

**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES**



**Evaluación de una estrategia de microencapsulación
basada en la utilización de composito de nPSi- β CD
para la carga de los polifenoles ácido cafeico y
pinocembrina, principales constituyentes bioactivos
presentes en el propóleos chileno**

Tesis presentada a la Dirección Académica
de Postgrado de la Universidad de La
Frontera para obtener el Grado Doctor en
Ciencias mención Biología Celular y
Molecular Aplicada.

DINA ANDREA GUZMÁN OYARZO

PROFESOR GUÍA: DR. LUIS ANTONIO SALAZAR NAVARRETE

**TEMUCO – CHILE
2021**

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CS. AGROPECUARIAS Y FORESTALES

Informe de Aprobación
Tesis de Doctor

Se informa a la Dirección Académica de Postgrado de la Universidad de La Frontera que la Tesis de Doctor presentada por la candidata:

Srta. Dina Andrea Guzmán Oyarzo

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias mención Biología Celular y Molecular Aplicada, en el examen de defensa de tesis rendido el **16 de Septiembre de 2021**.

Guía Tesis

Dr. Luis Antonio Salazar Navarrete

Evaluator Interno

Dr. Pamela Leal Rojas

Evaluator Interno

Dr. Marco Paredes Honorato

Evaluator Externo

Dr. Jacobo Hernández Montelongo

COMISIÓN EXAMINADORA

PROFESOR GUÍA : Dr. Luis Antonio Salazar Navarrete
Departamento de Ciencias Básicas
Facultad de Medicina
Universidad de La Frontera
CHILE

EVALUADOR INTERNO : Dra. Pamela Leal Rojas
Centro de Excelencia en Medicina Traslacional
Universidad de La Frontera
CHILE

EVALUADOR INTERNO : Dr. Marco Paredes Honorato
Departamento de Ciencias Básicas
Facultad de Medicina
Universidad de La Frontera
CHILE

EVALUADOR EXTERNO : Dr. Jacobo Hernández Montelongo
Departamento de Ciencias Matemáticas y Físicas
Facultad de Ingeniería
Universidad de Católica de Temuco
CHILE

Esta tesis fue realizada en el Centro de Biología Molecular y Farmacogenética de la Universidad de La Frontera y contó con el financiamiento de:

- Beca de formación de Capital Humano Avanzado (CONICYT), Folio 21140154.
- Beca de Gastos de operación CONICYT, Folio 21140154.
- Fondo Nacional de Desarrollo Científico Tecnológico (FONDECYT), Proyectos N° 11180395 y N° 1171765.
- Proyecto interno de la Universidad Católica de Temuco n° 2017PF-JH-07.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco desde lo más profundo de mí ser a DIOS, por la fortaleza, entereza y ayuda que me brindó para enfrentar los momentos más difíciles a lo largo de todos estos años. Porque sin yo darme cuenta estuvo conmigo siempre, e iluminó mi sendero cuando creí todo perdido y oscuro. Agradezco por que después de esta experiencia... Dios hizo de mí una persona más valiente y que valora otras cosas que antes no.

Agradezco con todo mi corazón a mis padres, José y María, por el inmenso amor que me tienen, por el gran apoyo que me han dado siempre, por tenerlos a mi lado y por ser los padres que son. A mis hermanos Deysi, Gerson y en especial a Neftalí, porque eres el único que me entendió a la perfección y porque me sentí más acompañada en Temuco, una ciudad nueva para mí. También a mi cuñada Patty y sobrina Conita, por acogerme en su casa cuando recién comencé esta etapa. Además, a mis queridos primos Deysita y Robert, porque siempre me hacen sentir especial, por todo la ayuda con el traslado de mis cosas y por todos los buenos momentos que hemos vivido. A Amalita, mi sobrina pequeña, por llegar a este mundo a entregar a tus abuelos y tía muchísima alegría, amor, risas, y finalmente a Cristóbal, el amor de mi vida, el que sin dudar, me alentó y dio ánimo para por fin terminar este largo camino. Pensé que no lo lograría, por eso doy a gracias a todos los que creyeron en mí.

Agradezco a mi amiga y compañera de batalla, Karina Acuña, por el apoyo mutuo que nos dimos en los buenos, más o menos y malos momentos. Por ayudarme a discutir mis resultados y enseñarme con tu experiencia, las cosas buenas y las no tanto, en el camino de la ciencia. Contigo aprendí muchísimo del área vegetal, cosa que jamás pensé. Gracias por incluirme en tu laboratorio como una más, por prestarme reactivos, darme agua y hielo, y tantas otras cosas más.

