminó en Junio del mismo año. La toma de muestras y la aplicación de los cuestionarios se llevó a cabo tanto en la Clínica de Nutrición de la UIA como en el Laboratorio de Nutrigenómica y Nutrigenética del INMEGEN. El análisis de composición corporal se realizó únicamente en la primera sede, dado que solo ahí se contaba con el equipo adecuado para efectuar las mediciones. Durante este periodo se reclutaron un total de veinticinco voluntarios de los cuales se excluyeron nueve por incumplimiento con los procedimientos del estudio o procesamiento las muestras en laboratorio. Los resultados se presentar para una muestra de 16 voluntarios. El 50% recibió el tratamiento en secuencia Orange-Yellow y el otro 50% en secuencia Yellow – Orange. Como se puede observar en la tabla 4, hubo una mayor participación del sexo femenino que del sexo masculino.

Tabla 4. Distribución por sexo de los participantes

		Sexo			
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	F	9	56,3	56,3	56,3
	M	7	43,8	43,8	100,0
Total		16	100,0	100,0	

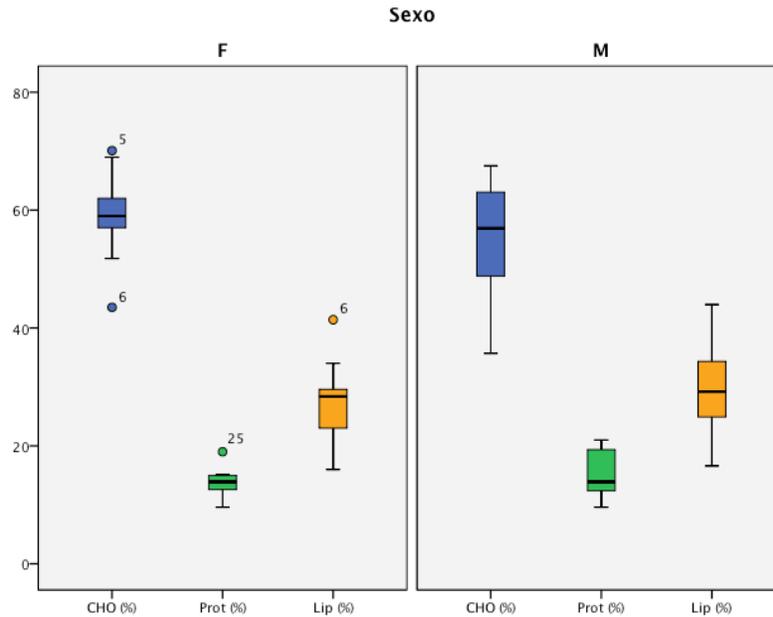
En la tabla 5 se presentan los estadísticos descriptivos de las variables de estudio estratificadas por sexo. De manera general, todos los sujetos cumplieron con los criterios de edad e IMC. Las diferencias en las variables de composición corporal (IMC, % masa grasa, kg de masa muscular y circunferencia de cintura) son atribuibles a las diferencias fisiológicas entre hombres y mujeres. La distribución del consumo de macronutrientes fue similar para ambos sexos, las mujeres consumen un mayor porcentaje de calorías provenientes de HC, mientras que los hombres consumen un mayor porcentaje de calorías provenientes de proteínas (Prot) y lípidos (Lip). En el Graf. 1 se observa que el consumo de macronutrientes es más heterogeneo en

hombres que en mujeres, es decir, existe una mayor dispersión de datos en el sexo masculino. Por último, ninguno de los 16 sujetos incluidos en el estudio obtuvo valores bioquímicos (glucosa, colesterol y triglicéridos) fuera del rango de normalidad, aunque, en concordancia con otros estudios, las mujeres tuvieron cifras más cercanas al valor óptimo.

Tabla 5. Estadísticos descriptivos estratificados por sexo

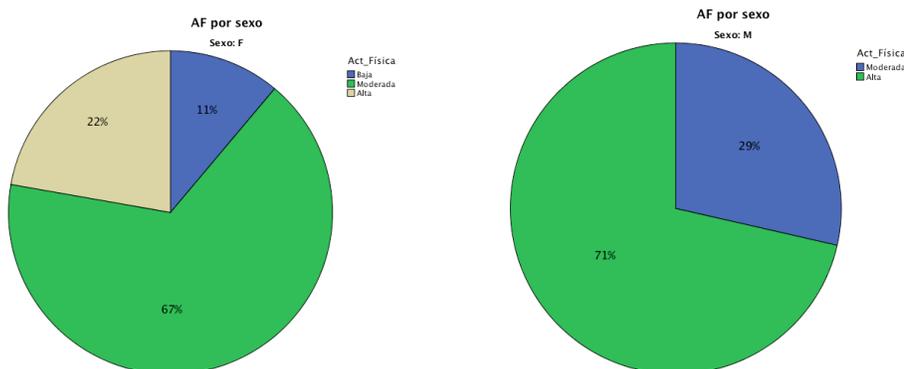
Estadísticos descriptivos						
Sexo		N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. tip.
F	Edad_1	9	19	39	26,44	5,457
	Peso (kg)	9	48,1	70,8	59,656	8,4219
	Talla (cm)	9	151,0	173,0	163,322	8,5462
	IMC_1	9	18,9	27,6	22,444	2,8178
	Grasa Corporal (%)	9	9,1	37,1	26,022	8,4972
	Masa muscular (kg)	9	19,00	37,60	25,6111	6,59914
	Grasa Visceral (cm ²)	9	29,4	83,1	60,200	17,6238
	Circunferencia de cintura (cm)	9	62,9	84,0	70,900	7,1086
	Cal_Basal	9	1120	1414	1273,22	111,126
	Cal_Cons	9	1341	3233	1939,44	701,400
	CHO (%)	9	43,5	70,1	58,977	8,1807
	Prot (%)	9	9,6	19,0	13,619	2,8180
	Lip (%)	9	16,0	41,4	27,404	7,5135
	Glu mg/dL	9	81,0	92,0	85,611	3,9826
	CT mg/dL	9	113,5	234,0	161,500	34,0165
	HDL mg/dL	9	41,0	68,5	55,444	8,8298
	TG mg/dL	9	51,5	131,5	91,056	25,6204
	N válido (según lista)	9				
	M	Edad_1	7	21	38	27,57
Peso (kg)		7	60,9	88,6	76,571	9,7221
Talla (cm)		7	166,4	186,0	173,443	6,2487
IMC_1		7	22,0	30,0	24,986	2,6947
Grasa Corporal (%)		7	15,4	30,4	22,586	6,7620
Masa muscular (kg)		7	24,60	36,30	31,8000	4,64399
Grasa Visceral (cm ²)		7	78,4	128,0	98,529	18,5584
Circunferencia de cintura (cm)		7	80,2	104,3	88,543	9,1531
Cal_Basal		7	1375	1791	1647,29	135,248
Cal_Cons		7	1637	3233	2130,71	561,449
CHO (%)		7	35,7	67,5	54,829	11,1737
Prot (%)		7	9,6	21,0	15,426	4,4677
Lip (%)		7	16,6	44,0	29,746	9,5609
Glu mg/dL		7	81,0	104,5	91,357	8,4297
CT mg/dL		7	162,5	228,5	182,214	21,8648
HDL mg/dL		7	43,0	66,0	50,857	7,7337
TG mg/dL		7	42,5	313,5	149,357	105,6451
N válido (según lista)		7				

Gráf. 1: Consumo de macronutrientes (%) estratificado por sexo.



El nivel de actividad física (AF) se cuantificó mediante el cuestionario IPAQ. Se utilizaron equivalentes metabólicos (METs) para categorizar la variable de acuerdo a lo recomendado por el propio cuestionario. Los puntos de corte utilizados para la categorización fueron los siguientes: AF alta (≥ 3000 MET/minuto/semana), AF moderada (≥ 600 y ≤ 2999 MET/min/sem), AF baja (cualquier AF reportada que no pertenezca a ninguna de las categorías anteriores). Los resultados esquematizados en el Graf. 2, muestran que los hombres realizan AF de mayor intensidad y/o durante más tiempo que las mujeres.

Gráf. 2: AF baja, moderada y alta estratificada por sexo.



Para determinar el cambio en la concentración de mRNA del gen *SOD2* y asegurar la calidad del ARN, se realizaron diversos procedimientos descritos a continuación:

- Cuantificación de ARN:

El ARN se obtuvo a partir de CMSP. La concentración y calidad de la muestra fue analizada mediante espectrofotometría. Dado que los ácidos nucleicos son detectados a una absorbancia de 260 nm, y los contaminantes de la muestra (proteínas, sales y solventes) son detectados a 230 y 280 nm; un ARN de buena calidad tendrá una relación de 260/230 de 1.8 o mayor. En la tabla 6 se muestra la cantidad y pureza del ARN extraído.

Tabla 6. Calidad y pureza de ARN por muestra.

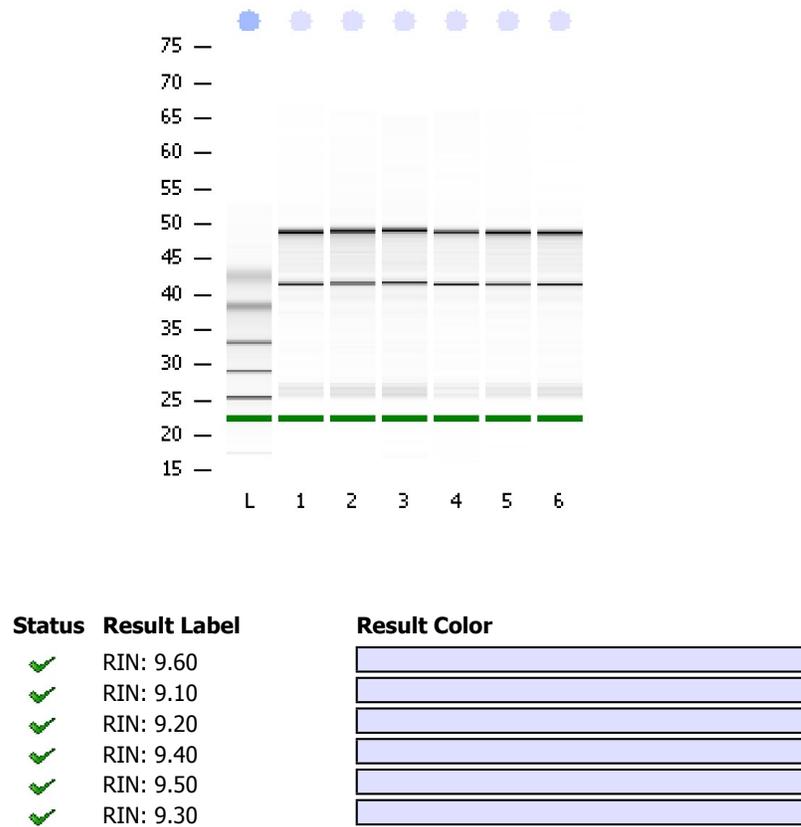
ID	Yellow				Orange			
	Basal		2-hrs		Basal		2-hrs	
	ng/μl	260/230	ng/μl	260/230	ng/μl	260/230	ng/μl	260/230
1	82.66	2.3	12.23	2.31	97.88	1.9	115.32	2.35
2	28.45	2.09	52.14	2.33	197.55	2.06	120.08	1.95
3	82.42	1.7	195.17	1.96	11.71	1.82	20.27	2.02
5	84.26	1.63	69.89	1.78	106.69	2.15	117.41	1.93
6	89.19	1.72	109.93	1.87	151.09	2.2	129.58	2.13
12	107.65	2.18	54.34	2.18	58.8	2.09	75.76	1.78
14	177.84	2.18	49.71	1.94	16.6	1.71	46.28	2.12
16	44.65	1.76	68.32	1.92	80.34	2.2	70.14	1.94
17	217.13	2.26	297.36	2.22	146.44	2.18	181.41	2.18
18	349.88	2.22	155.28	1.87	403.49	2.21	217.63	2.22
21	118.39	1.89	201.25	2.25	211.06	2.03	363.08	2.2
22	235.13	1.99	60.4	1.19	61.01	2.05	117.43	2.05
23	195.2	2.21	329.11	2.16	69.85	2.42	57.81	2.09
24	279.74	2.22	318.41	2.19	84.56	1.77	57.26	1.64
25	119.81	2.31	108.69	2.34	12.55	1.62	382.64	2.11

- Análisis de integridad del ARN:

El análisis se realizó con Chips de Integridad (Agilent Technologies). El bioanalizador indica la integridad de ARN mediante dos parámetros: La relación entre el ARN ribosomal 28S y 18S, y el número RIN (ARN integrity number). La uniformidad de las

bandas y un RIN de 10 indican un ARN intacto, mientras que bandas barridas y un RIN de 1 indican un ARN totalmente degradado. Como se observa en el Graf. 3, las muestras elegidas aleatoriamente para ser analizadas en le Chip de Integridad tuvieron valores de RIN mayores a 9 y bandas bien definidas.

Gráf. 3.: Análisis de integridad de ARN.

