



UNIVERSIDAD DE CHILE
INSTITUTO DE NUTRICIÓN Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS
Doctor Fernando Monckeberg Barros

“DETERMINACIÓN DEL IMPACTO ANTIOXIDANTE Y ANTI-INFLAMATORIO DE
QUERCETINA Y ÁCIDO CAFEICO EN CÉLULAS CACO-2”

Tesista: Miltha Hidalgo Ledesma
Director de Tesis: Omar Porrás Espinoza

TESIS PARA OPTAR AL GRADO MAGÍSTER EN NUTRICIÓN Y ALIMENTOS
MENCIÓN NUTRICIÓN HUMANA

Junio 2019
Santiago-Chile

AUTORIZACIÓN

El siguiente documento presentado como Tesis por la estudiante Miltha Hidalgo, ha sido revisado y aprobado por mí como Director de Tesis para la presentación formal ante la Comisión Evaluadora.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Omar Porras', is centered on the page. The signature is stylized with large loops and a horizontal line across the middle.

Omar Porras
Director de tesis

Santiago de Chile, 19 de Junio del 2019

**“DETERMINACIÓN DEL IMPACTO ANTIOXIDANTE Y ANTI-INFLAMATORIO
DE QUERCETINA Y ÁCIDO CAFEICO EN CÉLULAS CACO-2”**

Por

Miltha Hidalgo Ledesma

**Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al grado
académico de Magíster en Nutrición y Alimentos Mención Nutrición Humana**

COMITÉ DE TESIS

DIRECTOR DE TESIS

FIRMA

Omar Porras

COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS

Rodrigo Troncoso

Miguel Arredondo

Martín Gotteland

Santiago, 19 de Junio de 2019

1. Cuerpo preliminar

ii. Comisión de tesis

Rodrigo Troncoso, Profesor Asistente; Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos Dr. Fernando Monckeberg Barros (INTA), Universidad de Chile.

Miguel Arredondo, Profesor Titular; Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos Dr. Fernando Monckeberg Barros (INTA), Universidad de Chile.

Martín Gotteland, Profesor Titular; Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos Dr. Fernando Monckeberg Barros (INTA), Universidad de Chile.

iii. Agradecimientos

Sumergirme en un mundo totalmente ajeno fue un reto que al comienzo estaba lleno de miedos y dudas, sin embargo, mi tutor Omar Porras, con una disposición absoluta y mucha paciencia ha guiado este camino de aprendizaje, de tal forma que me motiva día a día a seguir desarrollándome como investigadora, y confirmar que el rumbo que estoy tomando es el correcto. Es por esto que le estaré eternamente agradecida.

A Nicolás Tobar, Violeta Kallens y Jessica Molina, que fueron las personas que de una forma desinteresada y mucha amabilidad me orientaron en el laboratorio, y con muy buena disposición resolvieron mis dudas (y aún las resuelven). Nunca olvidaré lo generosos que fueron y son conmigo.

No puedo de dejar de agradecer a mis amigas Daniela Avilés y Christine Kreindl, que durante este proceso se volvieron esenciales. A Uds. mil gracias por sus consejos, por las risas y por las lágrimas.

A Ailynne Sepúlveda, que se ha transformado en una gran compañera de trabajo.

A mis padres, Roberto y Miltha, y mis hermanos, Francisco y Felipe, por su apoyo incondicional y por todo el amor que me entregan día a día.

A todos Uds. mil gracias. Sin Uds. esta historia sería muy distinta.

Afortunada soy porque la vida los puso en mi camino.

iv. Índice de contenidos

1. Cuerpo preliminar	4
ii. Comisión de tesis	4
iii. Agradecimientos	5
iv. Índice de contenidos.....	6
vi. Abreviaturas	8
2. Resumen	9
3. Abstract	11
4. Introducción	13
5. Hipótesis de Trabajo y Objetivos	16
7. Resultados.....	24
Impacto antioxidante de CAPE y quercetina en células Caco-2 intactas	24
Implementación de un modelo de inflamación <i>in vitro</i> con células Caco-2 diferenciadas.....	32
8. Discusión	36
9. Conclusiones	44
Anexo.....	51

v. Índice de figuras

Figura 1. Seguimiento de la formación de una monocapa de células Caco-2 a través de la medición de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER).	18
Figura 2. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) de la superficie apical de células Caco-2.	19
Figura 3. Registro y análisis razonométrico de la señal HyPer en células vivas.	21
Figura 4. Efecto de CAPE y quercetina sobre la señal basal del biosensor HyPer expresado en células Caco-2.	25
Figura 5. Efecto de CAPE y quercetina sobre la respuesta del biosensor frente a un pulso de H ₂ O ₂ 50 μM.	27
Figura 6. El tratamiento con CAPE y quercetina aumenta los niveles de transcritos para enzimas antioxidantes en células Caco-2.	29
Figura 7. Sólo quercetina acelera la reducción del biosensor HyPer en células Caco-2.	31
Figura 8. El tratamiento con CAPE y Quercetina no evita la disminución de la resistencia eléctrica transepitelial inducida por H ₂ O ₂ exógeno en células Caco-2.	33
Figura 9. Efecto de CAPE y -2 quercetina sobre la expresión de citoquinas proinflamatorias en monocapas de células Caco-2.	35

vi. Abreviaturas

ADN	: ácido desoxirribonucleico
AQPs	: aquaporinas
ARN	: ácido ribonucleico
ARNm	: ARN mensajero
CAPE	: ácido cafeico
cDNA	: ácido desoxirribonucleico complementario
GAPDH	: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
KRH	: Krebs Ringer Hepes
LPS	: lipopolisacáridos
MP	: membrana plasmática
qPCR	: PCR cuantitativo
Quer	: quercetina
ROS	: especies reactivas de oxígeno
SOD-1	: superóxido dismutasa-1
TEER	: resistencia eléctrica transepitelial
TXN-1	: tiorredoxina-1
PXN-1	: peroxirredoxina-1

2. Resumen

El epitelio intestinal corresponde a la primera zona de contacto que establece una relación funcional entre los componentes dietarios y este nicho fisiológico. Es ampliamente aceptado que los compuestos fenólicos derivados de la dieta poseen un potencial antioxidante, sin embargo, el impacto sobre la homeostasis óxido-reducción de proteínas citoplasmáticas no ha sido evaluada en células intestinales vivas en tiempo-real.

En este trabajo evaluamos el impacto antioxidante del ácido cafeico (CAPE, 10 μM) y quercetina (Quer, 5 μM) en células Caco-2 que expresan HyPer en su citoplasma, un biosensor equipado con un par de cisteínas oxidables por H_2O_2 , cuya reducción a tioles depende de la actividad antioxidante celular. Complementariamente, evaluamos la abundancia de transcritos para tioredoxina-1, peroxirredoxina-1 y superóxido dismutasa-1 por qPCR. La señal de HyPer en estado estacionario obtenida de células tratadas con Quer por 24 horas fue menor al control, efecto consistente con un aumento en la expresión del mensajero para tioredoxina-1 y cuya actividad fue observada al registrar una reducción acelerada del biosensor oxidado. Células tratadas con CAPE mostraron una señal basal del biosensor mayor a la condición control, situación que se explica por un aumento de los mensajeros para superóxido dismutasa-1 y peroxirredoxina-1, que en conjunto favorecen la presencia de H_2O_2 y la transmisión de sus equivalentes oxidantes a la oxidación de cisteínas en el ambiente citoplasmático. Inesperadamente, el tratamiento con CAPE protegió al biosensor de la oxidación provocada por un pulso de H_2O_2 (50 μM , 5 min), lo que invita a revisar los mecanismos relacionados con la permeabilidad a H_2O_2 de la membrana plasmática.

En esta tesis también exploramos los niveles de transcritos para citoquinas pro-inflamatorias en células sometidas a H_2O_2 (500 μM , 30 min) y pre-incubadas con los compuestos fenólicos mencionados, sin embargo, en nuestras condiciones experimentales no detectamos cambios para las IL-8, IL-1 β e IL-25.

El impacto diferencial de ambos compuestos fenólicos sobre la homeostasis redox de células epiteliales de intestino nos ha ayudado a entender mejor el efecto de estos compuestos sobre los componentes de la maquinaria redox. Las implicancias de estos cambios redox sobre la función de barrera podría ser investigado en modelos de estudio más complejos que permitan evaluar la interacción con comunidades microbianas, por ejemplo.

3. Abstract

The intestinal epithelium is the first barrier that interacts with dietary compounds, modulating integrity and functionality of this epithelium. It is widely accepted that phenolic compounds might have an antioxidant potential, however, this property has not been evaluated regarding the oxido-reduction homeostasis of cytoplasmic proteins in intact intestinal cells.

In this work, we evaluated the antioxidant impact in real-time of caffeic acid (CAPE, 10 μ M) and quercetin (Quer, 5 μ M) in Caco-2 cells expressing HyPer at cytoplasm, a redox biosensor carrying a pair of cysteines oxidized only by H₂O₂, which reduction to thiols depends of the antioxidant cellular activity. In addition, we evaluated the abundance of transcripts for thioredoxin-1, peroxirredoxin-1 and superoxide dismutase-1 by qPCR. The steady-state HyPer signal obtained in cells treated by 24 hours with Quercetin was lower than control cells, an effect that was consistent with an increase in the mRNA and activity of thiorredoxin-1, which was measured by recording an accelerated reduction in the oxidized biosensor. CAPE-treated cells showed a higher signal respect to control, a situation that might be explained by an increase in mRNAs for superoxide dismutase-1 and peroxirredoxin-1, which together favor the H₂O₂ presence and the transmission of its oxidant equivalent to the cysteine oxidation into the cytoplasmic environment. Unexpectedly, CAPE treatment protected the biosensor from the oxidation induced by a H₂O₂ pulse (50 μ M, 5 min), an observation that invites us to revisit the mechanisms involved in the H₂O₂ permeability at plasma membrane. In this thesis, we also explored the mRNA levels for pro-inflammatory cytoquines in Caco-2 cells subjected to H₂O₂ (500 μ M, 30 min) and pre-treated with the phenolic compounds mentioned, however, in our experimental conditions no changes were detected for IL-8, IL-1 β y IL-25.

The differential impact of both phenolic compounds on the redox homeostasis in epithelial cells from intestine helped us to understand better the effect of these compounds on each component of redox machinery. The implicances of these redox

changes on the barrier function could be further investigated in more complex models that allow the study with microbial communities, for instance.

4. Introducción

Los polifenoles son un grupo de fitocompuestos sintetizados por las plantas que participan en la protección contra la radiación ultravioleta, el daño mecánico y la infección microbiana(1). Además, aportan color, sabor, amargor y astringencia a los alimentos(2). Estos compuestos forman parte integral de cualquier dieta que incluya frutas, verduras y legumbres, como lo reporta el estudio EPIC que estima el consumo diario de 427 polifenoles basado en la base de datos *Phenol Explorer*, que asigna el tipo y su abundancia en alimentos utilizados frecuentemente por la cocina europea y además, considera los efectos de la cocción(3).

Las recomendaciones sobre el consumo regular de frutas, verduras, granos enteros, frutos secos y semillas, se sustenta en parte, por el alto contenido de compuestos fenólicos que estos alimentos contienen, los cuales han sido asociados a efectos beneficiosos para un amplio rango de enfermedades, como algunos tipos de cáncer, diabetes, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas(4), cuya acción involucra la regulación de vías moleculares encargadas de la inflamación, mantener el potencial redox celular y la apoptosis, entre otras(4-5).