Agradezco a la Profesora Dra. Pamela Leal, por haber abierto las puertas de su laboratorio en el momento justo, cuando me vi sin salida. A la Dra. Helga Weber, por enseñarme y apoyarme en los experimentos que me tocó en ese momento realizar.

Agradezco a la Profesora Dra. Marysol Alvear, por su disposición, calidez y, ayuda que me dio para llevar a cabo más experimentos en su laboratorio.

Agradezco a todos mis compañeros de laboratorio, Viviana, Karla, Carmen, Gabriel & Kathy, por mencionar a algunos, por hacer del último tiempo un grato ambiente de trabajo.

Agradezco a todos mis excompañeros, ahora Doctores, Gonzalo Oporto, Jenny Lagos, Jenny Ruedllinger, Yalena Prado & Viviana Burgos, que pasaron por el laboratorio, ya que de una alguna u otra forma uno recoge la experiencia que cada uno transmite.

Agradezco a todas las personas que de una u otra manera colaboraron en esta tesis y me ayudaron en esta etapa.

Finalmente, agradezco al Dr. Luis Salazar, mi Profesor Guía, por haber querido serlo sin conocerme mayormente y, por siempre darme apoyo en los momentos más complejos que viví en el doctorado.

A mis padres, hermanos y familia...

*Bendeciré a Jehová en todo tiempo, porque él es bueno, y para siempre es su
misericordia.*

Salmo 136: 1

Mí Dios eres tú, y á ti alabaré: Dios mío, á ti ensalzaré.

Salmo 118: 28

El día que clamé, me respondiste; Me fortaleciste con vigor en mi alma.

Salmo 138: 3

PRODUCTIVIDAD CIENTÍFICA

PUBLICACIONES ASOCIADAS A LA TESIS

Guzmán-Oyarzo D, Plaza T, Recio-Sánchez G, Abdalla DSP, Salazar LA, Hernández-Montelongo J. *Use of nPSi-bCD composite microparticles for the controlled release of caffeic acid and pinocembrin, two main polyphenolic compounds found in a Chilean propolis*. *Pharmaceutics* 2019; 11(6): 289. doi:10.3390/pharmaceutics11060289 (WoS).

Olivares P, Riquelme MP, Leiva P, Salazar LA; **Guzmán-Oyarzo D**, Rosas C. *Anti-Angiogenic Effect of Caffeic Acid and Pinocembrin in the Process of Physiological Angiogenesis of Chicken Fetuses*. *International Journal of Morphology* 2020; 38(1): 135-39 (WoS).

OTRAS PUBLICACIONES

Guzmán N, Vega M, Reyes F, **Guzmán-Oyarzo D**, Andaur M, Boguen R, Letelier P. *Farmacogenómica de los anticoagulantes orales: La importancia de establecer algoritmos de dosificación en población chilena*. *Revista Médica de Chile* 2020; 148:1307-1314 (WoS).

PRESENTACIONES EN CONGRESOS

Guzmán N, **Guzmán-Oyarzo D**, Medina G, Sepúlveda M, Vergara T, Aburto R, Cea P, Pavéz B, Silva V, Letelier P. *Evaluación in vitro de actividad proangiogénica y antimicrobiana de geles de plasma rico en factores de crecimiento: potencial impacto en la terapia de úlceras de pie diabético*. Congreso Chileno de Endocrinología y Diabetes. Viña del mar, Chile. marzo, 2020.

Guzmán-Oyarzo D, Plaza T, Recio-Sánchez G, Abdalla DSP, Salazar LA, Hernandez-Montelongo J. *Use of nPSi-βCD composite microparticles for the controlled release of caffeic acid and pinocembrin, two main polyphenolic compounds found in a Chilean propolis*. XLI Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile, Concepción, Chile. 4 al 8 de octubre 2019.

Salazar LA, **Guzmán D**, Arencibia A, Saavedra N, Cuevas A, Cavalcante MF, Abdalla DSP. *Polyphenols inhibit in vitro angiogenesis through modulation of microRNAs expression*. 11th International Congress on Coronary Artery Disease – ICCAD 2015, Firenze, Italia, 29 de noviembre al 02 de diciembre de 2015.

Guzmán D, Arias C, Arencibia A, Saavedra N, Rosales A, Salazar L. *Variante rs662145 del gen PCSK9 no influye en la respuesta terapéutica a atorvastatina de individuos chilenos con hipercolesterolemia*. Primer congreso Latinoamericano de Farmacogenómica y Medicina personalizada. Viña del Mar, Chile, mayo 2015.