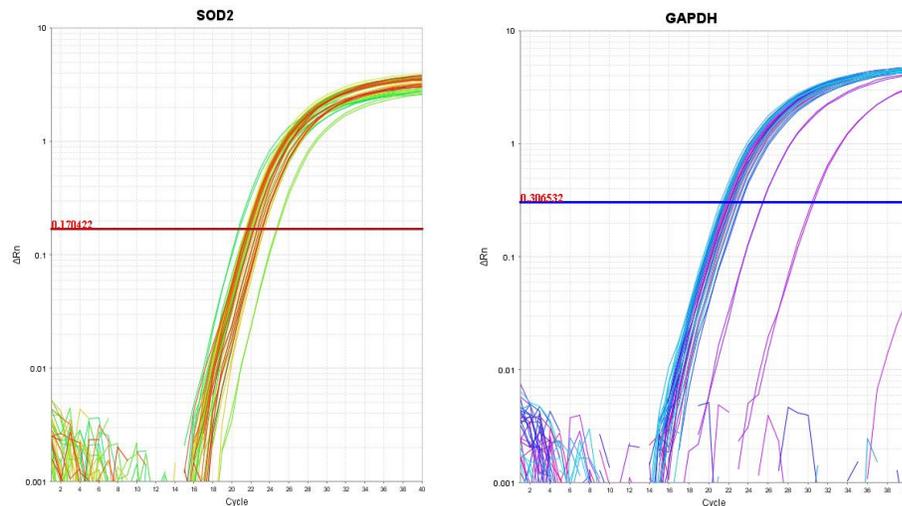


- RT-PCR en tiempo real:

Se generó ADN complementario o ADNc a partir de la plantilla de ARN y se analizó la expresión de *SOD2* por RT-PCR en tiempo real cuantitativo, mediante la técnica de Taqman. El gen seleccionado para fungir de control endógeno fue gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*). En la Graf. 4 se observan las curvas de expresión de *SOD2* y *GAPDH*.

Todos los ensayos se realizaron por duplicado (réplicas técnicas). Con un coeficiente de variación de 0.8%, se asume que existe una alta reproducibilidad en el método.

Graf. 4: Curvas de expresión para los genes *SOD2* y *GAPDH*.



- Cuantificación relativa por el método $\Delta\Delta Ct$:

El análisis de la expresión de genes por cuantificación relativa se emplea cuando se pretende cuantificar el cambio en la expresión del gen de estudio en comparación con el gen control o de referencia. Un gen endógeno debe ser estable a los componentes del tratamiento, es decir, su expresión no debe cambiar por estímulo del tratamiento consumido. La identificación de un control endógeno para un determinado experimento requiere que se prueben dos o más, y se determine cual tiene mayor estabilidad a lo largo del procedimiento. La selección de *SOD2* se realizó a partir de un ensayo previo, en el cual se incluyeron el 18S ribosomal y actina.

De tal manera, los valores de expresión crudos de *SOD2*, son normalizados con los valores de expresión crudos de *SOD2* obteniendo así el valor de ΔCt . Una vez normalizados, los datos se calibran por condición, esto se logra al restar la expresión de

interés (en este caso es la expresión posterior al consumo del tratamiento) vs la expresión calibradora (que para este experimento se determinó como la expresión basal). Se logra así el valor de $\Delta\Delta CT$. El $\Delta\Delta CT$ se eleva a la $2^{-\log \Delta\Delta CT}$ y se obtiene cambio neto (fold change) en la expresión (Tabla 7).

Tabla 7. Cuantificación relativa por el método del $\Delta\Delta CT$.

Método Comparativo C_T	
<p>$\Delta CT = C_T$ Gen de Interés Gen de interés: SOD2</p>	<p>- C_T Gen Endógeno Gen de expresión constitutiva cuyos niveles de expresión no cambian en las condiciones experimentales usadas: GAPDH</p>
<p>$\Delta\Delta CT = C_T$ Muestra de Interés Muestra de interés: Expresión posterior al consumo del suplemento (2 horas)</p>	<p>- C_T Calibrador Muestra contra la cual queremos comparar las diferencias de expresión: Basal</p>

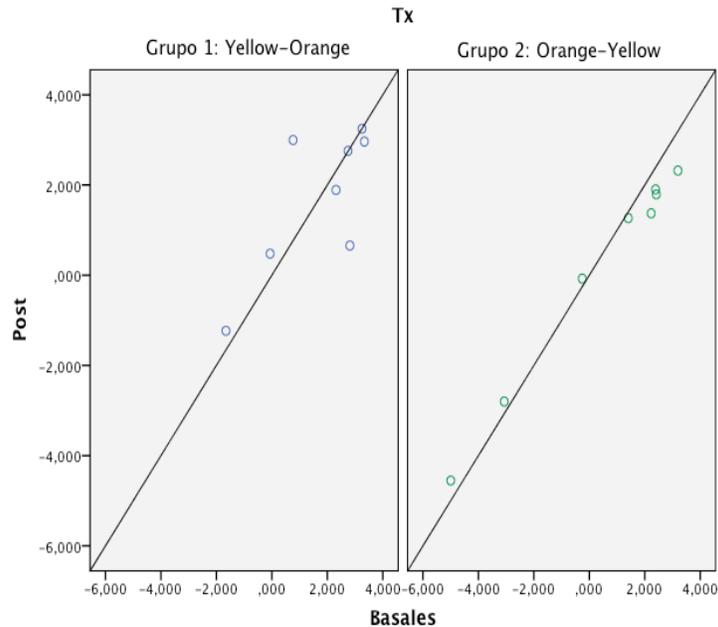
En la Tabla 8 se presentan los datos crudos de expresión (*SOD_1A*, *SOD2_1A*, *SOD_1B*, *SOD2_1B*, *SOD_2A*, *SOD2_2A*, *SOD_2B*, *SOD2_2B*), los datos normalizados (*dCT_1A*, *dCT_1B*, *dCT_2A*, *dCT_2B*), los datos calibrados por condición (*ddCT_1*, *ddCT_2*) y los datos de cambio neto de expresión (Yellow, Orange).

Utilizando los datos normalizados, se comparó la variabilidad intra-grupos. En el eje de las “x” se colocaron los valores de expresión basal, en el eje de la “y” se colocaron los valores de expresión obtenidos a las 2 horas de la suplementación. La dispersión de los puntos a lo largo de la diagonal (Graf. 5) refleja una alta variabilidad intra-grupos. El hecho de que los dos grupos están situados casi simétricamente en relación con la diagonal, es evidencia de la ausencia de un efecto por el periodo.

Tabla 8: Datos crudos de expresión.

SOD_1A	GAPDH_1A	SOD_1B	GAPDH_1B	SOD_2A	GAPDH_2A	SOD_2B	GAPDH_2B	dCT_1A	dCT_1B	dCT_2A	dCT_2B	ddCT_1	ddCT_2	Yellow	Orange
25,2	22,4	26,0	23,2	25,1	22,2	26,9	22,84	2,745	2,757	2,981	4,081	-,012	-1,100	1,008	2,144
23,8	21,5	24,1	22,2	28,1	25,4	24,7	22,45	2,313	1,890	2,637	2,287	,422	,350	,746	,785
24,1	21,7	24,3	22,5	24,3	21,7	24,3	21,56	2,413	1,793	2,559	2,702	,620	-,143	,651	1,104
21,7	24,8	21,6	24,4	21,6	24,7	21,5	24,72	-3,069	-2,800	-3,126	-3,250	-,269	,124	1,205	,918
24,8	24,0	24,4	21,4	24,4	21,8	23,4	21,33	,765	2,998	2,546	2,088	-2,233	,458	,588	,728
24,8	21,6	23,6	21,3	24,6	22,7	23,8	21,63	3,194	2,320	1,838	2,197	,873	-,360	,546	1,283
22,8	24,4	22,2	23,5	22,7	26,0	20,7	22,93	-1,655	-1,231	-3,305	-2,185	-,424	-1,120	1,342	2,173
21,5	26,5	22,2	26,7	22,3	22,4	23,4	23,25	-4,998	-4,552	-,153	,134	-,446	-,287	1,362	1,220
25,2	22,9	22,1	20,7	21,6	20,7	21,5	20,14	2,231	1,372	,976	1,344	,859	-,368	,551	1,291
26,1	22,8	24,5	21,5	24,5	21,7	24,6	21,92	3,334	2,964	2,764	2,661	,370	,103	,774	,931
29,5	29,8	30,6	30,7	32,9	30,0	32,1	30,24	-,256	-,075	2,890	1,899	-,181	,991	1,134	,503
24,0	21,6	25,1	23,2	25,4	24,0	24,1	21,93	2,388	1,903	1,417	2,122	,485	-,705	,714	1,630
24,1	22,7	22,8	21,6	23,9	21,9	23,5	21,10	1,406	1,265	2,059	2,432	,141	-,373	,907	1,295
23,6	20,4	24,4	21,1	23,4	20,2	23,1	20,61	3,250	3,248	3,250	2,529	,002	,722	,998	,606
23,2	23,2	23,1	22,6	24,7	28,3	23,2	26,48	-,064	,479	-3,604	-3,315	-,543	-,289	1,457	1,222
23,9	21,1	22,7	22,0	21,7	20,6	21,2	20,36	2,811	,658	1,073	,871	2,153	,202	,225	,869

Graf. 5: Dispersión de los datos de expresión (ΔCt)



- Cambio en la expresión de *SOD2*: El análisis del cambio en la expresión de *SOD2* se realizó mediante una t-Student para muestras relacionadas. Se incluyeron un total de 64 muestras correspondientes a 16 voluntarios.

Los datos descriptivos de la variable dependiente se presentan en la Tabla 9. Tanto la media de cambio como la dispersión del tratamiento Yellow fue menor que la del tratamiento Orange. Con un valor de $p > 0.05$, se determinó que ambas variables tienen una distribución normal de acuerdo a las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilks, por lo que es factible utilizar una prueba paramétrica para analizar si el cambio en la expresión de *SOD2* es significativamente diferente entre tratamientos (Tabla 10).

Tabla 9: Cambio en la expresión de *SOD2* por tratamiento.

Estadísticos de muestras relacionadas					
		Media	N	Desviación tip.	Error típ. de la media
Par 1	Yellow	,88798	16	,348539	,087135
	Orange	1,16887	16	,485551	,121388

Tabla 10: Prueba de normalidad de la variable dependiente.

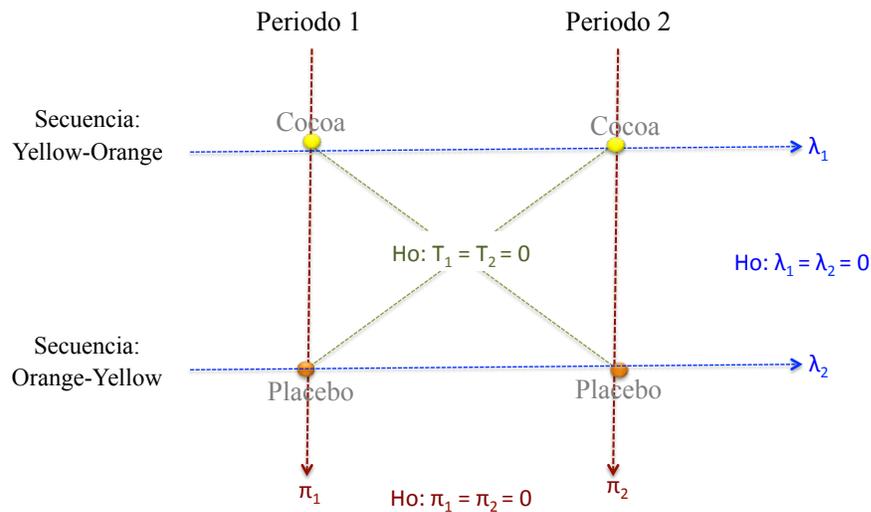
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Yellow	,128	16	,200	,967	16	,789
Orange	,210	16	,057	,910	16	,117

*. Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de la significación de Lilliefors

La confiabilidad de los resultados estadísticos se probó mediante tres hipótesis: el efecto que tuvo la secuencia del consumo de los tratamientos ($H_0: \lambda_1 = \lambda_2 = 0$); el efecto que tuvo el periodo de consumo ($H_0: \pi_1 = \pi_2 = 0$); y el efecto que tuvo el consumo del tratamiento sobre el cambio en la expresión de *SOD2* ($H_0: T_1 = T_2 = 0$) (Fig. 8).

Fig. 8: Hipótesis principales a contrastar.



Para probar si la secuencia de consumo influyó en los resultados del estudio (efecto de acarreo), se utilizó una prueba t-Student para muestras independientes, y se estratificó por secuencia de consumo. Con valores de $p > 0.05$ se concluye que el orden en el que

se consumieron los tratamientos no es una variable que afecte los resultados del estudio, no existe un efecto de acarreo. Los resultados del análisis se observan en la tabla 11.

Tabla 11: Efecto de la secuencia de consumo de los tratamientos, sobre la expresión del gen *SOD2* ($H_0: \lambda_1 = \lambda_2 = 0$).