Para entender mejor los mecanismos que subyacen a estos efectos beneficiosos vinculados a la homeostasis redox, es necesario considerar la naturaleza biológica de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por parte del metabolismo celular. Los ROS se caracterizan por tener uno o más electrones desapareados en sus orbitales externos, tales como, el anión superóxido, los radicales hidroxilo y el peróxido(5-6). Enzimas tales como la NADPH oxidasa, la citocromo P-450 dependiente de oxigenasas y las xantinas oxidasas son conocidas por producir anión superóxido $O_2^{\bullet-}$ (7). El $O_2^{\bullet-}$ también es generado por los complejos mitocondriales I y III de la cadena transportadora de electrones, sin embargo, dismuta espontánea o enzimáticamente a peróxido de hidrógeno, H_2O_2 , el cual participa como segundo mensajero en algunos procesos celulares(8). Además, factores ambientales que incluyen la polución ambiental, consumo de tabaco, drogas y alcohol, por ejemplo, fomentan la producción de especies reactivas(5-6,9). Se ha establecido que los ROS pueden ejercer su función benéfica o perjudicial

dependiendo de las concentraciones que se encuentren a nivel celular. Niveles bajos o controlados de ROS son necesarios para mantener eventos de señalización intracelular(10-11), garantizar la proliferación y la supervivencia celular a través de la modificación post-transduccional de quinasas y fosfatasa(12). Al contrario, una sobreproducción de ROS o la exposición prolongada pueden causar daño irreversible en moléculas, tales como, ácido desoxirribonucleico (ADN), proteínas y lípidos, comprometiendo la viabilidad celular. Por tanto, la homeostasis redox depende de sistemas endógenos antioxidantes capaces de neutralizar la inevitable producción de ROS derivada del metabolismo. El sistema antioxidante celular incluye moléculas, como vitaminas A, C y E, así como también la acción de enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, tioredoxina, peroxirredoxina, catalasa, glutatión peroxidasa y hemoxigenasa-1), las cuales conforman un sistema interconectado dedicado a eliminar o inactivar los ROS. Un desbalance entre la generación de ROS y los mecanismos de defensa pueden resultar en una condición conocida como estrés oxidativo(5,9,29,53).

El epitelio intestinal se perfila como el sitio de interacción primario entre los polifenoles ingeridos y quien los consume(13). Esta barrera comprende una superficie de interacción de aproximadamente 400 m²(14), la cual está constituida por una monocapa de células epiteliales que se caracteriza por absorber nutrientes, como también evitar la entrada de entidades potencialmente dañinas como microorganismos o antígenos dietarios(13). A través de los receptores Toll-like Receptors (TLR), esta barrera reconoce algunos componentes bacterianos como lipopolisacáridos (LPS), provoca la liberación de citoquinas proinflamatorias y aumenta la permeabilidad intestinal, a través de la alteración estructural de las uniones estrechas(15). Algunas de las citoquinas proinflamatorias secretadas por el epitelio intestinal incluyen las clásicas, tales como IL-8(16-18), IL-1 β , IL-6, y TNF- α (19), y otras de acción más local como IL-25 e IL-33(20).

La secreción de citoquinas en este nicho fisiológico, entonces, podría ser modulada por la presencia de fenoles dietarios con potencial antioxidante(4) o incluso, favorecer la integridad del epitelio intestinal promoviendo la formación de uniones

estrechas(13). Por ejemplo, algunos estudios demuestran que la exposición a quercetina (10 μ M), en un modelo *in vitro* de epitelio intestinal, aumenta la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) y disminuye el paso de moléculas de 0.45 kDa(21). El ácido cafeico, por otra parte, ejerce acciones anti-inflamatorias y antioxidantes en células de origen colónico (HT29 y SW620), modificando la actividad de NF κ B y Nrf2, respectivamente (22-23).

En este trabajo de tesis para optar al grado de Magister en Nutrición y Alimentos nos focalizaremos en determinar el impacto biológico de CAPE y quercetina, ambos compuestos fenólicos dietarios, sobre células Caco-2 que expresan HyPer, un biosensor redox fluorescente que reporta no sólo el tono redox citoplasmático, sino también la actividad reductora de puentes disulfuro(25). Adicionalmente, investigaremos si estos fenoles interfieren con la producción de citoquinas pro-inflamatorias inducidas por un desafío oxidante.

5. Hipótesis de Trabajo y Objetivos

Hipótesis

CAPE y quercetina ejercen un efecto antioxidante y evitan la producción de citoquinas proinflamatorias inducidas por un insulto oxidativo en células Caco-2.

Objetivo general

Evaluar el efecto antioxidante de CAPE y quercetina y su capacidad antiinflamatoria en células Caco-2.

Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto del tratamiento de CAPE y quercetina sobre la señal de fluorescencia del biosensor HyPer expresado en células Caco-2.
2. Establecer un modelo de inflamación *in vitro* en monocapas diferenciadas de células Caco-2 y evaluar el efecto de estos fenoles.
3. Determinar los niveles de transcritos de citoquinas proinflamatorias y enzimas antioxidantes en células Caco-2 expuestas a estos fenoles.

6. Metodología

Reactivos y sales para preparación de tampones fueron obtenidos desde Sigma-Aldrich (MO, USA). Los medios de cultivo y suplementos fueron obtenidos de Life Technologies (NY, USA). Ácido cafeico (Tocris, UK) y quercetina 3-glucósido (Sigma-Aldrich, MO, USA o Extrasynthese, Genay, France). La solución de peróxido de hidrógeno 30% usado en este trabajo fue obtenido de Merck (Darmstadt, Alemania).

Cultivo celular: la línea celular Caco-2 (HTB-37TM, adenocarcinoma colorectal) fue comprada en American Type Culture Collection (ATCC), y cultivadas en Dulbecco's Modified Eagle's Medio (Life Technologies, cat: 31600-034), suplementado con 10% de suero fetal bovino (Mediatech, cat: MD.35-010-CV), 1% aminoácidos no esenciales (Corning, cat: 25-025) y 1% solución pen-strep (penicilina 10.000 U/mL-estreptomicina 10 mg/mL, Biological industries, cat: 03-031-1B). Las células fueron mantenidas bajo una atmósfera humidificada a 37°C con 5% CO₂. El medio de cultivo fue renovado cada 2 o 3 días. Cuando se alcanzó una confluencia de 70-90% los cultivos se expandieron a placas de 96 pocillos o se sembraron en membranas semipermeables de policarbonato, Transwell® (diámetro 12 mm, poro 0.4 µm, Costar, cat: 3401). Ácido cafeico y quercetina 3-glucósido fueron utilizados a una concentración de 10 µM y 5 µM, respectivamente.

Formación de monocapas de células Caco-2 polarizadas: las células Caco-2 fueron sembradas sobre Transwell® a una densidad de 3×10^5 células por pocillo utilizando pasajes entre p95 a p105 y monitoreando la integridad de la monocapa por medio del TEER a través del voltímetro EVOM²®, cada 2 a 3 días (ver esquema, anexo1). Bajo estas condiciones experimentales observamos que las monocapas desarrollaron un valor de TEER mayor o igual a $300 \Omega \cdot \text{cm}^2$, indicativo de una monocapa integra, como lo señala Husbatch et al. (27) (figura 1). Para visualizar la naturaleza del modelo celular diferenciado, capturamos imágenes de la superficie apical de las células Caco-2, mediante microscopía electrónica de barrido (SEM),

sembradas en dispositivos Transwell® y las comparamos con la superficie de las sembradas en vidrio (figura 2).

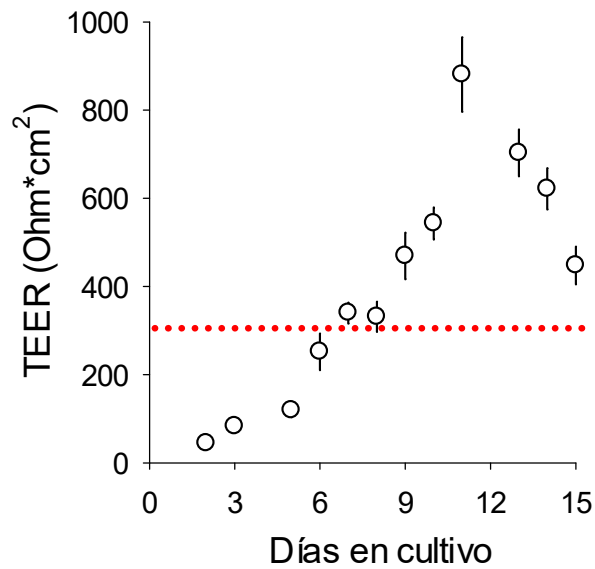
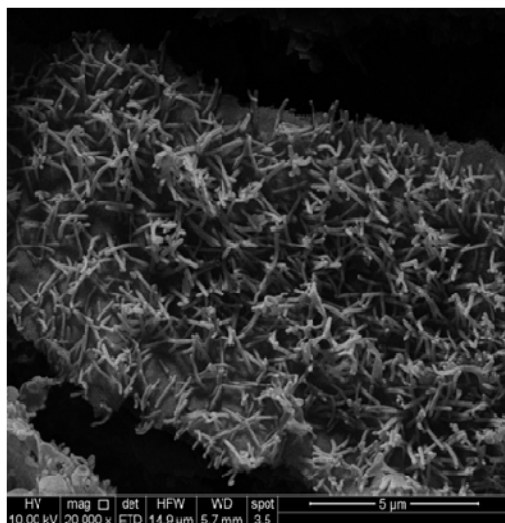


Figura 1. Seguimiento de la formación de una monocapa de células Caco-2 a través de la medición de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER).

Desde el noveno día de cultivo, las monocapas de células presentan una resistencia eléctrica sobre los $300 \Omega \cdot \text{cm}^2$, valor escogido como el nivel óptimo de resistencia eléctrica (línea punteada de color rojo). Cada punto de la curva corresponde al promedio \pm ES de 5 a 10 registros provenientes de al menos 3 experimentos independientes.

Cubreobjetos



Bi-cámara

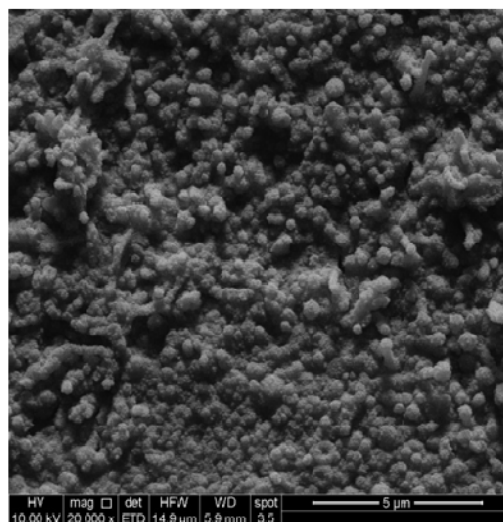


Figura 2. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) de la superficie apical de células Caco-2. Las células Caco-2 pasaje 86 fueron sembradas en vidrio (izquierda) y en bi-cámaras (derecha). La imagen fue obtenida al día 13^{avo} de cultivo, es decir, las células crecidas en vidrio presentaban 100% de confluencia, mientras que las de bicámara exhibían un TEER superior a los 300 $\Omega \cdot \text{cm}^2$.