PASANTÍA EN EL EXTRANJERO

Estadía de 3 meses en el Livingston's Laboratory (Cancer Biology), *Dana Farber Cancer Institute, Harvard Medical School*, Boston Massachusetts, EE. UU.

RECONOCIMIENTOS EN EVENTOS CIENTÍFICOS

Premio mejor Trabajo en el área de Farmacología “Profesor Dr. Jorge Mardones Restat” con el trabajo “*Uso de micropartículas de composito $nPSi-\beta CD$ para la liberación controlada de ácido cafeico y pinocembrina, dos de los principales componentes encontrados en el propóleo chileno*”. Congreso Chileno de Farmacología (SOFARCHI), Concepción, Chile. 4 al 8 octubre 2019.

INDICE DE CONTENIDOS

	PAGINA
Productividad Científica	8
Índice de Contenidos	10
Índice de Figuras	14
Índice de Tablas	16
Índice de Anexos	17
Abreviaciones	18
Resumen	20
Abstract	21
1. Introducción y marco teórico	22
1.1 Enfermedad cardiovascular: un problema de salud pública	22
1.1.1 Aterosclerosis	23
1.1.2 Vulnerabilidad de la placa de ateroma	24
1.1.3 Fenotipo de placa inestable	24
1.1.4 Importancia de la angiogénesis en la vulnerabilidad de la placa de ateroma	26
1.2 Especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo	29
1.2.1 H ₂ O ₂ regulador y señalizador celular	29
1.2.2 Vía de señalización antioxidante Nrf2/Keap1/ARE	31
1.2.2.1 Nrf2, factor de transcripción eritroide tipo 2	31
1.2.2.2 Keap1, proteína 1 asociada a ECH similar a Kelch	32
1.2.2.3 ARE, elementos de respuesta antioxidante	33
1.2.3 Mecanismo de activación y regulación del sistema Nrf2/Keap1, dependiente de Keap1	34
1.2.4 Mecanismo de activación y regulación del sistema Nrf2/Keap1, independiente de Keap1	37
1.3 Propóleos y polifenoles: compuestos bioactivos	40
1.3.1 Compuestos fenólicos	40
1.3.2 Clasificación de compuestos fenólicos	41
1.3.3 Propiedades de los polifenoles	42
1.3.4 Propóleos y polifenoles: moléculas con potencial farmacológico para el desarrollo de nuevas drogas	43
1.3.5 Variabilidad de polifenoles en la composición del propóleos	44
1.3.6 Farmacocinética de los polifenoles	45
1.4 Biomateriales y sus aplicaciones	46
1.4.1 Silicio nanoporoso y β-Ciclodextrina	47
2. Presentación del problema	49
3. Hipótesis	50
4. Objetivo general	50
5. Objetivos específicos	50

6. Materiales y métodos	51
6.1 Línea Celular HUVECs	51
6.1.1 Descripción general y características	51
6.1.2 Mantenimiento y cultivo de HUVECs	52
6.1.3 Descongelación de HUVECs	52
6.1.4 Recuento celular	53
6.2 Preparación de la micropartícula de compuesto de nPSi-βCD	53
6.2.1 Obtención de la micropartícula de silicio nanoporoso	53
6.2.2 Síntesis de micropartícula de compuesto nPSi-βCD	54
6.3 Caracterización fisicoquímica de la micropartícula de compuesto nPSi-βCD	55
6.3.1 Potencial Zeta	55
6.3.2 Análisis Químico	55
6.3.3 Análisis morfológico, tamaño y composición elemental	56
6.3.4 Análisis termogravimétrico	56
6.4 Carga y liberación de polifenoles	56
6.4.1 Carga de polifenoles ácido cafeico y pinocembrina	56
6.4.2 Mecanismo de liberación del fármaco	57
6.5 Generalidades de polifenoles	58
6.5.1 Preparación de stock de polifenoles	58
6.5.1.1 Ácido cafeico	58
6.5.1.2 Pinocembrina	59
6.6 Tratamientos experimentales	59
6.6.1 Preparación de tratamientos	60
6.7 Ensayos de viabilidad y citotoxicidad	61
6.7.1 Viabilidad de HUVECs expuestas a ácido cafeico y pinocembrina	61
6.7.2 Concentración efectiva	62
6.7.3 Citotoxicidad de la micropartícula de compuesto nPSi-βCD	62
6.8 Inducción de estrés oxidativo con H₂O₂	63
6.8.1 Citotoxicidad de H ₂ O ₂	63
6.8.2 Inducción de estrés oxidativo	64
6.9 Evaluación de la actividad antiangiogénica de ácido cafeico y pinocembrina	65
6.9.1 Ensayo en membrana acantocoriónica de pollo	65
6.9.2 Formación de estructuras tubulares en matrigel	66
6.10 Determinación de la actividad antioxidante de polifenoles	67
6.10.1 Preparación y reacción química del reactivo radical ABTS	67
6.11 Evaluación de la expresión génica de Nrf2, Keap1, Akt, Cat, Glut-P, Hmox1, Gclc y Gclm	68
6.11.1 Extracción de ARN total	68
6.11.2 Evaluación de integridad, concentración y pureza del ARN	69