Prueba de muestras independientes										
		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas				Prueba T para la igualdad de medias			95% Intervalo de confianza para la diferencia	
		F	Sig.	t	ql	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error tip. de la diferencia	Inferior	Superior
Yellow	Se han asumido varianzas iguales	,195	,666	-,047	14	,963	-,008468	,180372	-,395327	,378392
	No se han asumido varianzas iguales			-,047	13,305	,963	-,008468	,180372	-,397232	,380297
Orange	Se han asumido varianzas iguales	3,491	,083	-,107	14	,917	-,026815	,251194	-,565573	,511943
	No se han asumido varianzas iguales			-,107	10,611	,917	-,026815	,251194	-,582174	,528544

El efecto que tuvo el periodo de consumo de los tratamientos, sobre la expresión de *SOD2*, se analizó mediante una prueba t-Student para muestras relacionadas. Con un valor de $p > 0.05$, se concluye que el periodo no influyó significativa en el cambio en la expresión del gen *SOD2*. Los resultados del análisis se observan en la tabla 12.

Tabla 12: Efecto del periodo de consumo de los tratamientos, sobre el cambio en la expresión del gen *SOD2* ($H_0: \pi_1 = \pi_2 = 0$).

Prueba de muestras relacionadas										
		Diferencias relacionadas		95% Intervalo de confianza para la diferencia						
		Media	Desviación tip.	Error tip. de la media	Inferior	Superior	t	ql	Sig. (bilateral)	
Par 1	Periodo1 - Periodo2	,009174	,601899	,150475	-,311556	,329903	,061	15	,952	

Dado que no hubo un efecto significativo de la secuencia de consumo, ni del periodo, se prosiguió a evaluar si el cambio en la expresión de *SOD2* fue estadísticamente diferente entre tratamientos. Con valor de $p = 0.05$, se sugiere que el cambio en la expresión del gen mitocondrial *SOD2* fue significativamente diferente entre tratamientos. Los resultados con respecto a estas observaciones no son concluyentes aún, dado que el

rango de valores del intervalo de confianza al 95% cruza la unidad. Los resultados de la prueba de hipótesis se observan en la tabla 13.

Tabla 13: Efecto del tratamientos, sobre el cambio en la expresión del gen *SOD2* ($H_0: T_1 = T_2 = 0$).

Prueba de muestras relacionadas									
		Diferencias relacionadas							
				Error tip. de la		95% Intervalo de confianza para la			
		Media	Desviación tip.	media	Inferior	Superior	t	ql	Sig. (bilateral)
Par 1	Orange - Yellow	,280891	,527458	,131865	-,000172	,561954	2,130	15	,050

IX. DISCUSIÓN

Los resultados del estudio sugieren que el consumo agudo de flavanoles de la cocoa es capaz de modular la expresión de *SOD2*, probablemente a través del cambio en la capacidad antioxidante en plasma. En nuestro conocimiento, este es el primer estudio que analiza el efecto del consumo de un concentrado de cocoa sobre la expresión de genes, *in vivo*. Estos hallazgos son de particular relevancia, dado que la evidencia del efecto molecular de los flavanoles proviene de estudios *in vitro*, empleando polifenoles o (-)-epicatequina de la cocoa en su forma aglicón como estimulante, y a concentraciones que superan las fisiológicas. Se sabe que los flavanoles son continuamente conjugados en el tracto gastrointestinal, y que los metabolitos que llegan a plasma no son los encontrados en los alimentos (aglicón), por lo que las observaciones de estudios *in vitro*, aunque valiosas, no reflejan el efecto fisiológico *in vivo*.

La capacidad que tienen ciertos componentes de la alimentación de influenciar la expresión de genes es un tema de actual investigación, que se sustenta en la heterogeneidad de los resultados obtenidos tanto en estudios poblacionales, como en estudios experimentales. Las investigaciones circundantes al consumo de polifenoles no son la excepción. Queda claro sin embargo, que los grupos poblacionales que se distinguen por tener un elevado consumo de alimentos ricos en polifenoles, presentan beneficios a la salud en términos de menor incidencia de enfermedades cardiovasculares y probablemente cáncer. Los mecanismos moleculares que explican estos acontecimientos aún no están claramente definidos, lo que dificulta el entendimiento de su función en el organismo y el alcance de sus beneficios.

Hablar de polifenoles implica a una amplia familia de fitoquímicos con características muy diferentes. En este estudio nos enfocamos en analizar el efecto de los flavonoides catequina, epicatequina y procianidinas que tiene la cocoa. La cocoa se obtiene a partir de la fracción no grasa del cacao, que es en donde se encuentran los flavanoles. El chocolate es

la combinación de sólidos cocoa y manteca de cacao. El contenido de polifenoles de la cocoa puede variar dependiendo de los métodos industriales utilizados en su obtención, un grano que no fue fermentado, no se tostó y fue sometido a un proceso de blanqueado, tiene hasta cuatro veces más polifenoles que los granos tratados con otros métodos.

Existen diferentes vehículos a través de los cuales se puede estudiar el efecto de la ingestión de los flavonoides del cacao en un organismo. En la literatura, los más empleados son barras de chocolate, bebidas de cocoa, y en menor cantidad, concentrados administrados en forma de cápsulas. Cada una vehículo presenta pros y contras.

- Barras de chocolate. Dentro de los beneficios de utilizar barras de chocolate se encuentra su fácil aceptación, su disponibilidad y variedad. Es una de las formas en que más se consume cacao y por esto la más usada en como vehículo de administración. Sin embargo, las barras de chocolate son muy heterogéneas en cuanto a su composición, varían de acuerdo al país de origen, el tratamiento industrial al que fue sometido, los métodos de fabricación y el contenido de sólidos de cocoa. Su consumo conlleva una ingestión considerable de lípidos y azúcares, que tienen efectos negativos a la salud, y que modifican la expresión de genes por efecto de la respuesta postprandial, lo que puede confundir los resultados del estudio. Por la facilidad con la que se discrimina entre chocolate oscuro (alto contenido en cocoa) y chocolate con leche, es difícil realizar ensayos comparativos cegados. En la literatura, los rangos de administración del chocolate son amplios, varían de los 27 g/día a los 80 g/día, con una media de consumo de 40g/día (Wang, 2000; Rein, 2000; Schramm, 2001; Flammer, 2007; Williams, 2009).
- Bebidas de cocoa. Presentan la misma heterogeneidad de contenido que las barras de chocolate. El polvo de cocoa alto en flavonoides es poco disponible, lo que la población generalmente consume son polvos sabor cocoa, cuyo contenido de azúcar es muy elevado. El principal diluyente de estas bebidas es la leche, lo que ha

cuestionado su uso dado que las proteínas de la leche se proponen como obstaculizadores en el proceso de absorción intestinal de los flavonoides. Los resultados al respecto son contradictorios. Como alternativa, se ha empleado agua en lugar de leche como diluyente, esto cambia la textura, el sabor y por lo tanto la aceptabilidad de la bebida. El contenido de flavonoides administrados en estudios que usan bebidas de cocoa como vehículo de administración, oscila entre los 215 mg/día y los 800 mg/día (Heiss, 2005; Rein, 2000).

- Los concentrado de cocoa. Dado que se administran en forma de cápsulas, es posible controlar un mayor número de variables potencialmente confusoras. Su uso permite la realización de diseños metodológicos cegados con grupo control, lo cual aumenta la validez y confiabilidad de los resultados al eliminar la interacción con otros componentes del producto de estudio. Los concentrados de cocoa generalmente no tienen lípidos y carbohidratos que confundan los resultados del estudio. Los artículos que utilizan concentrados de cocoa como vehículo de administración son la minoría, por lo que se tienen menos fuentes bibliográficas para compara los resultados obtenidos.

En este estudio, el vehículo seleccionado para administrar los flavonoides de cocoa fue tema de controversia que requirió de varias pruebas. La primera fue utilizar barras de chocolate, sin embargo, las dificultades antes mencionadas y la necesidad de realizar un análisis bromatológico para conocer de la cantidad de flavonoides que aportaban, condujo a buscar una segunda opción. Se consideró entonces buscar un polvo de cocoa alto en polifenoles, y comparar el efecto contra un polvo sabor cocoa. La información más cercana al contenido de polifenoles fue la estipulada con base a la denominación genérica del producto (NOM-186). El mayor contraste se logró entre el chocolate para mesa amargo (18 % m/m de cocoa desgrasada totalmente) y las bebidas de chocolate en polvo (1.8 % m/m de cocoa desgrasada totalmente). Se realizó un piloto para analizar la aceptación del producto, factibilidad de uso y detección de variables potencialmente confusoras. Se diluyeron 30g de

producto en 200 ml de agua. La presencia de agua dificultó que las bebidas se diluyan adecuadamente, especialmente la de chocolate para mesa amargo, ya que contenía partes grasas. Se intentó cegar el estudio pero el 100% de los voluntarios detectó cual de las dos bebidas tenía alto y bajo contenido en polifenoles. La aceptabilidad no fue la esperada y la variación entre preparaciones fue alta. Se declinó por lo tanto el uso de bebida de cocoa como vehículo de administración.

Por último, se examinó la posibilidad de emplear un concentrado de cocoa y se identificó CocoaPure 45%. Éste es un producto cuyo proceso de elaboración y composición bromatológica fue publicado en el Journal of Agricultural and Food Chemistry en el año 2007. CocoaPure 45% es elaborada por NaturexTM y se comercializa en diversas partes del mundo, no así en México. La compañía manufacturadora proporcionó tanto el concentrado de cocoa, como el placebo compuesto básicamente de maltodextrinas. Por su factibilidad, control y calidad, se decidió utilizar este producto como vehículo de administración. El concentrado y el placebo fueron encapsulados, cegados y aleatorizados en el Departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la UNAM. La dosis de producto administrado se determinó con base en la literatura, en donde se señala que los mayores beneficios a corto plazo se obtienen al consumir mínimo 500 mg/día de flavonoides, y/o > 50 mg/día de epicatequina (Shrime *et al.*, 2011). La dosis de concentrado administrada en el estudio cumple con ambas recomendaciones.

El objetivo principal de este experimento fue el analizar si el consumo agudo de flavonoides de cocoa modificaba la expresión del gen *SOD2* en CMSP. *SOD2* está involucrado en la defensa mitocondrial en contra de ROS, y es sensible a cambios en el estado redox del organismo. La expresión de *SOD2* se altera en presencia de enfermedades como el cáncer, en estados proinflamatorios, en personas que tienen un alto consumo de tabaco, etc. Componentes de la alimentación como los flavonoides y los folatos se han propuesto como probables reguladores de la expresión de *SOD2*.

Para probar las hipótesis del estudio, se utilizó un diseño experimental cruzado, aleatorizado, cegado con grupo control. En este diseño, cada individuo funge como control de sí mismo y algunas de las variables potencialmente confusoras, como es el fondo genético y la edad, quedan controladas.

Para estimar la muestra de estudio se propuso la fórmula para ensayos clínicos cruzados 2X2. Sin embargo, esta fórmula requiere datos conocidos como la varianza por tratamiento y el tamaño del efecto observado que no se pudieron integrar. Como alternativa, se eligió la fórmula de dos proporciones de Hulley (Hulley, 2001).

Una vez firmado el consentimiento informado, cada voluntario debía de asistir en dos ocasiones a los sitios de captura. Existieron diferentes factores que dificultaron el reclutamiento y seguimiento de los voluntarios, por ejemplo:

- Población “aparentemente sana”. La promoción del estudio se realizó mediante trípticos, posters, invitación por correo electrónico y en la revista de la UIA. Se tuvo muy buena respuesta al inicio del estudio, sin embargo, un elevado porcentaje de las personas que manifestaban interés en participar eran individuos que actualmente tenían algún padecimiento, que estaban bajo esquema de suplementación o que pasaban fuera del rango de edad establecido. Esto denota que las personas que mayor interés tienen en cuestiones de salud, son aquellas que están diagnosticadas como enfermas, personas mayores de 40 años, o que por experiencia están más sensibilizadas a la importancia del consumo de componentes de la alimentación que otorgan beneficios “extras” a la salud. La población menor de 24 años que mayor participación tuvo, fueron estudiantes de ciencias de la salud, específicamente estudiantes de nutrición.

- Fumadores vs no fumadores. Durante el diseño del estudio se consideró estudiar el efecto que el consumo de polifenoles de la cocoa tendría en la expresión de *SOD2* en fumadores vs no fumadores. Basados en la literatura, se estableció la hipótesis de un mayor cambio en el grupo de fumadores. Desafortunadamente, el número de voluntarios que cumplieron con el criterio de fumador establecido en el protocolo fue muy reducido, se optó por eliminar esta variable del estudio ya no era factible realizar comparaciones entre grupos con un tamaño de muestra tan pequeño.
- Consumo de chocolate, cocoa, té verde, café y vino tinto. Dado que estos alimentos se caracterizan por su elevado contenido de polifenoles, en la mayoría de los estudios en humanos se controla su consumo de 24 horas previas a la toma de muestra. Este periodo ha mostrado ser suficiente dado que los polifenoles de la cocoa, catequina y epicatequina, tienen una vida media en plasma sumamente corta, su pico máximo de concentración plasmática se localiza a las dos horas del consumo, y de acuerdo a los resultados de estudios experimentales, a las seis horas posteriores las concentraciones en plasma son prácticamente basales. En este estudio se siguió la misma mecánica concerniente a la ingesta de chocolate, cocoa, té verde y vino tinto. Sin embargo, y aunque no directamente, más del 30% de los voluntarios consumieron de manera indirecta estos productos, las formas más comunes de consumo fueron tés fríos, helados, panecillos y galletas. De ser necesario y si el voluntario estaba de acuerdo, la toma de muestra se reprogramaba para el siguiente día. No todos los voluntarios estuvieron de acuerdo en regresar.
- Toma de muestra. Para ser considerado caso completo, a cada voluntario se le debía de extraer sangre en cuatro ocasiones; dos basales y dos posteriores al consumo del suplemento. Ya fuera por razones personales como el estrés o el calibre de las venas, o por factores ambientales como el frío, hubo ocasiones en donde la sangre dejaba de fluir a mitad de la extracción. Si el voluntario se mostraba renuente a seguir participando, la extracción de sangre se interrumpía. Dado que las comparaciones de cambio en la expresión se hacen entre muestras tomadas el

mismo día, interrumpir la extracción significaba perder la muestra y tener que agendar otra cita para repetir todo el procedimiento, a lo que no todos los voluntarios estuvieron de acuerdo.