Determinación de la señal HyPer: la expresión citoplasmática de HyPer en las células Caco-2 se logró mediante la infección con el Adeno-HyPer (1:50). Transcurridas 48 horas, el medio fue reemplazado y se agregó quercetina o ácido cafeico por 24 horas. El día del ensayo, las células fueron lavadas con el tampón Krebs Ringer Hepes (KRH, mM: 140 NaCl, 4.7 KCl, 20 Hepes, 1.25 MgSO₄, 1.25 CaCl₂; pH 7.4) suplementado con 5 mM de glucosa, y se utilizó pulsos de H₂O₂ (50 y 500 μM) para evaluar el comportamiento redox de las células vivas. Los registros del biosensor se llevaron a cabo con el equipo Infinite M200 PRO Tecan, para cultivos en placas multipocillo y en el microscopio invertido de epifluorescencia

Nikon TI Eclipse, equipado con el objetivo 40X [N.A. 1.3] y acoplado a una lámpara de xenón y un monocromador (Cairn Research Ltd, Faversham, UK), necesarios para excitar dualmente a 420 y 490 nm, la fluorescencia emitida fue recolectada sobre 520 nm con un filtro *LongPass*. La señal del biosensor se expresa como una razón 490/420 (figura 3), esta razón de fluorescencia aprovecha el cambio recíproco que experimenta el biosensor, el cual a oxidarse aumenta la fluorescencia emitida a 490 nm, mientras que a 420 nm disminuye.

Para evaluar el efecto de los compuestos sobre el estado redox intracelular, analizamos la señal basal y además, sometimos las células a pulsos de H₂O₂, lo cual permite conocer en primer lugar, la respuesta frente a un estímulo oxidativo moderado (50 μM) y la cinética de recuperación una vez que se alcanza la total oxidación o máxima señal del biosensor (500 μM)(24-25).

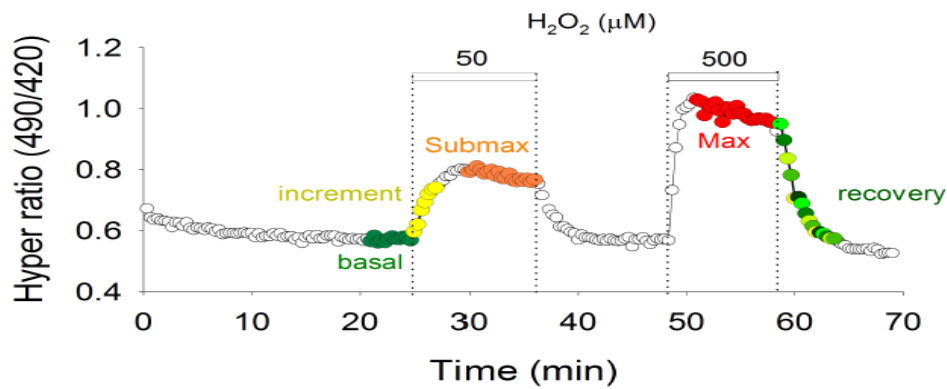
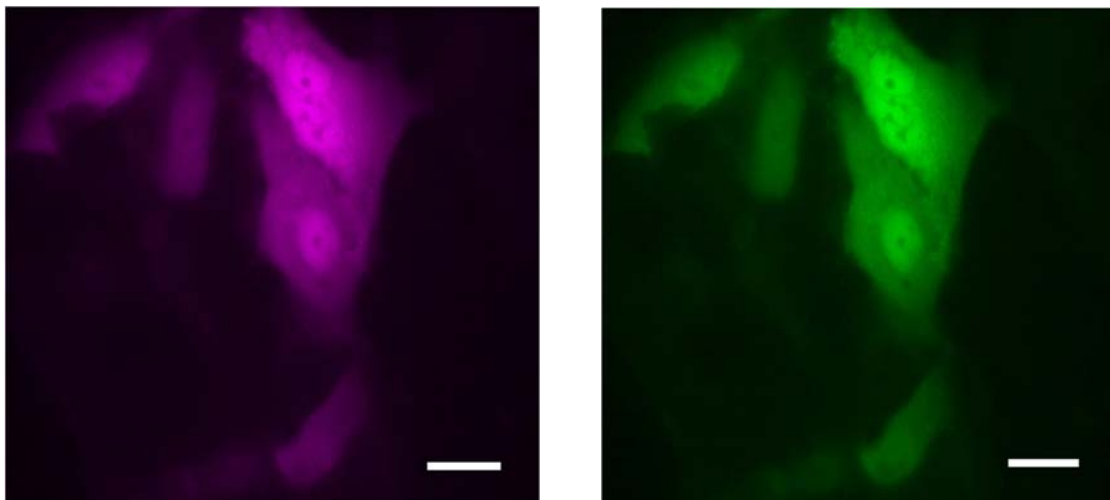
A**B**

Figura 3. Registro y análisis razonométrico de la señal HyPer en células vivas. (A) Registro típico de la respuesta del biosensor HyPer a dos pulsos consecutivos de H₂O₂ obtenido en el microscopio de epifluorescencia. Los pulsos fueron aplicados durante el tiempo indicado por las barras sobre el registro y las líneas punteadas. Los datos corresponden a promedios ± ES de 13 células de un experimento representativo. Figura tomada de Hernández et. al, vol 16, pp 199-208. (B) Células Caco-2 expresando el biosensor HyPer. La imagen en color magenta y verde, representa la fluorescencia emitida de las células al ser excitadas a 420 y 490 nm, respectivamente. La barra blanca indica una escala de 30 μm.

Determinación de niveles de transcritos de citoquinas proinflamatorias y enzimas antioxidantes: mediante el método PCR cuantitativo (qPCR) se determinó los niveles de transcritos para las siguientes citoquinas: IL-1 β , IL-8 e IL-25, y de las siguientes enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa-1 (SOD-1), tiorredoxina-1 (TXN-1) y peroxirredoxina-1 (PXN-1). Brevemente, el ácido ribonucleico (ARN) total fue aislado con Trizol Reagent (Ambion, Carlsbad, CA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, a partir de células sembradas en bi-cámaras o placas de cultivo, pre tratadas con ácido cafeico o quercetina por 24 horas. Para evaluar los transcritos de citoquinas proinflamatorias, las células sembradas en bi-cámaras, fueron expuestas por 30 minutos a 500 μ M de H₂O₂, transcurrido este tiempo, las células fueron lavadas con medio de cultivo, y dejadas en reposo por 1.5 horas. El ADN complementario (cDNA) se generó a partir de 1 μ g de ARN total, utilizando la enzima transcriptasa reversa M-MLV y Oligo-dT como iniciador, según protocolo estándar. La expresión de los mensajeros se determinó por qPCR en tiempo real usando el equipo Light Cycler[®] 96 de Roche. La amplificación se realizó con 100 ng de cDNA y una mezcla de reacción LightCycler[®] FastStar DNA Master SYBR Green I de Roche, en un volumen final de 10 μ L. Todas las reacciones se realizaron en duplicado, incluyendo un control negativo. La normalización de los datos se calculó a partir de la expresión del mensajero para la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Los ciclos de cuantificación (cq) se mantuvieron entre 12 y 14 para todas las condiciones evaluadas, incluso con el tratamiento con H₂O₂ (500 μ M, 30 min), lo que indica que la recolección de ARNm fue similar, es decir, sin pérdida de integridad celular por la aplicación de H₂O₂ (ver anexo 2). Los partidores utilizados se detallan en la tabla 1, y el cálculo de la expresión relativa de cada uno de los mensajeros estudiados, fue determinado por la ecuación descrita para la determinación de la expresión relativa(26):

$$R = \frac{E_{gen\ blanco}^{\Delta Ct_{gen\ blanco} (Control-tratado)}}{E_{gen\ ref}^{\Delta Ct_{gen\ ref} (Control-tratado)}}$$

Tabla 1. Partidores qPCR

	Secuencia del partidor	Tm	Tamaño
IL-1 β (f)	5'-AATCCCCAGCCCTTTTGTG-3'	60°C	85 pb
IL-1 β (r)	5'-AAATGTGGCCGTGGTTTCTG-3'		
IL-8 (f)	5'-GGTGCAGTTTTGCCAAGGAG-3'	61°C	183 pb
IL-8 (r)	5'-TTCCTTGGGGTCCAGACAGA -3'		
IL-25 (f)	5'-TGAGGGAGCGACCCAGATTA-3'	57°C	73 pb
IL-25 (r)	5'-GCCAAGAATGCAACCACCTG-3'		
SOD-1 (f)	5'-CATTGCATCATTGGCCGCA-3'	59°C	99 pb
SOD-1 (r)	5'-ACTTCCAGCGTTTCCTGTCTT-3'		
TXN (f)	5'-CTTGGACGCTGCAGGTGATA-3'	58°C	150 pb
TXN (r)	5'-TCCTGACAGTCATCCACATCT-3'		
PXN (f)	5'-GGGAACCTGGTTGAACCCC-3'	58°C	99 pb
PXN (r)	5'-TGGCATAACAGCTGTGGCTT-3'		
GAPDH (f)	5'-CAAAATCAAGTGGGGCGATGCTG-3'	69°C	283 pb
GAPDH (r)	5'-TGTGGTCATGAGTCCTTCCACGAT-3'		

(f): forward, (r): reverse, pb: pares de bases

Análisis estadístico: los datos fueron analizados estadísticamente utilizando el software SigmaPlot 12 (Jandel, USA). Pruebas paramétricas o no paramétricas procedieron de acuerdo al test Shapiro-Wilk que realiza el software. Para comparar condiciones experimentales de antes y después utilizamos t-student pareado o Wilcoxon. La comparación de más de dos grupos experimentales se realizó por ANOVA o Kruskal-Wallis, con la prueba post-hoc Bonferroni o Dunns, según la naturaleza de los datos. Un *p-value* menor a 0.05 se consideró estadísticamente significativo.

7. Resultados

Impacto antioxidante de CAPE y quercetina en células Caco-2 intactas

a) Sobre la señal basal del biosensor HyPer

Las células Caco-2 que expresan el biosensor fluorescente fueron expuestas por 24 horas a quercetina (5 μM) y CAPE (10 μM) y la razón de fluorescencia obtenida de la línea base fue comparada con células control, es decir, expuestas sólo al vehículo (0.1% dimetilsulfóxido), ver figura 4. La señal basal del biosensor integra tanto los eventos de oxidación que ocurren sobre los tioles presentes en el biosensor, provocados por el H_2O_2 endógeno, y los eventos de restauración de los enlaces disulfuro, ejecutados por la maquinaria antioxidante del citoplasma. En consecuencia, este parámetro reporta el estado estacionario del ambiente redox del citoplasma en células vivas. Como se aprecia en la figura 4, el tratamiento con CAPE provocó un aumento de la señal HyPer, mientras quercetina la disminuyó.