- Separación de CMSP en laboratorio. La extracción de CMSP con ficoll es un método bien establecido, con buenos resultados, pero que consume bastante tiempo, lo cual es inconveniente para la obtención de ARN de buena calidad. Con la finalidad de hacer más eficiente la duración del manejo de muestras en laboratorio, se emplearon tubos CPT. Los tubos CPT contienen un medio de separación celular conformado por un gel de poliéster y un líquido de gradiente de densidad, lo cual permite la separación de CMSP en una sola centrifugación. Desafortunadamente, estos tubos son caros y están hechos de cristal, lo cual dificulta su manipulación. Cualquier variación en la temperatura del tubo (enfriamiento), en la centrifugación, o choque entre ellos, puede ser factor de ruptura y pérdida de la muestra. Al igual que con la extracción de sangre, la ruptura del tubo significa la pérdida de la muestra.
- Extracción y manejo de ARN: El ARN se obtuvo a partir de las CMSP. La extracción y manejo del ARN es un proceso sumamente delicado por su fácil degradación. Todo el método debe realizarse en frío y en condiciones de extrema limpieza. La contaminación con ribonucleasas (RNasas), presentes en prácticamente todo el cuerpo, degrada la muestra y la imposibilita para llevar a cabo análisis de expresión. En este estudio, la extracción de ARN se hizo mediante el método de TRIzol, que es un producto tóxico y corrosivo preparado a base de fenol y tiocianato de guanidina. En los pasos finales de la extracción, el ARN se lava y se precipita formando un diminuto pellet que muchas veces es imperceptible a la vista. Esto provoca que por error, el pellet se llegue a desechar junto con el resto de los solventes y haya pérdida total de la muestra.

De los 25 voluntarios que se reclutaron al inicio del estudio, únicamente 16 fueron considerados casos completos, esto equivale al análisis de 64 muestras biológicas. El resto de los voluntarios no fueron incluidos por alguna de las siguientes razones: abandono del estudio, incidencia en criterios de eliminación o problemas con la extracción, separación y manejo de las muestras en laboratorio. Al término del estudio las pérdidas observadas rebasaron el porcentaje de pérdidas estimadas por lo que no se pudo lograr el tamaño de muestra estimado.

Dentro de los participantes, se tuvo una mayor respuesta del sexo femenino. Los resultados de variables descriptivas estuvieron dentro de los rangos de normalidad y los resultados concuerdan con lo encontrado por otros autores.

Una de las principales inquietudes del diseño cruzado, está en relación al efecto de acarreo. Es decir, la posibilidad de que el consumo del primer suplemento afecte la respuesta del segundo. Para controlar este sesgo se plantea un periodo de blanqueamiento entre los dos suplementos. La duración del periodo debe de ser suficiente como para asegurar que al momento de consumir el segundo suplemento, el primero ya no esté ejerciendo ningún efecto fisiológico. El periodo transcurrido entre la toma de los suplementos se debe establecer con base en la literatura, tomando en cuenta el fenómeno de estudio, para asegurar que no habrá interacción entre tratamientos.

En este proyecto, el periodo de blanqueamiento establecido fue de 7 +/-3 días, que concuerda con lo estipulado por estudios similares (Hermman *et al.*, 2006; Flammer *et al.*, 2007; Fiel *et al.*, 2011). El análisis del cambio en la variable dependiente por secuencia en el consumo de tratamientos, no fue estadísticamente significativa, por lo se concluye que no hay un efecto de acarreo. El análisis del efecto del periodo tampoco fue estadísticamente diferente.

La hipótesis principal del estudio se probó mediante una prueba t-student para muestras relacionadas. La dificultad de utilizar esta prueba reside en que la falta de un solo dato excluye del análisis el caso completo. Con un valor de $p = 0.05$ se asume que el cambio en la expresión de *SOD2* fue estadísticamente diferente entre tratamientos, sin embargo, el intervalo de confianza cruza la unidad, por lo que los resultados no son concluyentes. Es importante señalar, que la magnitud del efecto alcanzada supera el 50%, por lo tanto, aunque no se alcanzó el tamaño de muestra calculado, el impacto clínico es muy considerable. El lograr el tamaño de muestra propuesto al inicio del estudio ayudará a cimentar diferencias más específicas en cuanto al cambio en la variable dependiente, empero, los resultados obtenidos marcan una tendencia en cuanto al efecto que tienen componentes específicos de la alimentación sobre el cambio agudo en la expresión de genes.

Uno de los mecanismos propuestos para explicar este efecto, es la metilación o inhibición de la metilación de citosinas en puntos específicos de la cadena de ADN. Se ha observado en estudios *in vitro* que los polifenoles catequina y epicatequina son capaces de lograr este efecto por dos vías. Referencia La primera de ellas es una respuesta secundaria al propio aumento de la capacidad antioxidante en plasma, lo que activa diferentes vías de señalización asociadas al mantenimiento del estado redox del organismo, en donde el gen *SOD2* tiene una participación central. La segunda hipótesis se refiere a la capacidad que tiene los polifenoles catequina y epicatequina de interactuar con la enzima ADN-metiltransferasa (DNMT por sus siglas en inglés) y metilarse. De esta manera funcionan como competidores por el grupo metil y disminuyen el sustrato disponible para la metilación de la cadena de ADN, lo que aumentaría la expresión basal del gen. La problemática de transpolar los resultados obtenidos en estudios *in vitro* a lo que sucede en el humano, radica en que las líneas celulares son estimuladas directamente con aislados de catequina o epicatequina, o con concentrados de polifenoles; en el humano no todos los polifenoles atraviesan la barrera gastrointestinal y logran llegar al torrente sanguíneo, muchos de ellos se quedan en el intestino, por lo tanto, la magnitud del efecto no es la misma. Además, en el humano los polifenoles sufren diversos procesos de conjugación como la metilación y la

glucoronización, no se sabe con certeza hasta que grado estas conjugaciones modifican la biodisponibilidad y efecto de los polifenoles. Es necesario realizar investigaciones más ambiciosas y bien orientadas *in vivo*, que involucren desde la parte mecanística, como el efecto en variables fisiológicas.

X. BIBLIOGRAFÍA

Actis-Goretta L, Lévêques A, Giuffrida F, Romanov-Michailidis F, Viton F, Barron D, Duenas-Paton M, Gonzalez-Manzano S, Santos-Buelga C, Williamson G, Dionisi F. (2012). Elucidation of (-)-epicatechin metabolites after ingestion of chocolate by healthy humans. *Free Radic Biol Med.* 53,787-95

Arts,I.C., van De,P.B., and Hollman,P.C. (2000). Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 2. Tea, wine, fruit juices, and chocolate milk. *J. Agric. Food Chem.* 48,1752-1757.

Bayard V, Chamorro F, Motta J, Hollenberg NK. (2007). Does flavanol intake influence mortality from nitric oxide-dependent processes? Ischemic heart disease, stroke, diabetes mellitus, and cancer in Panama. *Int J Med Sci.* 4,53–58.

Beekmann K, Actis-Goretta L, van Bladeren PJ, Dionisi F, Destaillets F, Rietjens IM. (2012). A state-of-the-art overview of the effect of metabolic conjugation on the biological activity of flavonoids. *Food Funct.* 3,1008-18

Belinsky,S.A., Liechty,K.C., Gentry,F.D., Wolf,H.J., Rogers,J., Vu,K., Haney,J., Kennedy,T.C., Hirsch,F.R., Miller,Y., Franklin,W.A., Herman,J.G., Baylin,S.B., Bunn,P.A., and Byers,T. (2006). Promoter hypermethylation of multiple genes in sputum precedes lung cancer incidence in a high-risk cohort. *Cancer Res.* 66,3338-3344.

Belscak-Cvitanovic,A., Benkovic,M., Komes,D., Bauman,I., Horzic,D., Dujmic,F., and Matijasec,M. (2010). Physical properties and bioactive constituents of powdered mixtures and drinks prepared with cocoa and various sweeteners. *J. Agric. Food Chem.* 58, 7187-7195.

Bravo,L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev* 56, 317-333.

Buijsse B, Feskens EJ, Kok FJ, Kromhout D. (2006). Cocoa intake, blood pressure, and cardiovascular mortality: the Zutphen Elderly Study. *Arch Intern Med.* 166,411– 417.

Buijsse B, Weikert C, Drogan D, Bergmann M, and Boeing H. (2010). Chocolate consumption in relation to blood pressure and risk of cardiovascular disease in German adults. *Eur Heart J.* 31,1616–1623.

Coe SD,C.M. (1996). *The True History of Chocolate.* (London, UK).

D'Archivio M, Santangelo C, Scazzocchio B, Vari R, Filesi C, Masella R, Giovannini C. (2008). Modulatory Effects of Polyphenols on Apoptosis Induction: Relevance for Cancer Prevention. *Int J Mol Sci.* 9,213–228.

Day,J.K., Bauer,A.M., DesBordes,C., Zhuang,Y., Kim,B.E., Newton,L.G., Nehra,V., Forsee,K.M., MacDonald,R.S., Besch-Williford,C., Huang,T.H., and Lubahn,D.B. (2002). Genistein alters methylation patterns in mice. *J. Nutr.* 132,2419S-2423S.

Dillinger,T.L., Barriga,P., Escarcega,S., Jimenez,M., Salazar,L.D., and Grivetti,L.E. (2000). Food of the gods: cure for humanity? A cultural history of the medicinal and ritual use of chocolate. *J. Nutr.* 130, 2057S-2072S.

DiSilvestre D, Kleeberger SR, Johns J, Levitt RC. (1995). Structure and DNA sequence of the mouse MnSOD gene. *Mamm Genome.* 6,281–284.

Djoussé L, Hopkins PN, North KE, Pankow JS, Arnett DK, Ellison RC.(2011). Chocolate consumption is inversely associated with prevalent coronary heart disease: the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study. *Clin Nutr.* 30,182-7

di Giuseppe R, Di Castelnuovo A, Centritto F, Zito F, De Curtis A, Costanzo S, Vohnout B, Sieri S, Krogh V, Donati MB, de Gaetano G, and Iacoviello L. (2008). Regular consumption of dark chocolate is associated with low serum concentrations of C-reactive protein in a healthy Italian population. *J Nutr.* 138, 1939–1945.

Domain, Janice S. (2000). Molecular epidemiology: The impact of molecular biology in epidemiology research. *Rev Med Chile.* 11, 128.

Fang,M., Chen,D., and Yang,C.S. (2007). Dietary polyphenols may affect DNA methylation. *J Nutr.* 137, 223S-228S.

Fang,M.Z., Wang,Y., Ai,N., Hou,Z., Sun,Y., Lu,H., Welsh,W., and Yang,C.S. (2003). Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines. *Cancer Res.* 63, 7563-7570.

Feil,R. (2006). Environmental and nutritional effects on the epigenetic regulation of genes. *Mutat Res.* 600, 46-57.

Feig DI, Reid TM, Loeb LA. (1994). Reactive Oxygen Species in Tumorigenesis. *Cancer Research.* 54, 890-918.

Flammer,A.J., Hermann,F., Sudano,I., Spieker,L., Hermann,M., Cooper,K.A., Serafini,M., Luscher,T.F., Ruschitzka,F., Noll,G., and Corti,R. (2007). Dark chocolate improves coronary vasomotion and reduces platelet reactivity. *Circulation* 116, 2376-2382.

Floriano-Sánchez E,C.-R.N.C.-M.M.F.-T.J.T.-S.J. (2010). Expresión génica de Mn-superóxido dismutasa (Mn-SOD) en tejidos con cáncer de próstata e hiperplasia prostática benigna. *Rev Mex Urol.* 70, 184-191.

Fogliano V, Corollaro ML, Vitaglione P, Napolitano A, Ferracane R, Travaglia F, Arlorio M, Costabile A, Klinder A, Gibson G. (2011). In vitro bioaccessibility and gut biotransformation of polyphenols present in the water-insoluble cocoa fraction. *Mol Nutr Food Res.* 55, S44-55.

Gewaltig MT and Kojda G. (2002). Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. *Cardiovasc Res.* 55, 250–260.

Guarrera,S., Sacerdote,C., Fiorini,L., Marsala,R., Polidoro,S., Gamberini,S., Saletta,F., Malaveille,C., Talaska,G., Vineis,P., and Matullo,G. (2007). Expression of DNA repair and metabolic genes in response to a flavonoid-rich diet. *Br J Nutr.* 98, 525-533.