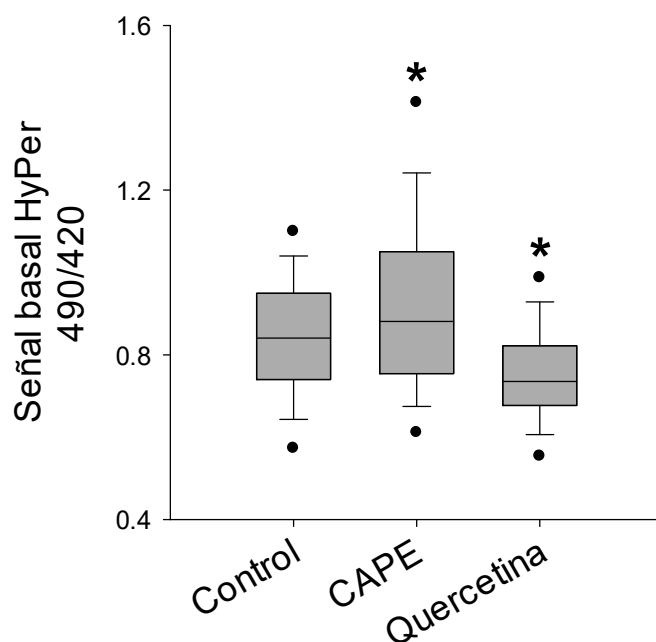


Figura 4. Efecto de CAPE y quercetina sobre la señal basal del biosensor HyPer expresado en células Caco-2. Las células Caco-2, previamente infectadas con el adenovirus que porta el biosensor HyPer, fueron expuestas por 24 horas con las siguientes concentraciones: ácido caféico 10 μ M (CAPE) o 5 μ M para quercetina. La señal HyPer se expresa como la razón de fluorescencia obtenida al excitar con 490 y 420 nm. Las cajas de datos están delimitadas por los valores entre el 25 y 75%, mientras que la línea horizontal representa la mediana. Las barras de error ilustran la dispersión entre el 5 y el 95 % de los valores. Los datos provienen de al menos 5 experimentos independientes que comprenden entre 122 y 389 registros. El asterisco indica la diferencia estadística con respecto al grupo control obtenida por Dunn`s test (Kruskal-Wallis).

b) Efecto de CAPE y quercetina sobre la respuesta del biosensor frente a un pulso de H₂O₂ exógeno

Con el propósito de evaluar si el tratamiento con estos compuestos fenólicos se traduce en una mayor protección frente a la oxidación por un estímulo externo, expusimos las células Caco-2 a un pulso de H₂O₂ de 50 µM, el grado de oxidación del biosensor alcanzado por este estímulo se expresa como porcentaje del máximo valor alcanzado con un pulso de H₂O₂ 500 µM, ejecutado al final de cada registro con el objetivo de oxidar completamente al biosensor. Bajo este enfoque experimental, sólo el tratamiento con CAPE disminuyó la respuesta del biosensor frente al pulso de H₂O₂ de 50 µM, en cambio quercetina no provocó ningún cambio en la señal de HyPer (figura 5).

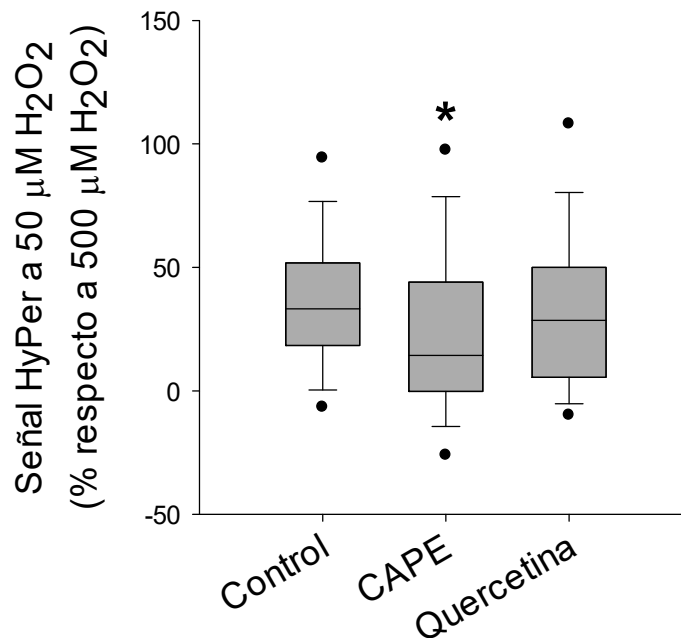


Figura 5. Efecto de CAPE y quercetina sobre la respuesta del biosensor frente a un pulso de H₂O₂ 50 μM. Las células Caco-2, previamente infectadas con el adeno-HyPer, fueron expuestas por 24 horas a CAPE 10 μM o 5 μM para quercetina. La respuesta del biosensor a un pulso moderado de 50 μM H₂O₂, está expresada como porcentaje de la máxima señal alcanzada con H₂O₂ 500 μM. Los datos y su dispersión están representados por gráficos de caja, cuyos límites representan el 25 y 75% de los valores, mientras que la línea horizontal representa la mediana. Las barras de error ilustran la dispersión entre el 5 y el 95% de los valores. Los datos provienen de al menos 5 experimentos independientes que consisten entre 81 a 350 registros. El asterisco indica la diferencia respecto al grupo control obtenida por Dunn's test (Kruskal-Wallis).

Los resultados obtenidos con el biosensor, sugieren que CAPE interactúa con la maquinaria celular y modifica el tono redox en estado estacionario, es decir, en presencia de una producción de H₂O₂ endógena y también, frente a un estímulo exógeno que sobrepasa los niveles intracelulares de H₂O₂. Los cambios observados en la señal HyPer podrían ser reflejo de un aumento en la eficiencia de la maquinaria antioxidante celular inducida por el ácido cafeico que explicaría una menor respuesta del biosensor frente al pulso de H₂O₂ 50 μM. Para examinar este punto, determinamos la abundancia de transcritos que codifican para algunas enzimas antioxidantes citoplasmáticas en células tratadas con estos fitocompuestos.

Estos resultados corresponden al objetivo específico 1 planteado inicialmente en esta tesis.

c) Efecto de CAPE y quercetina sobre la expresión de enzimas antioxidantes

Nuestro próximo paso consistió en evaluar si el tratamiento por 24 horas con los fenoles seleccionados afecta también la expresión de enzimas antioxidantes como, superóxido dismutasa-1, tioredoxina-1 y peroxirredoxina-1. En la figura 6 se compara el efecto de CAPE y quercetina sobre la abundancia de los transcritos para estos tres representantes de la maquinaria antioxidante celular. La incubación con quercetina generó un aumento en la expresión transcripcional de las tres enzimas evaluadas. El tratamiento con CAPE, en cambio, fue eficaz sólo para aumentar la expresión de peroxirredoxina-1 y superóxido dismutasa-1.

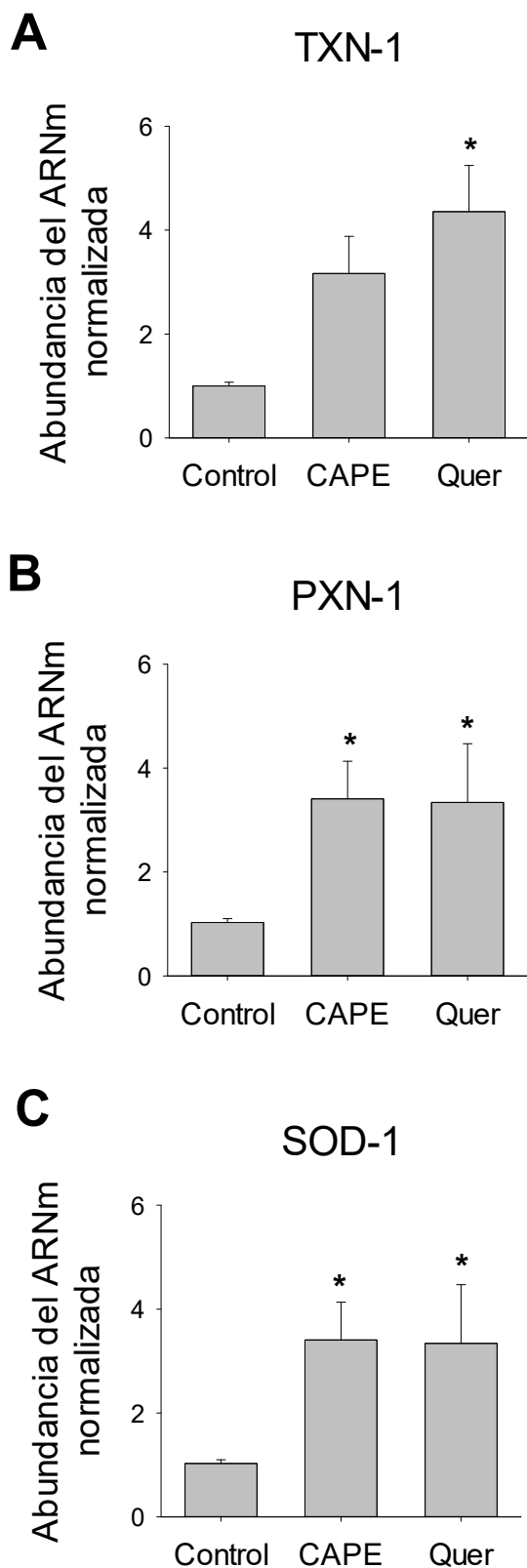


Figura 6. El tratamiento con CAPE y quercetina aumenta los niveles de transcritos para enzimas antioxidantes en células Caco-2. Las células Caco-2 fueron expuestas por 24 horas a CAPE 10 μ M o quercetina 5 μ M. Transcurrido este tiempo, el ARN total fue aislado y la presencia de mensajeros para Tiorredoxina-1 (TXN-1) (**A**), Peroxirredoxina-1 (PXN-1) (**B**) y Superóxido dismutasa-1 (SOD-1) (**C**) fue determinada por qPCR. La abundancia de los transcritos de interés fue relativizada al ARN mensajero que codifica para la enzima GAPDH.

Los datos están expresados como promedios \pm ES y provienen de al menos 5 experimentos independientes consistentes en 10 muestras. Los asteriscos indican la diferencia comparada con el control obtenida por ANOVA de una cola (Kruskal-Wallis, Dunn`s test).

Vale destacar que sólo quercetina aumenta los niveles de transcritos para tioredoxina-1, no así el ácido cafeico, lo cual podría significar que tiene el potencial para aumentar la actividad de esta enzima. Por consiguiente, evaluamos si el tratamiento con quercetina afecta la tasa de recuperación del biosensor oxidado. Este fenómeno ocurre espontáneamente cuando se retira el H₂O₂ del medio extracelular, fase que denominamos “*recovery*” (figura 3), esta cinética de recuperación no fue modificada por el tratamiento con CAPE [$t_{1/2\text{CAPE}} 63 \pm 14$; $t_{1/2\text{Control}} 95 \pm 29$ s] (figura 7A). El tratamiento con quercetina, por otra parte, generó una pendiente de recuperación aun en presencia de H₂O₂ 500 μM, impidiendo el análisis presentado en la figura 7A. Sin embargo, comparamos las velocidades de recuperación de la señal HyPer en células tratadas con los fitocompuestos y no tratadas (figura 7B) en presencia de peróxido extracelular. El análisis de la pendiente de las curvas indica que el citoplasma de células Caco-2 tratadas con quercetina reduce al biosensor 4.6 veces más rápido que las células no tratadas, el tratamiento con CAPE, por otra parte, es similar a la condición control (quercetina, -0.129 ± 0.004 min⁻¹; control, 0.028 ± 0.010 min⁻¹; CAPE, 0.005 ± 0.009 min⁻¹). Estos resultados indican que ambos tratamientos, CAPE y quercetina, afectan la abundancia de transcritos para algunas enzimas antioxidantes y la respuesta del biosensor redox. Sin embargo, sólo las células expuestas a quercetina presentan un aumento significativo de la tioredoxina-1, lo cual está en línea con una mayor eficiencia de la maquinaria reductora de puentes disulfuro reportada por el biosensor.

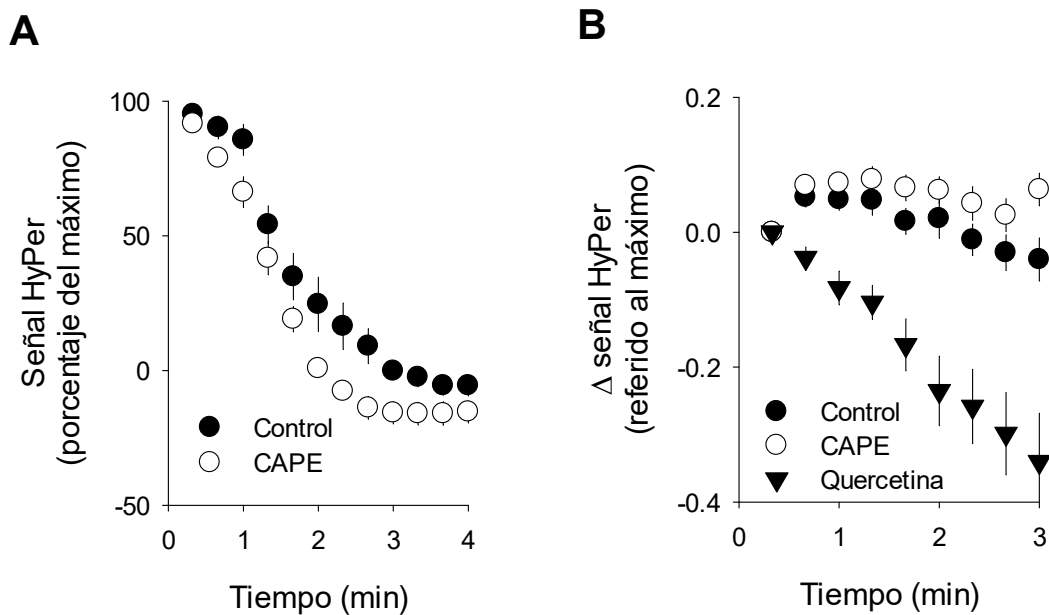


Figura 7. Sólo quercetina acelera la reducción del biosensor HyPer en células Caco-2. La señal HyPer fue determinada en células Caco-2 48 horas después de la infección con Adeno-HyPer. El día del registro, estas células fueron preincubadas por 4-6 horas con CAPE 10 μM o Quercetina 5 μM . En **A**, se compara el efecto de CAPE (círculos negros) sobre la cinética en la recuperación del biosensor oxidado justo después de lavar un pulso de H_2O_2 500 μM), punto experimental al cual se le asigna un 100% de oxidación. La señal HyPer proveniente de células control está representada por círculos vacíos. En **B**, se compara los cursos temporales de la señal HyPer en presencia del pulso de H_2O_2 500 μM en células control (círculos negros); tratadas con CAPE (círculos vacíos) y quercetina (triángulos negros). La recuperación del biosensor se visualiza con la máxima señal del biosensor oxidado como punto de partida. Los datos corresponden al promedio \pm error estándar de al menos 4 experimentos independientes que contienen el siguiente número de registros: Control=16; CAPE=9; Quercetina=13.

Implementación de un modelo de inflamación *in vitro* con células Caco-2 diferenciadas

Nuestro siguiente desafío experimental consistió en contar con una plataforma celular capaz de presentar un perfil pro-inflamatorio factible de ser evaluado por la expresión o secreción de citoquinas. Para tales efectos, cultivamos a las células Caco-2 sobre una membrana dispuesta en un arreglo bicameral, de manera tal que podemos manipular el compartimiento apical y basolateral a voluntad (Ver esquema en anexo).

La proliferación celular y la subsecuente formación de una barrera celular que separe estos compartimientos fue monitoreada periódicamente registrando la resistencia eléctrica a través de este arreglo celular. Bajo nuestras condiciones experimentales, observamos que la monocapa formó una barrera con una resistencia eléctrica transepitelial (TEER) superior a $300 \Omega \cdot \text{cm}^2$ después del noveno día, un valor considerado óptimo(27). Una vez establecida la resistencia eléctrica deseada, tratamos a nuestras monocapas con: LPS; IL-1 β y *Listeria monocytogenes* en la cara apical de la bi-cámara, con el propósito de inducir una respuesta inflamatoria, sin embargo, estas condiciones no afectaron el TEER de nuestros cultivos ni tampoco fue detectable la secreción de TNF- α en el basolateral, indicando que la integridad de la monocapa no fue perturbada y que la superficie apical del arreglo celular fue resistente a estos estímulos nocivos.

Posteriormente, ensayamos una segunda estrategia que consistió en exponer las células por 30 minutos a H₂O₂ 500 μM , este tratamiento fue efectivo para perturbar la integridad de la monocapa (figura 8) puesto que el TEER sufrió una disminución del 48% (Control 617 ± 39 versus tratadas H₂O₂ $342 \pm 69 \Omega \cdot \text{cm}^2$). La preincubación de las células con CAPE y quercetina no evitó esta caída en la resistencia eléctrica de la monocapa.

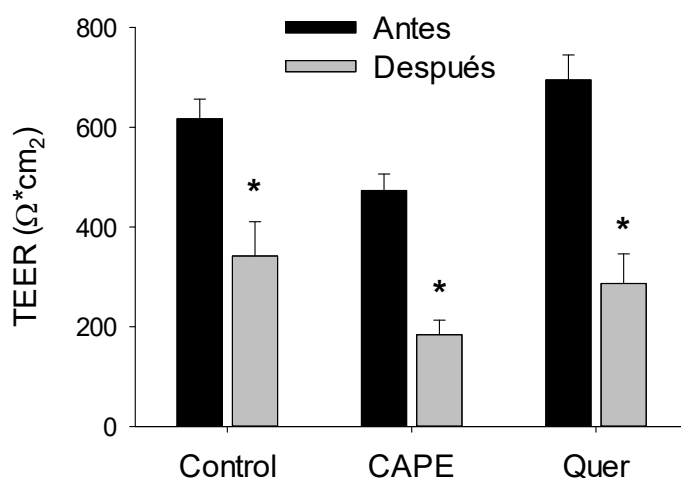
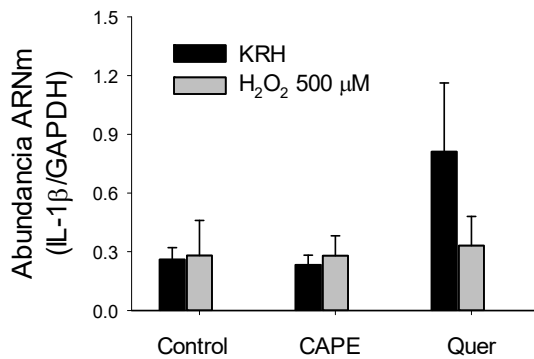


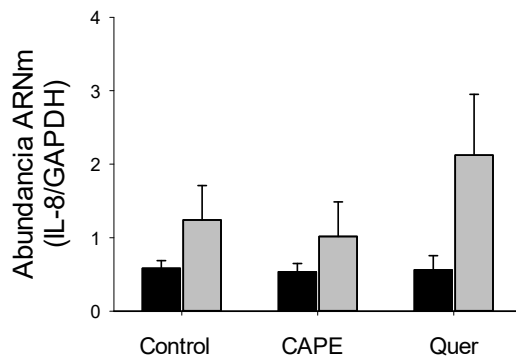
Figura 8. El tratamiento con CAPE y Quercetina no evita la disminución de la resistencia eléctrica transepitelial inducida por H₂O₂ exógeno en células Caco-2. Pocillos de células Caco-2 sembradas en bi-cámaras semipermeables con un TEER superior a 300 Ω*cm² fueron tratadas por 24 horas con ácido cafeico 10 μM (CAPE), quercetina 5 μM (Quer) o dejadas en su respectivo medio de cultivo (Control). Al día siguiente, se midió la resistencia eléctrica del pocillo **antes** y **después** de ser expuestas a H₂O₂ 500 μM por 30 minutos. Los datos corresponden al promedio ± ES de 11 muestras biológicas para control; 6 para CAPE y 7 para Quer, provenientes de 5 experimentos independientes. El símbolo * indica la diferencia respecto al grupo control obtenida por t-test pareado.

La Figura 9 muestra la abundancia relativa para los mensajeros de ARN para las citoquinas IL-1 β , IL-8 e IL-25 en células tratadas como se menciona arriba. Nuestros resultados indican que el tratamiento agudo con H₂O₂ disminuyó el TEER y que el tratamiento previo con CAPE y quercetina no impidió este fenómeno. Sin embargo, los niveles de transcritos para la enzima GAPDH utilizada como *housekeeping* en células tratadas y no tratadas con H₂O₂ son similares (cq control 16.1 \pm 0.7; cq H₂O₂ 15.0 \pm 0.4). Respecto a los ARNm para las citoquinas mencionadas, el tratamiento con H₂O₂ no indujo un aumento en los niveles de transcritos.

A



B



C

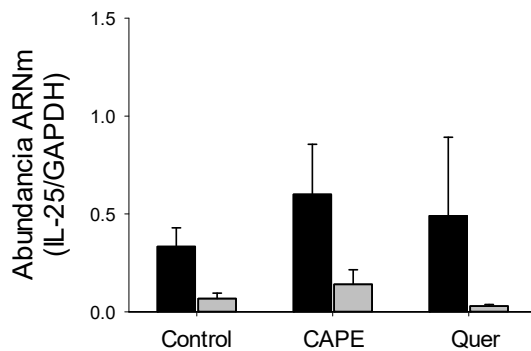


Figura 9. Efecto de CAPE y quercetina sobre la expresión de citoquinas proinflamatorias en monocapas de células Caco-2. Monocapas de células Caco-2 sembradas en Transwell®, con un TEER superior a 300 Ω*cm², fueron tratadas por 24 horas con CAPE 10 μM o quercetina 5 μM. Luego, fueron expuestas por 30 minutos a H₂O₂ 500 μM o en el tampón KRH y el ARN total fue aislado 1.5 horas después. Los transcritos para IL-1β, IL-8 e IL-25 fueron determinados por qPCR. La abundancia relativa de transcritos fue expresada en función de los niveles del ARN mensajero (ARNm) para la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Los datos corresponden al promedio ± ES de al menos 5 muestras provenientes de 3 experimentos independientes.

8. Discusión

En este trabajo se investigó el impacto antioxidante de dos polifenoles dietarios, ácido cafeico y quercetina, sobre células Caco-2. Además, se investigó su potencial efecto inmunomodulador en este modelo celular sometido a peróxido de hidrógeno. Nuestro enfoque experimental nos permitió observar eventos de oxidación y reducción de proteínas citoplasmáticas en células vivas, aspecto fundamental para brindar relevancia biológica al fenómeno observado. Por otra parte, el impacto de estos compuestos sobre la producción de citoquinas fue evaluado en un arreglo de células Caco-2 diferenciadas, de alto pasaje celular, con alta resistencia eléctrica transepitelial.

Evaluación del impacto antioxidante en células Caco-2 intactas

Para evaluar la capacidad antioxidante de estos polifenoles, usamos el biosensor fluorescente HyPer, el cual sólo es oxidable por H_2O_2 . La oxidación del par de cisteínas del biosensor, C199 y C208, forma un enlace disulfuro, que provoca un cambio en el espectro de emisión fluorescente de HyPer. Este fenómeno intramolecular es revertido espontáneamente por la maquinaria antioxidante residente en el citoplasma, tales como las glutaredoxinas y tioredoxinas(25,28-29). La reversibilidad de la señal HyPer permite combinar un protocolo de pulsos de H_2O_2 que, en conjunto, permite monitorear el nivel redox de células vivas en tres situaciones: estado estacionario, oxidación del biosensor, y la recuperación del biosensor oxidado. Estas propiedades colocan a HyPer en ventaja en comparación con otros indicadores sintéticos para la detección de H_2O_2 en células, como por ejemplo 2,7-diclorodihidrofluoresceína (DCFH), dihidrorodamina 123 (DHR), Peroxy Green 1 (PG1), los cuales reaccionan inespecífica e irreversiblemente con otros ROS(54). Además, las señales de estos indicadores químicos es vulnerable a artefactos asociados al registro con células vivas tales como, cambios de volumen celular y *photobleaching/quenching*, entre otros(28).