Heptinstall, S., May, J., Fox, S., Kwik-Urbe, C. and Zhao, L. (2006). Co- cocoa flavanols and platelet and leukocyte function: recent in vitro and ex vivo studies in healthy adults. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 47, S197-S205.

Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. (1993). Dietary

antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*. 342, 1007–1011.

Hitchler MJ, Wikainapakul K, Yu L, Powers K, Attatippaholkun W, Domann FE. (2006). Epigenetic regulation of manganese superoxide dismutase expression in human breast cancer cells. *Epigenetics*. 1, 163–171.

Hitchler MJ, Oberley LW, Domann FE. (2008). Epigenetic silencing of *SOD2* by histone modifications in human breast cancer cells. *Free Radic Biol Med*. 45, 1573–158

Ho YS, Howard AJ, Crapo JD. (1991). Molecular structure of a functional rat gene for manganese-containing superoxide dismutase. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 4:278–286.

Hollenberg NK, Martinez G, McCullough M, Meinking T, Passan D, Preston M, Rivera A, Taplin D, and Vicaria-Clement M. (1997). Aging, acculturation, salt intake, and hypertension in the Kuna of Panama. *Hypertension*. 29, 171–176.

Huang CY, Fujimura M, Chang YY, Chan PH. (2001). Overexpression of copper-zinc superoxide dismutase attenuates acute activation of activator protein-1 after transient focal cerebral ischemia in mice. *Stroke*. 32, 741–747.

Hulley S.B. (2001). “Designing clinical research an epidemiologic approach” Ed. Lippincott Williams & Wilkins.

Hurt EM, Thomas SB, Peng B, Farrar WL. (2007). Molecular consequences of *SOD2* expression in epigenetically silenced pancreatic carcinoma cell lines. *Br J Cancer*. 97, 1116–112.

Janszky I, Mukamal KJ, Ljung R, Ahnve S, Ahlbom A, and Hallqvist J. (2009). Chocolate consumption and mortality following a first acute myocardial infarction: the Stockholm Heart Epidemiology Program. *J Intern Med*. 266, 248–257.

Janssen-Heininger Y, Ckless K, Reynaert N, van der Vliet A. (2005). SOD inactivation in asthma: bad or no news? *Am J Pathol*. 166, 649-52.

Johanning,G.L., Heimburger,D.C., and Piyathilake,C.J. (2002). DNA methylation and diet in cancer. *J Nutr.* 132, 3814S-3818S.

Jones PL, Kucera G, Gordon H, Boss JM. (1995). Cloning and characterization of the murine manganous superoxide dismutase-encoding gene. *Gene.* 153, 155–161.

Joshiyura KJ, Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, Rimm EB, Speizer FE, Colditz G, Ascherio A, Rosner B, Spiegelman D, Willett WC. (2011). The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease. *Ann Intern Med.* 134, 1106–1114.

Katz D, Doughty K, Ali A. (2011). Cocoa and Chocolate in Human health and Disease. *Antioxid. Redox Signal.* 15, 2779–2811.

Keen,C.L., Holt,R.R., Oteiza,P.I., Fraga,C.G., and Schmitz,H.H. (2005). Cocoa antioxidants and cardiovascular health. *Am J Clin Nutr.* 81, 298S-303S.

Kinnula VL, Crapo JD. (2004). Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. *Free Radic Biol Med.* 36, 718–744.

Kroon PA, Clifford MN, Crozier A, Day AJ, Donovan JL, Manach C, Williamson G. (2004). How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *Am J Clin Nutr.* 80, 15-21.

Lambert JD, Hong J, Yang GY, Liao J, Yang CS. (2005). Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. *Am J Clin Nutr.* 81(1):284S-291S.

Lee,M.J., Maliakal,P., Chen,L., Meng,X., Bondoc,F.Y., Prabhu,S., Lambert,G., Mohr,S., and Yang,C.S. (2002). Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 11, 1025-1032.

Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, Cartwright J Jr, Dionne L, Lu N, Huang S, Matzuk MM. (1996). Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase- deficient mice. *Proc Natl Acad Sci.* 93:9782–9787

Li H and Forstermann U. (2009). Prevention of atherosclerosis by interference with the vascular nitric oxide system. *Curr Pharm Des.* 15: 3133–3145.

Li M, Chiu JF, Mossman BT, Fukagawa NK. (2006). Down-regulation of manganese-superoxide dismutase through phosphorylation of FOXO3a by Akt in explanted vascular smooth muscle cells from old rats. *J Biol Chem.* 281:40429–40439

Link,A., Balaguer,F., and Goel,A. (2010). Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: promising role for epigenetics. *Biochem. Pharmacol.* 80, 1771-1792.

Loo, G. (2003). Redox-sensitive mechanisms of phytochemical-mediated inhibition of cancer cell proliferation (review). *J Nutr Biochem.* 14, 64-73.

Manach,C., Scalbert,A., Morand,C., Remesy,C., and Jimenez,L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin. Nutr.* 79, 727-747.

Manach,C., Williamson,G., Morand,C., Scalbert,A., and Remesy,C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr.* 81, 230S-242S.

Mao,T., Van de Water,J., Keen,C.L., Schmitz,H.H., and Gershwin,M.E. (2000). Cocoa procyanidins and human cytokine transcription and secretion. *J Nutr.* 130, 2093S-2099S.

Mao TK, van de Water J, Keen CL, Schmitz HH, Gershwin ME. (2002). Modulation of TNF-alpha secretion in peripheral blood mononuclear cells by cocoa flavanols and procyanidins. *Dev Immunol.* 9, 135–41.

Mao TK, Van de Water J, Keen CL, Schmitz HH, Gershwin ME. (2002). Effect of cocoa flavanols and their related oligomers on the secretion of interleukin-5 in peripheral blood mononuclear cells. *J Med Food.* 5, 17–22.

Martin, K. R. (2006). Targeting apoptosis with dietary bioactive agents. *Exp Biol Med (Maywood).* 231, 117-29.

Maskarinec G. (2009). Cancer protective properties of cocoa: a review of the epidemiologic evidence. *Nutr Cancer*. 61, 573-9.

Meng,X., Lee,M.J., Li,C., Sheng,S., Zhu,N., Sang,S., Ho,C.T., and Yang,C.S. (2001). Formation and identification of 4'-O-methyl(-)-epigallocatechin in humans. *Drug Metab Dispos*. 29, 789-793.

Meyrick B, Magnuson MA. (1994). Identification and functional characterization of the bovine manganese superoxide dismutase promoter. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 10, 113–121.

McCullough ML, Chevaux K, Jackson L, Preston M, Martinez G, Schmitz HH, Coletti C, Campos H, Hollenberg NK. (2006). Hypertension, the Kuna, and the epidemiology of flavanols. *J Cardiovasc Pharmacol*. 47, S103-9.

Miao L, St Clair D. (2009). Regulation of Superoxide Dismutase Genes: Implications in Diseases. *Free Radic Biol Med*. 47, 344–356.

Mikhak B, Hunter DJ, Spiegelman D, Platz EA, Wu K, Erdman JW Jr, Giovannucci E. (2008). Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD) Gene Polymorphism, Interactions with Carotenoid Levels, and Prostate Cancer Risk. *Carcinogenesis*.

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. La alimentación en España 2002. 2002. Madrid, España.

Mostofsky E, Levitan EB, Wolk A, and Mittleman MA. (2010). Chocolate intake and incidence of heart failure: a population-based, prospective study of middle-aged and elderly women. *Circ Heart Fail*. 3, 612–616.

National Center for Biotechnology Information. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK45788/>.

Noe,V., Penuelas,S., Lamuela-Raventos,R.M., Permanyer,J., Ciudad,C.J., and Izquierdo-Pulido,M. (2004). Epicatechin and a cocoa polyphenolic extract modulate gene expression in human Caco-2 cells. *J Nutr*. 134, 2509-2516.

Nogueira Lde P, Knibel MP, Torres MR, Nogueira Neto JF, Sanjuliani AF. (2012). Consumption of high-polyphenol dark chocolate improves endothelial function in individuals with stage 1 hypertension and excess body weight. *Int J Hypertens*.

Oba S, Nagata C, Nakamura K, Fujii K, Kawachi T, Takatsuka N, and Shimizu H. (2010). Consumption of coffee, green tea, oolong tea, black tea, chocolate snacks and the caffeine content in relation to risk of diabetes in Japanese men and women. *Br J Nutr*. 103, 453–459.

Oberley LW, Buettner GR. (1979). Role of superoxide dismutase in cancer: a review. *Cancer Res*. 39, 1141–1149.

Rein D, Lotito S, Holr RR, Deen CL, Schmitz HH, and Fraga CG. (2000). Epicatechin in Human Plasma: In Vivo Determination and Effect of Chocolate consumption on Plasma Oxidation Status. *J Nutr*. 130, 2109S-2114S.

Schewe T, Kühn H, Sies H. (2002). Flavonoids of cocoa inhibit recombinant human 5-lipoxygenase. *J Nutr*. 132, 1825–9.

Schewe T, Steffen Y, and Sies H. (2008). How do dietary flavanols improve vascular function? A position paper. *Arch Biochem Biophys*. 476: 102–106. Schinella G, Mosca S, Cienfuegos-Jovellanos E., et al. (2010). Anti-oxidant properties of polyphenol-rich cocoa products industrially processed. *Food Research International*. 43, 1614–1623.

Schramm DD, Wang JF, Holt RR, Ensunsa JL, Gonsalves JL, Lazarus SA, Schmitz HH, German BJ, y Keen CL. (2001). Chocolate procyanidins decrease the leukotriene-prostacyclin ratio in humans and human aortic endothelial cells. *Am J Clin Nutr*. 73, 36–40.

Schuijter M, Sies H, Illek B, Fischer H. (2005). Cocoa-related flavonoids inhibit CFTR-mediated chloride transport across T84 human colon epithelia. *J Nutr*. 135, 2320-5.

Shaldon, S. and Vienken, J. (2009). Salt, the neglected silent killer. *Semin. Dial*. 22, 264-266.

Selmi C, Cocchi CA, Lanfredini M, Keen CL, Gershwin ME. (2008). Chocolate at

heart: the anti-inflammatory impact of cocoa flavanols. *Mol Nutr Food Res.* 52, 1340-8.

Shrime M, Bauer S McDonald A, Chowdhury N, Coltar C, Ding E. (2011). Flavonoid-Rich Cocoa Consumption Affects Multiple Cardiovascular Risk Factors in a Meta-Analysis of Short-Term Studies. *J Nutr.* 141, 1982–1988.

Simopoulos AP, Ordovas, J.M. (2004). World Review of Nutrition and Dietetics. Nutrigenetics and Nutrigenomics. 3er vol. USA.

Steinberg, F.M., Bearden, M.M., and Keen, C.L. (2003). Cocoa and chocolate flavonoids: implications for cardiovascular health. *J Am Diet Assoc.* 103, 215-223.

Stidley, C.A., Picchi, M.A., Leng, S., Willink, R., Crowell, R.E., Flores, K.G., Kang, H., Byers, T., Gilliland, F.D., and Belinsky, S.A. (2010). Multivitamins, folate, and green vegetables protect against gene promoter methylation in the aerodigestive tract of smokers. *Cancer Res.* 70, 568-574.

Strandberg TE, Strandberg AY, Pitkala K, Salomaa VV, Tilvis RS, and Miettinen TA. (2008). Chocolate, well-being and health among elderly men. *Eur J Clin Nutr.* 62, 247–253.

Subbiah, M.T. (2008). Understanding the nutrigenomic definitions and concepts at the food-genome junction. *OMICS.* 12, 229-235.

Taubert D, Roesen R, Schomig E. (2007). Effect of cocoa and tea intake on blood pressure: a meta-analysis. *Arch Intern Med.* 167, 626–34.

Thaler R, E.A.C.B.a.A.G.H. (2010). Interaction of Hereditary and Epigenetic Mechanisms in the Regulation of Gene Expression. In *Epigenetics and Human Health*, Alexander G. Haslberger, ed., pp. 13-34.

Thaler, R., Karlic, H., Rust, P., and Haslberger, A.G. (2009). Epigenetic regulation of human buccal mucosa mitochondrial superoxide dismutase gene expression by diet. *Br J Nutr.* 101, 743-749.

Tokede OA, Gaziano JM, Djoussé L. (2011). Effects of cocoa products/dark chocolate on serum lipids: a meta-analysis. *Eur J Clin Nutr.* 65, 879-86

Tomas-Barberan,F.A., Cienfuegos-Jovellanos,E., Marin,A., Muguerza,B., Gil-Izquierdo,A., Cerda,B., Zafrilla,P., Morillas,J., Mulero,J., Ibarra,A., Pasamar,M.A., Ramon,D., and Espin,J.C. (2007). A new process to develop a cocoa powder with higher flavonoid monomer content and enhanced bioavailability in healthy humans. *J Agric Food Chem.* 55, 3926-3935.