Nuestros resultados muestran que el ácido cafeico y la quercetina modifican el ambiente redox citoplasmático de células Caco-2 en el estado estacionario o equilibrio (figura 4); mientras el ácido cafeico aumenta la señal basal, quercetina la disminuye. Al exponer las células a un pulso de H_2O_2 , sólo el tratamiento con CAPE protegió al biosensor de la oxidación, ya que el aumento de la señal HyPer inducido por H_2O_2 fue menor comparado con la condición no tratadas (control) o tratadas con quercetina. Para entender el efecto de CAPE, tanto en la señal basal como la respuesta del biosensor frente a H_2O_2 exógeno, evaluamos la abundancia de ARN mensajeros de algunas enzimas redox citoplasmáticas. Un aumento combinado de la SOD-1 y la PRX-1 está en línea con un incremento en la señal basal, puesto que existiría una mayor producción de H_2O_2 derivada de la dismutación de anión superóxido y una mayor abundancia de PRX-1 lo que facilita la oxidación de proteínas ya que este componente del sistema redox funciona como un sistema de transferencia de equivalentes oxidantes, como ha sido demostrado por Stocker et al., recientemente(28,30). Para explicar el comportamiento del biosensor frente a la adición de H_2O_2 , debemos considerar la entrada de este agente oxidante al citoplasma. La entrada del peróxido de hidrógeno por la membrana plasmática (MP), paso que es mediado por la presencia de aquaporinas (AQPs) en la MP, que a su vez determinan la cinética de la señal HyPer en células vivas(31). Nuestros resultados indican que CAPE aumenta la abundancia de PRX-1, al menos a nivel del ARN mensajero, lo cual significa que el tratamiento con CAPE debe necesariamente modificar otro aspecto celular que contrarreste el efecto oxidante del H_2O_2 , como, por ejemplo, un efecto tipo *scavenger* o una disminución de las AQPs en la MP de las células Caco-2. Este último aspecto no fue experimentalmente abordado en este trabajo, sin embargo, la importancia de las AQP-3 en la cinética de la señal HyPer ha sido reportada(32) y podría explicar el efecto protector de CAPE sobre la señal HyPer que registramos.

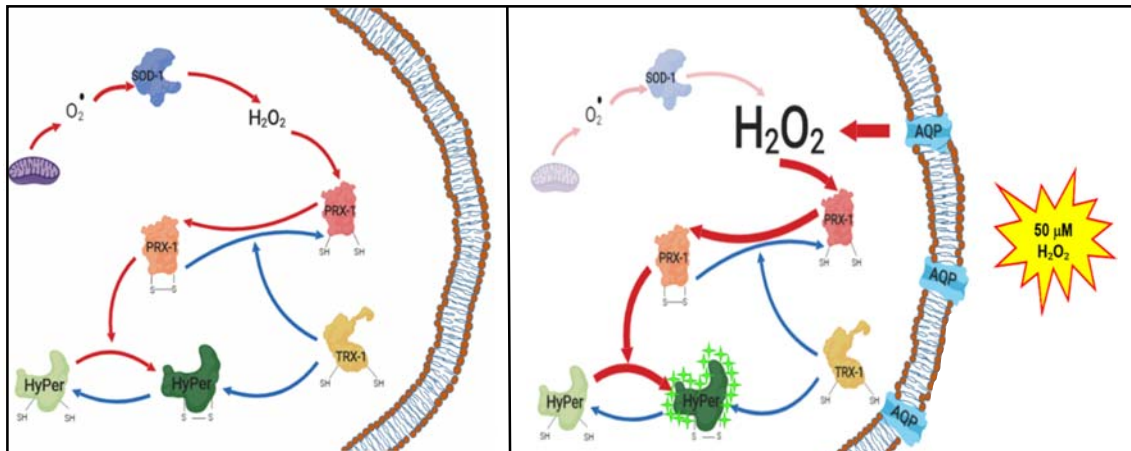
La regulación de la permeabilidad de la MP a H_2O_2 extracelular en el epitelio intestinal podría estar acoplado a la producción *in situ* por parte de la DUOX2, enzima ubicada en la membrana apical de enterocitos tanto en modelos animales como en humanos(55). La producción de H_2O_2 por esta entidad es del orden nanomolar(55), sin embargo, estos niveles fueron detectados en lisados de muestras colonicas frescas y por lo tanto, carecen de arquitectura epitelial necesaria para estimar los niveles de H_2O_2 que podría enfrentar localmente una membrana apical de intestino. Otros reportes, sin embargo, indican que la sensibilidad de HyPer es apropiada para registrar la actividad de los complejos NOX en membranas de células en cultivo(57). DUOX2 está presente en células Caco-2 post-confluentes (55), lo que permite explicar el efecto de quercetina que observamos en condiciones basales o de estado-estacionario, es decir, quercetina disminuiría la actividad de esta enzima y la maquinaria endógena antioxidante reduce al biosensor, que se observa como una disminución de la señal HyPer. Este efecto se pierde si aplicamos H_2O_2 exógenamente, ya que en estas circunstancias la hipotética actividad de DUOX2 sería marginal.

Es interesante destacar que sólo el tratamiento con quercetina aumentó los niveles de ARN mensajero para tioredoxina-1, una enzima redox implicada en la reducción de puentes disulfuro(33). En línea con esta actividad enzimática, la recuperación de la señal del biosensor oxidado, que describe la reducción de las cisteínas oxidadas, fue notablemente más rápida en células tratadas con quercetina (figura 7B), un fenómeno que fue observado incluso en presencia del H_2O_2 . El tratamiento con CAPE, por otra parte, no eleva significativamente los niveles de ARNm de TXN-1 y tampoco muestra un efecto comparable al de quercetina; sólo pudimos observar un cambio discreto en la velocidad de recuperación de la señal HyPer una vez retirado el estímulo oxidante.

A continuación, presentamos un modelo para explicar los resultados obtenidos de acuerdo a la estrategia experimental utilizada:

A. Estado estacionario

B. Aplicación de H₂O₂ exógeno

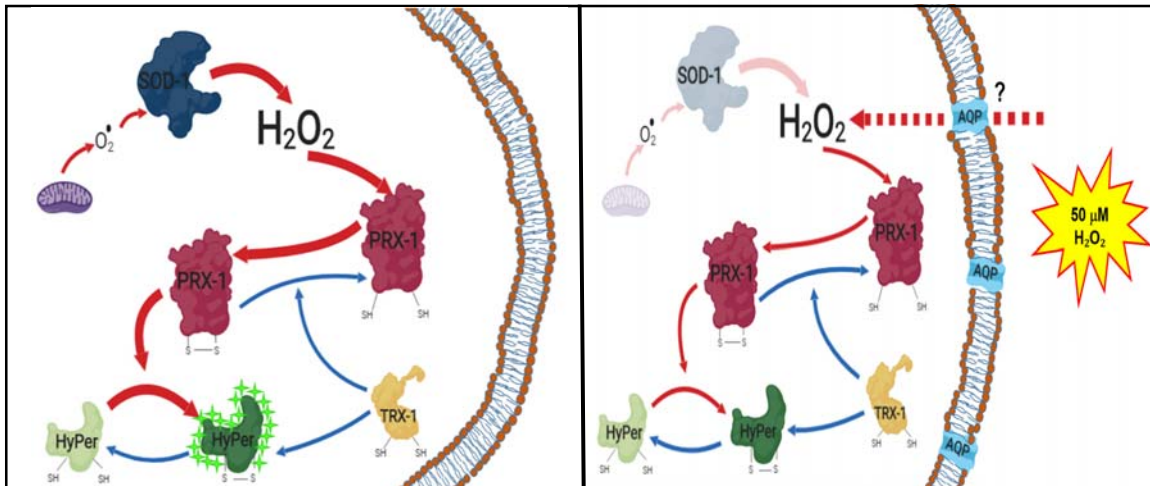


Esquema que ilustra la relación de algunas enzimas involucradas en reacciones redox celulares de acuerdo al comportamiento del biosensor y la estrategia experimental utilizada.

- A. En el estado estacionario, el O₂^{•-} generado endógenamente por los complejos mitocondriales I y III, por ejemplo, es convertido en H₂O₂ por acción de la superóxido dismutasa-1 (SOD-1). Los equivalentes oxidantes del H₂O₂ son transmitidos a los grupos tioles por la peroxiredoxina-1 (PRX-1) citoplasmática, la consiguiente formación de puentes disulfuro sobre proteínas es revertida por la acción reductora de la tiorredoxina-1 (TRX-1), equilibrio que afecta al biosensor HyPer y genera una señal basal.
- B. Al aplicar H₂O₂ extracelular 50 μM se desplaza el equilibrio redox hacia una oferta de equivalentes oxidantes que depende de: i) la permeabilidad de la membrana plasmática a H₂O₂ mediada por aquaporinas (AQP), principalmente; ii) la abundancia de PRX-1 y iii) el poder reductor de las TRX-1. Bajo este escenario, el biosensor sufre la oxidación de sus cisteínas y cambia su espectro de fluorescencia.

C. Estado estacionario en células tratadas con CAPE

D. Aplicación de H₂O₂ exógeno en células tratadas con CAPE



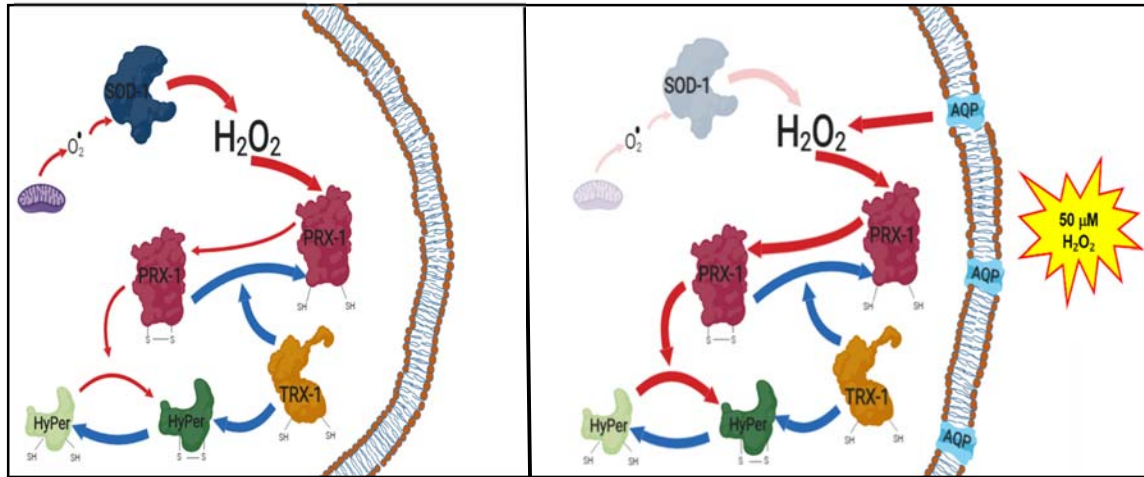
Esquema en células Caco-2 tratadas con CAPE.

C. Un aumento combinado de la SOD-1 y la PRX-1 facilita la oxidación del biosensor. En este cuadro, las TRX-1 no son capaces de contrarrestar el desplazamiento del equilibrio y una proporción mayor de moléculas del biosensor resultan oxidadas.