Tzounis X, Rodriguez-Mateos A, Vulevic J, Gibson GR, Kwik-Urbe C, Spencer JP. (2011). Prebiotic evaluation of cocoa-derived flavanols in healthy humans by using a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study. *Am J Clin Nutr.* 93, 62-72

van Amelsvoort,J.M., Van Hof,K.H., Mathot,J.N., Mulder,T.P., Wiersma,A., and Tijburg,L.B. (2001). Plasma concentrations of individual tea catechins after a single oral dose in humans. *Xenobiotica.* 31, 891-901.

van,E.M., Weijnenberg,M.P., Roemen,G.M., Brink,M., de Bruine,A.P., Goldbohm,R.A., van den Brandt,P.A., Baylin,S.B., de Goeij,A.F., and Herman,J.G. (2003). Effects of dietary folate and alcohol intake on promoter methylation in sporadic colorectal cancer: the Netherlands cohort study on diet and cancer. *Cancer Res.* 63, 3133-3137.

Visioli F, Bernaert H, Corti R, Ferri C, Heptinstall S, Molinari E, Poli A, Serafini M, Smit HJ, Vinson JA, Violi F, Paoletti R. (2009). Chocolate, lifestyle, and health. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 49, 299-312.

Schramm DD, Wang JF, Holt RR, Ensunsa JL, Gonsalves JL, Lazarus SA, Schmitz HH German BJ, y Keen CL. (2001). Chocolate procyanidins decrease the leukotriene-prostacyclin ratio in humans and human aortic endothelial cells. *Am J Clin Nutr.* 73, 36-40.

Yang,C.S., Fang,M., Lambert,J.D., Yan,P., and Huang,T.H. (2008). Reversal of hypermethylation and reactivation of genes by dietary polyphenolic compounds. *Nutr Rev* 66, S18-S20.

Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn- SOD (SOD1), Mn-SOD (*SOD2*), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med.* 33, 337–349.

Zhu C, Huang Y, Weydert CJ, Oberley LW, Domann FE. (2001). Constitutive activation of transcription factor AP-2 is associated with decreased MnSOD expression in transformed human lung fibroblasts. *Antioxid Redox Signal.* 3, 387–395.

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxiribonucleico

AF: Actividad física

Ap1: Proteína de activación-1

Ap2: Proteína de activación-2

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

cADN: Ácido desoxirribonucleico complementario

Caja CAAT: Secuencia de **nucleótidos** con el siguiente consenso: 5'-GGNCAATCT-3'.

Caja TATA: Secuencia de nucleótidos del tipo 5'-TATAAA-3' encontrado en las regiones promotoras de genes

CAP: Capacidad antioxidante en plasma

CFTR: Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (Regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística)

Cl: Cloro

CMSP: Células mononucleares de sangre periférica

CpG: Citosina-fosfato-Guanina

CPT: Tubo de Preparación Celular (por sus siglas en inglés)

CT: Colesterol total

Ct: Ciclo de inicio de la transcripción

Cu: Cobre

DNMT: ADN metiltransferasa

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

eNOS: Endothelial nitric oxide synthase (Óxido nítrico sintasa endotelial)

EPCG: Catequina [(-)-epigallocatequina 3-galato

FMD: **flow**-mediated vasodilatation (dilatación vascular mediada por flujo)

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GC: Guanina-citocina

GMPC: Guanosín monofosfato cíclico

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

HC: Hidratos de carbono

HDL: Lipoproteína de alta densidad

HOMA-IR: Homeostasis Model of Assessment - Insulin Resistance (Modelo de evaluación de la homeostasis-Resistencia a la insulina)

HTA: Hipertensión arterial

IL: Interleucina

IMC: Índice de masa corporal

INMEGEN: Instituto Nacional de Medicina Genómica

IPAQ: International Physical Activity Questionnaire
LDL: Lipoproteína de baja densidad
Lip: Lípidos
METs: Metabolic equivalent (equivalente metabólico)
Mn: Manganese
MnSOD: Proteína Superóxido Dismutasa dependiente de manganese
mRNA:
NADPH: Nicotinamina adenina dinucleotido fosfato
NF-κB: Factor nuclear kappa beta
NHLBI: National Health, Lung, Blood Institute
O₂^{·-}: Radical superóxido
NO: Óxido Nítrico
ORAC: Oxygen radical absorbance capacity (Capacidad de absorción de radicales oxígeno)
PA: Presión arterial
Prot: Proteínas
REDOX: Oxido-reducción
RM: Razón de momios
ROS: Sustancias reactivas de oxígeno
RT: Retro-transcripción
RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction (Transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa)
SAH: S-adenosilhomocisteína
SAM: S-adenosilmetionina
SCNG: Sólidos de cocoa no grasos
SNUT: Sistema de evaluación de hábitos nutricionales y consumo de nutrimentos
SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido
SOD: Superóxido Dismutasa
SOD2: Gen Superóxido Dismutasa dependiente de Manganese.
Sp1: Proteína específica-1
TG: Triglicéridos
THF: Tetra-hidrofolato reductasa
Trolox: Análogo hidrosoluble del alfa-tocoferol.
UIA: Universidad Iberoamericana
UV: Ultravioleta
TBARS: Sustancias reactivas al ácido tibarbitúrico
Zn: Zinc

CONSENTIMIENTO INFORMADO

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

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

No. de participante: _____

Nombre del participante: _____

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

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

1. TÍTULO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

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

2. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO DEL ESTUDIO

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

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

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

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

3. PROTOCOLO DE ESTUDIO Y PROCEDIMIENTOS

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

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

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

4. POSIBLES RIESGOS ASOCIADOS

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

5. BENEFICIOS

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

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

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

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

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

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

7. CONFIDENCIALIDAD

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

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

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

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

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

8. ¿A QUIÉN CONTACTAR?

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

Para información relacionada a la investigación, se puede contactar a la investigadora principal del estudio en el INMEGEN, la Dra. María Elizabeth Tejero Barrera en el tel. 53501900 ext. 1145.

9. RESTRICCIONES REGULATORIAS

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

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

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

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

FORMA DE CONSENTIMIENTO

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

Número del estudio: 11.21.NRC

Nombre de la investigadora: Dra. María Elizabeth Tejero Barrera

Institución: INMEGEN, México DF.

Participante

Apellidos: _____

Nombre (s): _____

Fecha de nacimiento: _____

Dirección: _____

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

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

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

Acepto voluntariamente participar en este estudio.

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

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

HISTORIA CLÍNICA

Fecha: _____

Código: _____

DATOS PERSONALES

Nombre: _____
Apellido paterno Apellido materno Nombre (s)

Edad: _____ Sexo M F Fecha de Nacimiento: _____
Días / Mes / Año

Edo. Civil: _____ Escolaridad: _____

Ocupación: _____ Número telefónico: _____

Dirección: _____

E-mail: _____

ANTECEDENTES HEREDOFAMILIARES

Por favor, indique si alguno de sus padres o hermanos han padecido estas enfermedades:

Obesidad _____	Cardiopatías _____	Hipertensión _____	Infarto _____
Diabetes 1 _____	Diabetes 2 _____	Hipercolesterolemia _____	Hipertrigliceridemia _____
Cáncer _____	Alcoholismo _____	Problemas de tiroides _____	
Otro (especificar) _____			

ANTECEDENTES PERSONALES PATOLÓGICOS

Por favor indique si usted ha padecido o padece cualquiera de los siguientes:

Obesidad _____	Cardiopatías _____	Hipertensión _____	Infarto _____
Diabetes 1 _____	Diabetes 2 _____	Hipercolesterolemia _____	Hipertrigliceridemia _____
Cáncer _____	Alcoholismo _____	Problemas de tiroides _____	
Otro (especificar) _____			

PADECIMIENTOS ACTUALES

MEDICAMENTOS EN EL ÚLTIMO MES

MEDICAMENTO	DOSIS	TIEMPO

ALERGIAS O REACCIONES A MEDICAMENTOS

MEDICAMENTO	REACCIÓN

CIRUGÍAS

OPERACIÓN	FECHA

ASPECTOS GINECOLÓGICOS

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

ESTILO DE VIDA

Tabaquismo

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

Fumador ocasional (Número de cigarros): _____
Semana Mes

COMPOSICIÓN CORPORAL Y ANTROPOMETRÍA DEL PACIENTE

Esta sección deberá de ser llenada únicamente por los investigadores.

Fecha: _____

Código del paciente: _____

Antropometría

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

Observaciones: _____

Persona que realizó la evaluación: _____

Recordatorio de 24 horas
PROYECTO: Mecanismos genéticos y epigenéticos asociados a los beneficios de la cocoa

Código de paciente: _____
 Entrevistador: _____

Fecha: _____
 Recordatorio del día: _____

Desayuno	Hora:	Preparación	Equivalente
	Alimento/Bebida		
Comida	Hora:	Preparación	Equivalente
	Alimento/Bebida		
Cena	Hora:	Preparación	Equivalente
	Alimento/Bebida		

CUESTIONARIO INTERNACIONAL DE ACTIVIDAD FÍSICA

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

Piense acerca de todas aquellas actividades **vigorosas** y **moderadas** que usted realizó en los **últimos 7 días**. Actividades **vigorosas** son las que requieren un esfuerzo físico fuerte y le hacen respirar mucho más fuerte que lo normal. Actividades **moderadas** son aquellas que requieren un esfuerzo físico moderado y le hace respirar algo más fuerte que lo normal.

PARTE 1: ACTIVIDAD FÍSICA RELACIONADA CON EL TRABAJO

La primera sección es relacionada con su trabajo. Esto incluye trabajos con salario, agrícola, trabajo voluntario, clases, y cualquier otra clase de trabajo no pago que usted hizo fuera de su casa. No incluya trabajo no pago que usted hizo en su casa, tal como limpiar la casa, trabajo en el jardín, mantenimiento general, y el cuidado de su familia. Estas actividades serán preguntadas en la parte 3.

1. ¿Tiene usted actualmente un trabajo o hace algún trabajo no pago fuera de su casa?

Sí

No →

Pase a la PARTE 2: TRANSPORTE

Las siguientes preguntas se refieren a todas las actividades físicas que usted hizo en los **últimos 7 días** como parte de su trabajo pago o no pago. Esto no incluye ir y venir del trabajo.

2. Durante los **últimos 7 días**, ¿Cuántos días realizó usted actividades físicas **vigorosas** como levantar objetos pesados, excavar, construcción pesada, o subir escaleras **como parte de su trabajo**? Piense solamente en esas actividades que usted hizo por lo menos 10 minutos continuos.

_____ días por semana

Ninguna actividad física vigorosa relacionada con el trabajo →
Pase a la pregunta 4

No sabe/No está seguro(a)

3. ¿Cuánto tiempo en total usualmente le toma realizar actividades físicas **vigorosas** en uno de esos días que las realiza como parte de su trabajo?

_____ **horas por día**
_____ **minutos por día**

No sabe/No está seguro(a)

4. Nuevamente, piense solamente en esas actividades que usted hizo por lo menos 10 minutos continuos. Durante **los últimos 7 días**, ¿Cuántos días hizo Usted actividades físicas **moderadas** como cargar cosas ligeras **como parte de su trabajo**? Por favor no incluya caminar.

_____ **días por semana**

No actividad física moderada relacionada con el trabajo
Pase a la pregunta 6



5. ¿Cuánto tiempo en total usualmente le toma realizar actividades físicas **moderadas** en uno de esos días que las realiza como parte de su trabajo?

_____ **horas por día**
_____ **minutos por día**

No sabe/No está seguro(a)

6. Durante **los últimos 7 días**, ¿Cuántos días **caminó** usted por lo menos 10 minutos continuos **como parte de su trabajo**? Por favor no incluya ninguna caminata que usted hizo para desplazarse de o a su trabajo.

_____ **días por semana**

Ninguna caminata relacionada con trabajo
Pase a la PARTE 2: TRANSPORTE



7. ¿Cuánto tiempo en total pasó generalmente **caminado** en uno de esos días como parte de su trabajo?

_____ **horas por día**
_____ **minutos por día**

No sabe/No está seguro(a)

PARTE 2: ACTIVIDAD FÍSICA RELACIONADA CON TRANSPORTE

Estas preguntas se refieren a la forma como usted se desplazó de un lugar a otro, incluyendo lugares como el trabajo, las tiendas, el cine, entre otros.

8. Durante los **últimos 7 días**, ¿Cuántos días **viajó usted en un vehículo de motor** como un tren, bus, automóvil, o tranvía?

_____ **días por semana**

No viajó en vehículo de motor →

Pase a la pregunta 10

9. Usualmente, ¿Cuánto tiempo gastó usted en uno de esos días **viajando** en un tren, bus, automóvil, tranvía u otra clase de vehículo de motor?

_____ **horas por día**

_____ **minutos por día**

No sabe/No está seguro(a)

Ahora piense únicamente acerca de **montar en bicicleta** o **caminatas** que usted hizo para desplazarse a o del trabajo, haciendo mandados, o para ir de un lugar a otro.

10. Durante los **últimos 7 días**, ¿Cuántos días **montó usted en bicicleta** por al menos 10 minutos continuos para **ir de un lugar a otro**?

_____ **días por semana**

No montó en bicicleta de un sitio a otro →

Pase a la pregunta 12

11. Usualmente, ¿Cuánto tiempo gastó usted en uno de esos días **montando en bicicleta** de un lugar a otro?

_____ **horas por día**

_____ **minutos por día**

No sabe/No está seguro(a)

12. Durante los **últimos 7 días**, ¿Cuántos días caminó usted por al menos 10 minutos continuos para ir **de un sitio a otro**?

_____ **días por semana**

No caminatas de un sitio a otro →

Pase a la PARTE 3: TRABAJO DE LA CASA, MANTENIMIENTO DE LA CASA, Y CUIDADO DE LA FAMILIA

13. Usualmente, ¿Cuánto tiempo gastó usted en uno de esos días **caminando** de un sitio a otro?

_____ **horas por día**

_____ **minutos por día**

No

sabe/No

está

seguro(a)

PARTE 3: TRABAJO DE LA CASA, MANTENIMIENTO DE LA CASA, Y CUIDADO DE LA FAMILIA

Esta sección se refiere a algunas actividades físicas que usted hizo en los **últimos 7 días** en y alrededor de su casa tal como como arreglo de la casa, jardinería, trabajo en el césped, trabajo general de mantenimiento, y el cuidado de su familia.

14. Piense únicamente acerca de esas actividades físicas que hizo por lo menos 10 minutos continuos. Durante los **últimos 7 días**, ¿Cuántos días hizo usted actividades físicas **vigorosas** tal como levantar objetos pesados, cortar madera, palear nieve, o excavar **en el jardín o patio**?

_____ **días por semana**

Ninguna actividad física vigorosa en el jardín o patio →
Pase a la pregunta 16

15. Usualmente, ¿Cuánto tiempo dedica usted en uno de esos días haciendo actividades físicas **vigorosas** en el jardín o patio?

_____ **horas por día**
_____ **minutos por día**

No sabe/No está seguro(a)

16. Nuevamente, piense únicamente acerca de esas actividades físicas que hizo por lo menos 10 minutos continuos. Durante los **últimos 7 días**, ¿Cuántos días hizo usted actividades físicas **moderadas** tal como cargar objetos livianos, barrer, lavar ventanas, y rastrillar **en el jardín o patio**?

_____ **días por semana**

Ninguna actividad física moderada en el jardín o patio →
Pase a la pregunta 18

17. Usualmente, ¿Cuánto tiempo dedica usted en uno de esos días haciendo actividades físicas **moderadas** en el jardín o patio?

_____ **horas por día**
_____ **minutos por día**

No sabe/No está seguro(a)

18. Una vez más, piense únicamente acerca de esas actividades físicas que hizo por lo menos 10 minutos continuos. Durante los **últimos 7 días**, ¿Cuántos días hizo usted actividades físicas **moderadas** tal como cargar objetos livianos, lavar ventanas, estregar pisos y barrer **dentro de su casa**?

_____ **días por semana**

Ninguna actividad física moderada dentro de la casa →

***Pase a la PARTE 4:
ACTIVIDADES FÍSICAS DE
RECREACIÓN, DEPORTE Y
TIEMPO LIBRE***

19. Usualmente, ¿Cuánto tiempo dedica usted en uno de esos días haciendo actividades físicas **moderadas** dentro de su casa?

_____ **horas por día**

_____ **minutos por día**

No sabe/No está seguro(a)

PARTE 4: ACTIVIDADES FÍSICAS DE RECREACIÓN, DEPORTE Y TIEMPO LIBRE

Esta sección se refiere a todas aquellas actividades físicas que usted hizo en los **últimos 7 días** únicamente por recreación, deporte, ejercicio o placer. Por favor no incluya ninguna de las actividades que ya haya mencionado.

20. Sin contar cualquier caminata que ya haya usted mencionado, durante los **últimos 7 días**, ¿Cuántos días **caminó** usted por lo menos 10 minutos continuos **en su tiempo libre**?

_____ **días por semana**

Ninguna caminata en tiempo libre



Pase a la pregunta 22

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

_____ **horas por día**

_____ **minutos por día**

No sabe/No está seguro(a)

22. Piense únicamente acerca de esas actividades físicas que hizo por lo menos 10 minutos continuos. Durante los **últimos 7 días**, ¿Cuántos días hizo usted actividades físicas **vigorosas** tal como aeróbicos, correr, pedalear rápido en bicicleta, o nadar rápido en su **tiempo libre**?

_____ **días por semana**

Ninguna actividad física vigorosa en tiempo libre



Pase a la pregunta 24

23. Usualmente, ¿Cuánto tiempo dedica usted en uno de esos días haciendo actividades físicas **vigorosas** en su tiempo libre?

_____ **horas por día**

_____ **minutos por día**

No sabe/No está seguro(a)

24. Nuevamente, piense únicamente acerca de esas actividades físicas que hizo por lo menos 10 minutos continuos. Durante los **últimos 7 días**, ¿Cuántos días hizo usted actividades físicas **moderadas** tal como pedalear en bicicleta a paso regular, nadar a paso regular, jugar dobles de tenis, **en su tiempo libre**?

_____ **días por semana**

Ninguna actividad física moderada en tiempo libre



Pase a la PARTE 5: TIEMPO DEDICADO A ESTAR SENTADO(A)

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

_____ **horas por día**

_____ **minutos por día**

No

sabe/No

está

seguro(a)

PARTE 5: TIEMPO DEDICADO A ESTAR SENTADO(A)

Las últimas preguntas se refieren al tiempo que usted permanezca sentado(a) en el trabajo, la casa, estudiando, y en su tiempo libre. Esto incluye tiempo sentado(a) en un escritorio, visitando amigos(as), leyendo o permanecer sentado(a) o acostado(a) mirando televisión. No incluya el tiempo que permanezca sentado(a) en un vehículo de motor que ya haya mencionado anteriormente.

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

_____ **horas por día**
_____ **minutos por día**

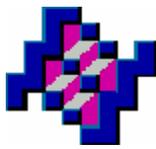
No sabe/No está seguro(a)

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

_____ **horas por día**
_____ **minutos por día**

No sabe/No está seguro(a)

Este es el final del cuestionario, gracias por su participación.



Instituto Nacional de Salud Pública
Centro de Salud en Investigación Poblacional

Cuestionario de Frecuencia de Consumo

Nombre del Paciente _____
Apellido Paterno
Apellido Materno
Nombre(s)

Nombre del Entrevistador _____

Nombre del Revisor _____

No. de identificación del Paciente _____

Fecha
Día
Mes
Año

Edad del Paciente (en años cumplidos) _____

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

Encuestador: Por favor llene el círculo (no lo tache) y en la columna de la derecha el número correspondiente a la frecuencia de consumo reportada.

FRECUENCIA DE CONSUMO													
	ALIMENTO PRODUCTOS LACTEOS	NUNCA (0)	MEN OS DE UNA VEZ AL MES (1)	VEC ES AL MES (2)	VECES A LA SEMANA			VECES AL DIA					
					1	2-4	5-6	1	2-3	4-5		6	
					(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)		(9)	
1	UN VASO DE LECHE ENTERA	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
2	UNA REBANADA DE QUESO FRESCO O ½ TAZA COTTAGE	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
3	UNA REBANADA DE QUESO OAXACA	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
4	UNA REBANADA DE QUESO MANCHEGO O CHIHUAHUA	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
5	UNA CUCHARADA DE QUESO CREMA	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
6	UNA TAZA DE YOGURTH O BULGAROS	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
7	UN BARQUILLO CON HELADO DE LECHE	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

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

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

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

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

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

FRECUENCIA DE CONSUMO													
	ALIMENTO VERDURAS	NUNCA (0)	MEN OS DE UNA VEZ AL MES (1)	VEC ES AL MES 1-3 (2)	VECES A LA SEMANA			VECES AL DIA					
					1 (3)	2-4 (4)	5-6 (5)	1 (6)	2-3 (7)	4-5 (8)	6 (9)		
42	UN JITOMATE EN SALSA O GUISADO	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
43	UN JITOMATE CRUDO O EN ENSALADA	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
44	UNA PAPA O CAMOTE	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
45	MEDIA TAZA DE ZANAHORIAS	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
46	UNA HOJA DE LECHUGA	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
47	MEDIA TAZA DE ESPINACAS U OTRA VERDURA DE HOJA VERDE	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
48	MEDIA TAZA DE CALABACITAS O CHAYOTES	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
49	MEDIA TAZA DE NOPALITOS	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
50	UN PLATO DE SOPA CREMA DE VERDURAS	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
51	MEDIO AGUACATE	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
52	MEDIA TAZA DE FLOR DE CALABAZA	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
53	MEDIA TAZA DE COLIFLOR	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
54	MEDIA TAZA DE EJOTES	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
55	UNA CUCHARADITA DE SALSA PICANTE O CHILES CON SUS ALIMENTOS	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
56	CHILES DE LATA	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
57	UN PLATILLO CON CHILE SECO	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
58	UN ELOTE	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

_____ cucharaditas.

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

Sí _____ No _____

¿Se come usted el pellejo del pollo?

Sí _____ No _____

¿Se come usted el gordito de la carne?

Sí _____ No _____

¿Cuántos meses del año pasado consumió usted vitaminas?

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

¿Cuál o cuáles? _____

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

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

¿Cuál o cuáles? _____

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

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

¿Porqué? _____

Observaciones _____

Product Specification

COCOAPURE™ 45 %

**Ref :
EA148217**

This specification sheet cancels and replaces all previous publications:

November 18, 2010

- **Description :**

Extract obtained from cocoa nibs.

Botanical name : *Theobroma cacao L.*

Extraction solvent : Ethanol 50 / Water 50

Extract ratio : 10 - 12 / 1

- **Composition :**

Natural extract

- **Specifications :**

- **Sensory quality :**

Aspect :	Powder
Color :	Dark red to red-violet
Flavor :	Characteristic
Solubility :	Partially soluble in water, soluble in alcohol

- **Analytical quality :**

Total polyphenols content (by Folin-Ciocalteu as catechin) :	45 - 50 %
Total flavanols content (as catechin) :	> 20.0 %
Flavan-3-ols content (as catechin, epicatechin, B1, B2) :	> 10.0 %
Theobromine content :	> 5.0 %
Loss on drying :	< 6 %
Particle size :	100 % through 40 mesh
pH (1% solution) :	2.0 - 5.0
Residual ethanol content :	< 5,000 ppm
Heavy metals content :	< 20 ppm
Arsenic content :	< 3 ppm
Lead content :	< 3 ppm
Cadmium content :	< 1 ppm
Mercury content :	< 0.1 ppm
Pesticide residues :	Complies with Eur. Ph. 2.8.13 current ed.*
Irradiation detection :	Not irradiated (PPSL <700)

- **Microbiological quality :**

Total plate count :	< 10,000 cfu/g
Yeasts and molds :	< 100 cfu/g
Enterobacteriaceae :	< 100 cfu/g*
E. coli :	Negative /g*
Salmonella :	Negative /25g*

*Control Plan, Analysis performed once a year.

- **Packaging :**

Product Specification

COCOAPURE™ 45 %

**Ref :
EA148217**

This specification sheet cancels and replaces all previous publications:

November 18, 2010

Polyethylene bag +cardboard box: 25kg

- **Storage conditions :**

To be stored in a cool room, sheltered from light, moisture and oxygen.

- **Shelf life :**

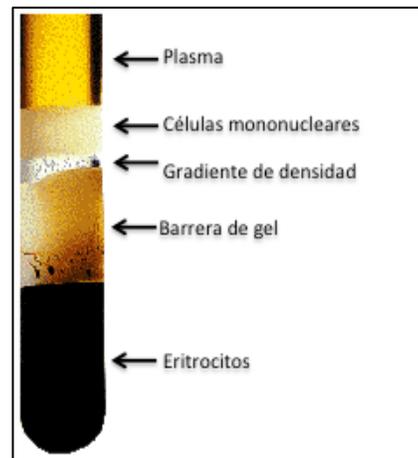
24 months under the previously mentioned conditions and in its original packaging.

MÉTODOS DE LABORATORIO

Extracción de Células Mononucleares de Sangre Periférica

Las CMSP se aislaron a partir de sangre total utilizando un Tubo de Preparación Celular (CPT) con Citrato de Sodio (BD Vacutainer). Todo el procedimiento se realiza a temperatura ambiente.

(1). Etiquetar los tubos con el código del voluntario y almacenar a temperatura ambiente, si los tubos están en hielo corren el riesgo de romperse. (2). Extraer aproximadamente 6 ml de sangre. (3). Centrifugar la muestra durante 30 minutos a 1500 RFC. (4). Aspirar aproximadamente la mitad del plasma sin remover la capa celular de monocitos. Con una pipeta Pasteur, recolectar las células mononucleares y transferir a un tubo cónico estéril de 15 ml. (5). *Lavado de las células*: Aforar el tubo cónico con PBS hasta alcanzar los 14 ml; mezclar por inversión. Centrifugar durante 15 minutos a 400 RFC; aspirar tanto sobrenadante como sea posible sin llegar a remover el pellet de células. Añadir nuevamente PBS hasta alcanzar un volumen de 10 ml y mezclar por inversión. Centrifugar durante 10 minutos a 300 RFC; aspirar tanto sobrenadante como sea posible sin remover el pellet. (6). Resuspender el pellet en 1 ml de trizol y congelar a -80°C .



Extracción de ARN

El ARN total se extrajo de CMSP por el método de Trizol. Todo el procedimiento se realiza en frío ($2-6^{\circ}\text{C}$).