D. La aplicación de H₂O₂ exógeno en células tratadas con CAPE, al igual que en la situación control, excede por lejos a la producción endógena. Sin embargo, no se observan cambios en la respuesta del biosensor, ya que una proporción de moléculas HyPer está oxidada basalmente. Alternativamente, no es descartable que el tratamiento con este fitocompuesto altere la permeabilidad del H₂O₂ a nivel de la membrana plasmática.

E. Estado estacionario en células tratadas con quercetina

F. Aplicación de H₂O₂ exógeno en células tratadas con quercetina



Esquema en células Caco-2 tratadas con quercetina.

E. En células tratadas con quercetina, el aumento de la SOD-1 y la PRX-1, que podría dar cuenta del poder oxidante intracelular, es contrarrestado por el aumento en las TRX-1, su acción reductora es más eficiente que la oxidación y la proporción de moléculas reducidas del biosensor es mayor que el observado en células sin tratar, en consecuencia, su señal basal es menor que el control.

F. En esta situación, la aplicación de H₂O₂ exógeno, que excede el poder oxidante endógeno, no provoca la oxidación del biosensor, debido al efecto protector generado por una mayor abundancia de TRX-1.

Modelo *in vitro* de epitelio intestinal humano

Para evaluar la capacidad anti inflamatoria de CAPE y quercetina, utilizamos células Caco-2 cultivadas sobre una superficie porosa que permite el acceso al lado apical y basolateral(34-37). Bajo estas condiciones de cultivo, la superficie apical de este arreglo celular, examinada mediante microscopía electrónica de barrido, presentó un patrón totalmente distinto al de las células sembradas en cubreobjetos, las cuales presentan microvellosidades bien organizadas con un tamaño promedio de $0.72 \pm 0.01 \mu\text{m}$, observadas también por otros investigadores(38,39) (figura 2). Sorprendentemente, cuando estas células son crecidas en membranas semipermeables, estas microvellosidades lucen cubiertas por material extracelular, muy similar al encontrado en cocultivos de células HT29 y Caco-2, cuya apariencia fue adjudicada al moco apical(39-40). Aun cuando las células Caco-2 son concebidas como no secretoras de moco, nuestro modelo consistió en utilizar Caco-2 de alto pasaje (p95-p105) con el propósito de contar con un modelo más diferenciado(27,41). En línea con esta idea, observamos que al noveno día de cultivo *in vitro*, el TEER registrado fue consistentemente superior a $300 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (figura 1), utilizado como el mínimo necesario para adjudicar la integridad a la monocapa de células Caco-2.

Una vez establecido este arreglo celular, utilizamos LPS, IL-1 β y *Listeria monocytogenes* vivas para perturbar la integridad de la monocapa y evocar una respuesta pro-inflamatoria intestinal(15,42-45). No obstante, estos agresores fueron incapaces de provocar una caída del TEER, y de provocar una respuesta inflamatoria, es decir, la monocapa de Caco-2 exhibía una resistencia a estos estímulos nocivos, quizás debido al efecto combinado de moco apical y/o a la actividad de la fosfatasa alcalina presente en la interface apical(46). Sin embargo, logramos disminuir en un ~50% el TEER al exponer nuestras células a H₂O₂ 500 μM por media hora, un agente previamente utilizado para inducir daño en monocapas de células Caco-2, registrado por una disminución en el TEER(47) y también, para promover la secreción y expresión de IL-8 en cultivos de células

Caco-2(48). Este modelo de perturbación de la integridad de la monocapa fue evaluado en células tratadas con CAPE y quercetina, ambos tratamientos no fueron protectores de la agresión del H₂O₂ exógeno. Es evidente, según nuestros registros, que CAPE protegería de la oxidación a proteínas citoplasmáticas, como ha sido reportado por el biosensor(25), sin embargo, no es capaz de impedir el efecto deletéreo del H₂O₂ sobre la integridad de la monocapa. Debemos considerar que las uniones estrechas entre células Caco-2, que determinan la resistencia eléctrica del arreglo celular, están expuestas al peróxido de hidrógeno exógeno y quizás, son más vulnerables al efecto directo del peróxido apical, sensibilidad que ha sido reportada por otros investigadores(47,49), donde un arreglo similar al nuestro exhibe perturbaciones mayores del TEER cuando el H₂O₂ es aplicado por el lado apical y menor cuando el estímulo es aplicado por el basolateral.

A pesar de que la adición de H₂O₂ (0.5 mM; 30 min) disminuyó el TEER de nuestro modelo experimental, la determinación de los niveles de transcritos para citoquinas pro-inflamatorias estudiados, IL-1 β , IL-8 e IL-25 (figura 10) no mostró cambios significativos. A diferencia de la IL-1 β , las citoquinas IL-8 y IL-25 han sido vinculadas a una secreción local del epitelio intestinal y dérmico(20,50-51) y en otros grupos que usan Caco-2 como modelo, la expresión y secreción de IL-8 aumenta al ser expuestas a H₂O₂ a concentraciones mayores a 1 mM y con tiempos de exposición mayores a una hora(48,52) condiciones más agresivas que las empleadas por nosotros y que podrían ser exploradas en el futuro.

Este modelo de epitelio intestinal *in vitro* ha sido ampliamente utilizado para la evaluación de la bioactividad de diversos compuestos dietarios, sin embargo, la interacción de estos compuestos con fluidos del lumen gastrointestinal ha sido evadido, puesto que las actividades residuales de enzimas y algunos compuestos críticos como las sales biliares son deletéreos para la integridad celular. Esta dificultad es un desafío para desarrollar un dispositivo celular epitelial compatible con aspectos de la fisiología intestinal.

9. Conclusiones

- CAPE y quercetina impactan sobre la homeostasis redox de células Caco-2 vivas, modificando la señal del biosensor HyPer y aumentando los transcritos para enzimas antioxidantes citoplasmáticas:
 - CAPE protege de la oxidación inducida por H₂O₂ exógeno, junto con aumentar la expresión relativa de SOD-1 y PRX-1.
 - Quercetina aumenta la actividad reductora de puentes disulfuro en el citoplasma en línea con un aumento en la expresión del mensajero para TRX-1.
- Las células Caco-2 de alto pasaje dispuestas en una membrana semipermeable exhiben un fenotipo apical distinto al del cultivo convencional sobre vidrio.
- El tratamiento con H₂O₂ (0.5 mM, 30 min) apical indujo una disminución del TEER en células Caco-2 diferenciadas sin gatillar la posterior producción de citoquinas proinflamatorias.

10. Referencias

1. Williamson G, Clifford M. Role of the small intestine, colon and microbiota in determining the metabolic fate of polyphenols. *Biochem Pharmacol.* 2017;(139):24–39.
2. Ganesan K, Xu B. A Critical Review on Polyphenols and Health Benefits of Black Soybeans. *Nutrients.* 2017;5(9).
3. Zamora-Ros R, Knaze V, Rothwell J, Hémon B, Moskal A, Overvad K, et al. Dietary polyphenol intake in Europe: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Eur J Nutr.* 2016;4(55):1359–75.
4. Wang H, Liu X, Long M, Huang Y, Zhang L, Zhang R, et al. No Title. *Sci Transl Med.* 2016;334(8).
5. Upadhyay S, Dixit M. Role of Polyphenols and Other Phytochemicals on Molecular Signaling. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;
6. Omodanisi E, Aboua Y, Oguntibeju O. Assessment of the Anti-Hyperglycaemic, Anti-Inflammatory and Antioxidant Activities of the Methanol Extract of *Moringa Oleifera* in Diabetes-Induced Nephrotoxic Male Wistar Rats. *Molecules.* 2017;4(22).
7. Boueiz A, Damarla M, Hassoun P. Xanthine oxidoreductase in respiratory and cardiovascular disorders. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008;5(294):830–40.
8. Bae Y, Oh H, Rhee S, Yoo Y. Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling. *Mol Cells.* 2011;6(32):491–509.
9. Deshmukh P, Unni S, Krishnappa G, Padmanabhan B. The Keap1-Nrf2 pathway: promising therapeutic target to counteract ROS-mediated damage in cancers and neurodegenerative diseases. *Biophys Rev.* 2017;1(9):41–56.
10. Hinchey E, Gruszczyc A, Willows R, Navaratnam N, Hall A, Bates G, et al. Mitochondria-derived ROS activate AMP-activated protein kinase (AMPK) indirectly. *J Biol Chem.* 2018;44:17208–17217.
11. Yoo S, TW S, Deng Q, Huttenlocher A. Lyn is a redox sensor that mediates leukocyte wound attraction in vivo. *N U R E.* 2011;480:109–12.

12. Idelchik M, Begley U, Begley T, Melendez J. Mitochondrial ROS control of cancer. *Semin Cancer Biol.* 2017;(47):57–66.
13. De Santis S, Cavalcanti E, Mastronardi M, Jirillo E, Chieppa M. Nutritional Keys for Intestinal Barrier Modulation. *Front Immunol.* 2015;
14. Van Spaendonk, H Ceuleers H, Witters L, Patteet E, Joossens J, Augustyns K, Lambeir A, et al. Regulation of intestinal permeability: The role of proteases. *World J Gastroenterol.* 2017;12(23):2106–23.
15. Manresa M, Taylor C. Hypoxia Inducible Factor (HIF) Hydroxylases as Regulators of Intestinal Epithelial Barrier Function. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2017;3(3):303–15.
16. Finamore A, Massimi M, Conti Devirgiliis L, Mengheri E. Zinc deficiency induces membrane barrier damage and increases neutrophil transmigration in Caco-2 cells. *J Nutr.* 2008;9(138):1664–70.
17. Shen Y, Zhou M, Yan J, Gong Z, Xiao Y, Zhang C, et al. miR-200b inhibits TNF- α -induced IL-8 secretion and tight junction disruption of intestinal epithelial cells in vitro. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2017;2(312):123–32.
18. Carrasco-Pozo C, Tan K, Reyes-Farias M, De La Jara N, Ngo S, Garcia-Diaz D, et al. The deleterious effect of cholesterol and protection by quercetin on mitochondrial bioenergetics of pancreatic β -cells, glycemic control and inflammation: In vitro and in vivo studies. *Redox Biol.* 2016;(9):229–43.
19. Carasi P, Racedo S, Jacquot C, Elie A, Serradell M, Urdaci M. *Enterococcus durans* EP1 a Promising Anti-inflammatory Probiotic Able to Stimulate sIgA and to Increase *Faecalibacterium prausnitzii* Abundance. *Front Immunol.* 2017;(8).
20. Park H, Lee S, Hong S. Regulation of Allergic Immune Responses by Microbial Metabolites. *Immune Netw.* 2018;1(18).
21. Suzuki T, Hara H. Quercetin Enhances Intestinal Barrier Function through the Assembly of Zonula Occludens-2, Occludin, and Claudin-1 and the Expression of Claudin-4 in Caco-2 Cells. *J Nutr.* 2009;5(139):965–74.
22. Fitzpatrick L, Wang J, Le T. Caffeic acid phenethyl ester, an inhibitor of

- nuclear factor-kappaB, attenuates bacterial peptidoglycan polysaccharide-induced colitis in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001;3(299):915–20.
23. Ferrari D, Cimino F, Fratantonio D, Molonia M, Bashllari R, Busà R, et al. Cyanidin-3-O-Glucoside modulates the in vitro inflammatory crosstalk between intestinal and endothelial cells. *Mediat Inflamm.* 2017;2017.
 24. Belousov V, Fradkov A, Lukyanov K, Staroverov D, Shakhbazov K, Terskikh A, et al. Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nat Methods.* 2006;4(3):281–6.
 25. Hernández H, Parra A, Tobar N, Molina J, Kallens V, Hidalgo M, et al. Insights into the HyPer biosensor as molecular tool for monitoring cellular antioxidant capacity. *Redox Biol.* 2018;16:199–208.
 26. Pfaffl M. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;9(29).
 27. Hubatsch I, Eva R, Artursson P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nat Protoc.* 2001;2:2111–9.
 28. Bilan D, Belousov V. HyPer Family Probes: State of the Art. *Antioxid Redox Signal.* 2016;24(13):731–51.
 29. Arnér E, Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem.* 2000;267:6102–9.
 30. Stöcker S, Maurer M, Ruppert T, Dick T. A role for 2-Cys peroxiredoxins in facilitating cytosolic protein thiol oxidation. *Nat Chem Biol.* 2018;14(2):148–55.
 31. Medraño-Fernandez, I Bestetti S, Bertolotti M, Bienert G, Bottino C, Laforenza U, Rubartelli A, et al. Stress Regulates Aquaporin-8 Permeability to Impact Cell Growth and Survival. *Antioxid Redox Signal.* 2016;24(18):1031–44.
 32. Thiagarajah J, Chang J, Goettel J, Verkman A, Lencer W. Aquaporin-3 mediates hydrogen peroxide-dependent responses to environmental stress in colonic epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(3):568–73.
 33. Wang C, Shen M, Zhang N, Wang S, Xu Y, Chen S, et al. Reduction Impairs

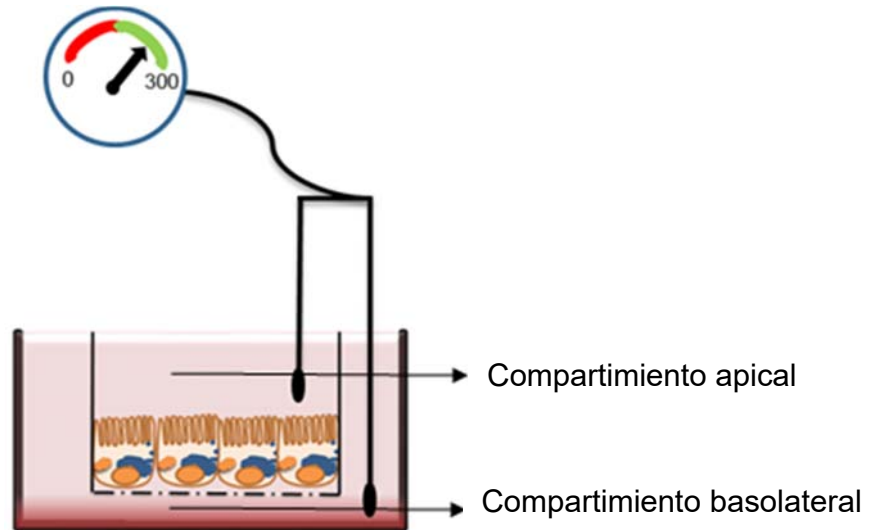
the Antibacterial Activity but Benefits the LPS Neutralization Ability of Human Enteric Defensin 5. *Sci Rep.* 2016;6.

34. Abbeele Van den P, Duysburgha C, Jiangb TA, Rebazab M, Pinheiroa I, Marzoratic M. A combination of xylooligosaccharides and a polyphenol blend affect microbial composition and activity in the distal colon exerting immunomodulating properties on human cells. *J Funct Foods.* 47:163–71.
35. Kigen G, Edwards G. Drug-transporter mediated interactions between anthelmintic and antiretroviral drugs across the Caco-2 cell monolayers. *BMC Pharmacol Toxicol.* 2017;
36. Yeung C, Chiang Chiau J, Chan W, Jiang C, Cheng M, Liu H, et al. In vitro prevention of salmonella lipopolysaccharide-induced damages in epithelial barrier function by various lactobacillus strains. *Gastroenterol Res Pr.* 2013;
37. Zhang X, Song J, Shi X, Miao S, Li Y, Wen A. Absorption and metabolism characteristics of rutin in Caco-2 cells. *ScientificWorldJournal.* 2013;
38. Lesuffleur T, Barbat A, Dussaulx E, Zweibaum A. Growth adaptation to methotrexate of HT-29 human colon carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells. *Cancer Res.* 1990;50(19):6334–43.
39. Georgantzopoulou, A Serchi T, Cambier S, Leclercq C, Renaut J, Shao J, Kruszewski M, et al. Effects of silver nanoparticles and ions on a co-culture model for the gastrointestinal epithelium. *Part Fibre Toxicol.* 2016;13.
40. Pan F, Han L, Zhang Y, Yu Y, Liu J. Optimization of Caco-2 and HT29 co-culture in vitro cell models for permeability studies. *Int J Food Sci Nutr.* 2015;66(6):680–5.
41. Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, Scarino M, Stamatii A, Zucco F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of a cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol.* 2005;21:1–26.
42. Guo H, Xu Y, Huang W, Zhou H, Zheng Z, Zhao Y, et al. Kuwanon G Preserves LPS-Induced Disruption of Gut Epithelial Barrier In Vitro. *Molecules.* 2016;21(11).

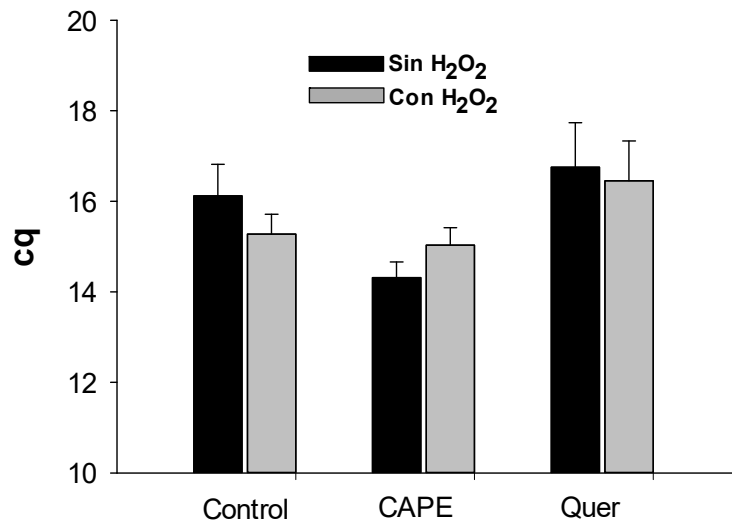
43. Lei S, Cheng T, Guo Y, Li C, Zhang W, Zhi F. Somatostatin ameliorates lipopolysaccharide-induced tight junction damage via the ERK-MAPK pathway in Caco2 cells. *Eur J Cell Biol.* 2014;93(7):299–307.
44. Seth A, Basuroy S, Sheth P, Rao R. L-Glutamine ameliorates acetaldehyde-induced increase in paracellular permeability in Caco-2 cell monolayer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004;287(3):510–7.
45. Cajnko M, Marušić M, Kisovec M, Rojko N, Benčina M, Caserman S, et al. Listeriolysin O Affects the Permeability of Caco-2 Monolayer in a Pore-Dependent and Ca²⁺-Independent Manner. *PLoS One.* 2015;10(6):1–21.
46. Goldberg R, Austen WJ, Zhang X, Munene G, Mostafa G, Biswas S, et al. Intestinal alkaline phosphatase is a gut mucosal defense factor maintained by enteral nutrition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(9):3551–6.
47. Rao R, Baker R, Baker S, Gupta A, Holycross M. Oxidant-induced disruption of intestinal epithelial barrier function: role of protein tyrosine phosphorylation. *Am J Physiol.* 1997;273:812–23.
48. Song J, Gao Y. Effects of methanolic extract from Fuzhuan brick-tea on hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human intestinal epithelial adenocarcinoma Caco-2 cells. *Mol Med Rep.* 2014;9(3):1061–7.
49. Catanzaro D, Rancan S, Orso G, Dall'Acqua S, Brun P, Giron M, et al. *Boswellia serrata* Preserves Intestinal Epithelial Barrier from Oxidative and Inflammatory Damage. *PLoS One.* 2015;10(5).
50. Fiorentino M, Levine M, Sztejn M, Fasano A. Effect of wild-type *Shigella* species and attenuated *Shigella* vaccine candidates on small intestinal barrier function, antigen trafficking, and cytokine release. *PLoS One.* 2014;9(1).
51. Nicholas A, Jeon H, Selasi G, Na S, Kwon H, Kim Y, et al. *Clostridium difficile*-derived membrane vesicles induce the expression of pro-inflammatory cytokine genes and cytotoxicity in colonic epithelial cells in vitro. *Microb Pathog.* 2017;107:6–11.
52. Shin H, Zhao Z, Satsu H, Totsuka M, Shimizu M. Synergistic effect of tumor necrosis factor- α and hydrogen peroxide on the induction of IL-8

- production in human intestinal Caco-2 cells. *Inflammation*. 2011;34(5):440–7.
53. Ledgerwood E, Marshall J, Weijman J. The role of peroxiredoxin 1 in redox sensing and transducing. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2017; 60-67.
 54. Meyer A, Dick T. Fluorescent Protein-Based Redox Probes. *Antioxidants & redox signaling*. 2010;5(13):621-650.
 55. El Hassani RA, Benfares N, Caillou B, Talbot M, Sabourin JC, Belotte V, Morand S, Gnidhou S, Agnandji D, Ohayon R, Kaniewski J, Noël-Hudson MS, Bidart JM, Schlumberger M, Virion A, Dupuy C. Dual oxidase2 is expressed all along the digestive tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;288(5):933-942.
 56. Perner A, Andresen L, Pedersen G, Rask-Madsen J. Superoxide production and expression of NAD(P)H oxidases by transformed and primary human colonic epithelial cells. *Gut*. 2003;52(2):231-236.
 57. Ermakova YG, Mishina NM, Schultz C, Belousov VV. Visualization of Intracellular Hydrogen Peroxide with the Genetically Encoded Fluorescent Probe HyPer in NIH-3T3 Cells. *Methods Mol Biol*. 2019;259-274.
 58. Haberman Y, Tickle TL, Dexheimer PJ, Kim MO, Tang D, Karns R, Baldassano RN, Noe JD, Rosh J, Markowitz J, Heyman MB, Griffiths AM, Crandall WV, Mack DR, Baker SS, Huttenhower C, Keljo DJ, Hyams JS, Kugathasan S, Walters TD, Aronow B, Xavier RJ, Gevers D, Denson LA. Pediatric Crohn disease patients exhibit specific ileal transcriptome and microbiome signature. *J Clin Invest*. 2014;124(8):3617-3633.
 59. Yanai H, Ben-Shachar S, Baram L, Elad H, Gitstein G, Brazowski E, Tulchinsky H, Pasmanik-Chor M, Dotan I. Gene expression alterations in ulcerative colitis patients after restorative proctocolectomy extend to the small bowel proximal to the pouch. *Gut*. 2015 May;64(5):756-764.

Anexo



Anexo 1. Esquema de monocapa de células Caco-2 en Transwell®



Anexo 2. GAPDH no fue alterado por los distintos tratamientos en células Caco-2.

Monocapas de células Caco-2 sembradas en Transwell®, con un TEER superior a 300 Ω*cm², fueron tratadas por 24 horas con CAPE 10 μM o quercetina 5 μM. Luego, fueron expuestas por 30 minutos a H₂O₂ 500 μM y el ARN total fue aislado 1.5 horas después. Los transcritos para la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) fueron determinados por qPCR. Los datos corresponden al promedio ± ES de al menos 5 muestras provenientes de 3 experimentos independientes. Análisis estadístico obtenido por t-student no pareado.