(1). Incubar la muestra en trizol durante 5 minutos. (2). Agregar 0.2 ml de cloroformo por cada ml de trizol utilizado en el paso anterior. Agitar vigorosamente durante 15 segundos e incubar durante 3 minutos. Centrifugar a 12,000 RFC durante 15 minutos. (3). Se apreciarán tres fases en el tubo, la fase acuosa es



transferida a un tubo estéril de 1.5 ml. El resto del material se desecha en recipientes específicos para desechos con trizol. (4). Agregar al tubo que contiene la fase acuosa 0.5 ml de isopropanol y dejar precipitando a -20°C durante toda la noche. (5). Centrifugar a 12,000 RFC durante 10 min a 4°C . Aspirar el sobrenadante (6). Lavar el pellet con 1 ml de etanol al 75%. Centrifugar a 7,500 RFC durante 5 minutos y aspirar el sobrenadante. (7). Repetir el paso 6. (8). Lavar el pellet por tercera vez con etanol absoluto. Centrifugar a no más de 7.500 RFC durante 5 minutos a 4°C . (9). Extraer la mayor cantidad de etanol posible sin violentar el pellet. Dejar secar por 1 minuto a temperatura ambiente. (10). Resuspender el pellet en 40 μl de agua libre de RNAsas. (11). Cuantificar la concentración de RNA por espectrofotometría (NanoDrop – 1000).

Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA a partir de RNA se hizo usando el kit First Strand cDNA Synthesis de Fermentas.

(1). En un tubo estéril agregar 500 μg de RNA; 1 μl de random primer; agua libre de RNAsas hasta llegar a un volumen de 11 μl . (2). Agregar 4 μl de Reaction Buffer, 1 μl de RiboLock RNase Inhibitor, 2 μl de dNTP y 2 μl de M-MuLV Reverse Transcriptase. El volumen del tubo una vez agregados todos los componentes deberá de ser de 20 μl . (3). Mezclar por pipeteo y centrifugar para precipitar el contenido del tubo. (4). La reacción termina sometiendo las muestras a las siguientes tiempos y temperaturas: 5 minutos a 25°C , 60 minutos a 37°C y 5 minutos a 70°C . Las muestras son almacenadas a -80°C .

RT- PCR en tiempo real:

Se utilizó PCR en tiempo real para medir la expresión de SOD2 con la plataforma VIIA7 Real-Time PCR system (Applied Biosystems).

(1). En un tubo estéril se agregan los siguientes reactivos por reacción: 4.5 µl de Gene Expression Master Mix; 0.5 µl de sonda; 0.5 µl de cDNA; 4.5 µl de agua libre de RNasas. Toda reacción se debe realizar por duplicado, tanto para el gen experimental como el endógeno. (2). Colocar la mezcla en la placa y cubrir con una filme óptico. (3) Centrifugar brevemente. (4) Colocar en el VIIA7 y correr la placa. (5). Analizar los resultados mediante el método de cuantificación relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$).

CONCEPTUALIZACIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN

Edad

Es el término que se utiliza para hacer mención al tiempo que ha vivido un ser vivo. Esta variable está incluida en el estudio con la finalidad de describir a la población de estudio.

Definición operacional: Años cumplidos hasta el momento del estudio.

Tipo de variable: Cuantitativa discreta

Sexo

Características biológicas que definen a un ser humano como hombre o mujer. Variable incluida en el estudio con la finalidad de describir a la población de estudio.

Definición operacional: Masculino o femenino.

Tipo de variable: Categórica dicotómica

Grado de tabaquismo

El tabaquismo es un síndrome asociado a la adicción que produce la nicotina. Ésta es una droga que genera dependencia física, psicológica y social, lo cual puede provocar un daño multisistémico progresivo como: cáncer de pulmón, faringe, boca, esófago, estómago y cerebro, ansiedad y depresión, entre otros. La cantidad de sustancias reactivas al oxígeno producidas en el organismo en respuesta del consumo de tabaco tienen serias repercusiones en el epitelio aerodigestivo, está ampliamente documentado que el hábito tabáquico se asocia con la disminución en la expresión de genes silenciados por mecanismos epigenéticos. Es importante evaluar si la intensidad del hábito tabáquico influye de manera proporcional en la metilación y expresión del gen *SOD2* en la mucosa de la boca.

Operacionalización: Frecuencia en el consumo de tabaco, (Carlos Rodríguez A, 2008) con un consumo mínimo de 5 cigarrillos a la semana en el último año.

Consumo de tabaco	Hombres	Mujeres	Número	Total
Fumador actual				
- Fumador diario				
- Fumador ocasional				
Fumador ocasional, antes fumador diario				
Fumador ocasional, nunca fumador diario				

Tipo de variable: Ordinal

Índice de masa corporal

Es el cociente que hay entre el peso y la talla de un individuo, este índice se utiliza para identificar la existencia de desnutrición, peso normal, sobrepeso y obesidad en adultos. El IMC constituye la medida (poblacional) más utilizada pues en su cálculo no se discrimina de acuerdo al sexo o de la edad en la población adulta. No obstante, debe considerarse como una guía aproximativa, pues puede no corresponder al mismo grado de gordura en diferentes individuos. (Organización Mundial de la Salud, 2006)

Definición operacional: Peso en kilogramos dividido por el cuadrado de la talla en metros (kg/m^2)

- Bajo peso: $< 18.5 \text{ kg/m}^2$
- Peso normal: $18.5\text{-}24.9 \text{ kg/m}^2$
- Sobrepeso: $\geq 25 \text{ kg/m}^2$
- Obeso: $\geq 30 \text{ kg/m}^2$

Tipo de variable: Categórica ordinal

Dieta

Conjunto de alimentos y platillos que se consumen cada día, y constituye la unidad de la alimentación. Una dieta correcta debe de cumplir con las siguientes características: ser completa, equilibrada, inocua, suficiente, variada y adecuada. (Secretaría de Salud, 2005) Diferentes estudios epidemiológicos han evidenciado que componentes de la

alimentación como son las vitaminas antioxidantes y el consumo de polifenoles disminuyen el riesgo a diferentes enfermedades, por ejemplo, enfermedades cardiovasculares y cáncer. A su vez, estudios experimentales han demostrado que ciertos fitoquímicos consumidos de manera habitual pueden llegar a modular la expresión de genes por medio de mecanismos epigenéticos en el epitelio de fumadores.

Definición operacional: Frecuencia en el consumo de alimentos.

- ✓ Consumo habitual de polifenoles
 - Elevado: Ingestión diaria igual o mayor a la media de consumo de la muestra.
 - Bajo: Ingestión diaria menor a la media de consumo de la muestra.
- ✓ Consumo de catequina
 - Elevado: Ingestión diaria igual o mayor a la media de consumo de la muestra.
 - Bajo: Ingestión diaria menor a la media de consumo de la muestra.
- ✓ Consumo de vitaminas antioxidantes
 - Elevado: Ingestión diaria igual o mayor a la media de consumo de la muestra.
 - Bajo: Ingestión diaria menor a la media de consumo de la muestra.
- ✓ Cantidad de calorías consumidas (kcal/d)

Tipo de variable: Categórica

Consumo de polifenoles de un suplemento de cocoa

Las cocoa está hecha a base de polvo de cacao molido, al cual se le retiró la manteca de cacao. Los endulzantes, especialmente azúcares, son particularmente importantes como constituyentes de la cocoa, esto se debe al amargo sabor del producto y a que aumenta la solubilidad y dispersabilidad de la mezcla. Aunque el contenido de polifenoles del polvo de cocoa es alto, el tratamiento de fermentación y tostado que se le da al grano de

cacao como parte del procesamiento comercial, provoca la pérdida de componentes naturales y el contenido de antioxidantes disminuye. Los principales compuestos polifenólicos del cacao y sus derivados son los flavonoides, con tres clases de elementos característicos, catequina, epicatequina y procianidinas. Una bebida contiene hasta el 10% de flavonoides en base a su peso seco. (Belscak-Cvitanovic, 2010; Chun, 2007) El polvo seco de cocoa se consume generalmente con agua o leche.

Definición operacional: Consumo de un suplemento con alto contenido en cocoa y placebo.

- Suplemento de cocoa: CocoaPure al 45% con 449 mg/g polifenoles.
- Placebo: Maltodextrina

Tipo de variable: Categórica dicotómica

Cambio en la expresión y porcentaje de metilación del gen *SOD2*

La expresión del gen es el proceso por el que las células convierten secuencias de información de ADN en ARNm, para después decodificar la información de ARNm a la secuencia de aminoácidos de una proteína.

El gen mitocondrial superóxido dismutasa (*SOD2*) es un gen de copia única con cinco exones y cuatro intrones, se localiza en el cromosoma 6q25.3 y codifica para la enzima antioxidante MnSOD que protege las células del daño oxidativo. Esta enzima representa la mayor defensa intracelular en contra de los radicales libres superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que son altamente reactivos y dañinos para las estructuras celulares, convirtiéndolos a H_2O_2 que finalmente es convertido a agua por la catalasa y la glutatión peroxidasa.

Influencia hereditaria pero también regulación epigenética son mecanismos propuestos para la expresión del gen MnSOD. El papel que juegan factores ambientales como la nutrición y el tabaquismo sobre la regulación de la expresión del gen MnSOD correlacionan con la desmetilación de las islas CpG en la región promotora del gen *SOD2*. (Sociedad Española de Dietética y Ciencias de la Alimentación, 2011)

✓ **Cambio en la expresión del gen *SOD2***

La regulación de la expresión de genes es un proceso complicado, los perfiles de expresión pueden permanecer estables durante varios ciclos celulares, incluso pueden mantenerse a través de generaciones, para después ser reprogramados en puntos precisos del desarrollo o en respuesta a múltiples factores. Estímulos externos que modulan el perfil de expresión de un gen son por ejemplo, la dieta, el ejercicio y la exposición del organismo a sustancias dañinas como el tabaco.

Definición operacional: Diferencia en la cuantificación de la expresión del gen *SOD2* por medio de PT-PCR de tiempo real con respecto a sus controles internos.

- Sí: Aumento \geq al 10% en el número de copias de ARN del gen *SOD2*
- No: Aumento $<$ al 10% en el número de copias de ARN del gen *SOD2*.

Tipo de variable: Cuantitativa continua.

Cambio en la actividad antioxidante del plasma

La capacidad antioxidante del plasma se refiere al potencial para “atrapar” radicales libres con el propósito de evitar que éstos interactúen con moléculas biológicas fundamentales. Los responsables de esta capacidad son los compuestos antioxidantes presentes en el plasma. La calidad del antioxidante depende de su capacidad y afinidad para “atrapar” radicales libres. La capacidad se refiere al número de radicales libres inactivados por molécula de antioxidante y la afinidad se refiere a la rapidez con que un antioxidante inactiva a un radical.

Determinar la capacidad antioxidante del plasma es un excelente parámetro para evaluar nuestro estado de defensa antioxidante, ya que representa o refleja el potencial de respuesta que tiene el organismo frente al ataque de los radicales libres. No existe un método único para evaluar la capacidad antioxidante de mezclas complejas, y los valores de medición obtenidos para una muestra dependen del índice utilizado para evaluarla.

Definición operacional: Diferencia entre la actividad antioxidante en plasma en estado basal y posterior a la intervención medido por el método de TBARS (*valores de corte aún por definir*)

Tipo de variable: Cuantitativa continua

Del cacao a la cocoa

INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

PUNTOS DE INTERÉS:

- Todas las muestras y datos personales serán manejados con estricta confidencialidad.
- El estudio se llevará a cabo bajo dosis seguras de administración.

Efecto del consumo de COCOA en la SALUD

La cocoa proviene del cacao, que es un árbol originario de México y Centroamérica. En sus inicios, el cacao era consumido por las culturas mesoamericanas, quienes lo llamaban "bebida de los dioses" y le daban un uso medicinal y vigorizante.

La cocoa es la parte no grasa del cacao. Se sabe que este producto contiene sustancias activas BENEFICAS PARA EL ORGANISMO llamadas polifenoles. El consumo de polifenoles está asociado a la prevención de enfermedades crónicas, cardiovasculares, procesos inflamatorios y capacidad antioxidante.

Este proyecto pretende estudiar qué beneficios confiere a la salud el consumo de polifenoles de la cocoa.



¿QUIÉNES PUEDEN PARTICIPAR?

- ⇒ Personas sanas de entre 18 y 40 años de edad.
- ⇒ Con un índice de masa corporal³ de 18.5 a 30 kg/m²
- ⇒ Con actividad física sedentaria o moderada.
- ⇒ Que no hayan consumido medicamentos ni multivitamínicos en el último mes.
- ⇒ No embarazadas o en periodo de lactancia.
- ⇒ Aquellos que den su consentimiento.

¿En qué consiste el estudio?

El estudio consiste en:

- Tres visitas a la Clínica de Nutrición
- Consumo de un concentrado de cocoa o placebo.
- Toma de muestras de sangre en ayuno.
- Proporcionar información referente a su historia clínica, frecuencia de consumo de alimentos, actividad física.
- Toma de medidas antropométricas (peso, talla, cintura)
- Análisis de composición corporal (InBody).

¡ BENEFICIOS RECIBIDOS !

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

³ Índice de masa corporal:
Peso (kg) / Talla (m²)

Para más información, contacte con:

LN Paloma K. Barrera, LN Luz M. Verástegui Tena
Laboratorio de Nutrigenómica y Nutrigenética, INMEGEN

Tel: 55501900 ext. 1947 o 53501974 e-mail: cocoa@inmegen.gob.mx