6.11.3 Eliminación de ADN genómico y síntesis de ADN complementario	70
6.12 Análisis de la expresión génica mediante PCR en tiempo real	70
6.12.1 Diseño y eficiencia de partidores	70
6.12.2 Selección de genes normalizadores	72
6.12.3 PCR en tiempo real	72
6.13 Evaluación de la expresión proteica de Nrf2, Keap1, Erk 1/2 y Akt total y fosforilada través de Western Blot	73
6.13.1 Extracción de proteínas totales	73
6.13.2 Electroforesis de proteínas SDS-PAGE	74
6.13.2.1 Preparación de muestras y corrida electroforética	74
6.13.3 Transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa	74
6.13.4 Hibridación y revelado	75
6.14 Análisis estadístico	76
7. Resultados	77
7.1 Caracterización fisicoquímica de la micropartícula de composito nPSi-βCD	77
7.1.1 Potencial Zeta	77
7.1.2 Análisis Químico	77
7.1.3 Análisis morfológico, tamaño y composición elemental	78
7.2 Caracterización fisicoquímica de la micropartícula de composito nPSi-βCD	81
7.2.1 Potencial Zeta	81
7.2.2 Análisis Químico	81
7.2.3 Análisis morfológico, tamaño y composición elemental	81
7.3 Análisis termogravimétricos	85
7.4 Carga y liberación de polifenoles	86
7.4.1 Capacidad de carga de polifenoles	86
7.4.2 Perfiles de liberación	87
7.4.3 Modelos cinéticos de liberación	89
7.5 Evaluación de viabilidad y citotoxicidad	90
7.5.1 Concentración efectiva de polifenoles	90
7.5.2 Citotoxicidad de la micropartícula de composito nPSi-βCD	92
7.6 Inducción de estrés oxidativo con H ₂ O ₂	96
7.6.1 Citotoxicidad de H ₂ O ₂	96
7.6.2 Inducción de estrés oxidativo	97
7.7 Evaluación de la actividad antiangiogénica de ácido cafeico y pinocembrina	98
7.7.1 Efecto antiangiogénico del tratamiento con ácido cafeico y pinocembrina en solución sobre la formación de vasos en la membrana acantocoriónica de huevos de pollo embrionados	98
7.7.2 Efecto del tratamiento con ácido cafeico y pinocembrina en solución y cargado en la micropartícula de composito nPSi-	100

βCD sobre la capacidad de HUVECs para formar estructuras tubulares en matrigel	
7.8 Capacidad antioxidante: remoción del radical libre ABTS	104
7.8.1 Capacidad antioxidante de polifenoles en solución	104
7.8.2 Cinética de la capacidad antioxidante de polifenoles cargados en la micropartícula de compuesto nPSi-βCD	106
7.9 Evaluación de la expresión génica de Nrf2, Keap1, Akt, Cat, Glut-P, Hmox1, Gclc y Gclm	108
7.9.1 Efecto del tratamiento con ácido cafeico y pinocembrina en solución sobre la expresión de genes Nrf2, Keap1, Akt, Cat, Glut-P, Hmox1, Gclc y Gclm relacionados a la vía antioxidante	108
7.9.2 Efecto del tratamiento con ácido cafeico y pinocembrina cargadas en la micropartícula de compuesto nPSi-βCD sobre la expresión de genes Nrf2, Keap1, Akt, Cat, Glut-P, Hmox1, Gclc y Gclm relacionados a la vía antioxidante	112
7.10 Evaluación de la expresión proteica de Nrf2, Keap1 y Akt, Erk 1/2 total y fosforilada	115
7.10.1 Efecto del tratamiento con ácido cafeico y pinocembrina en solución y cargadas en la micropartícula de compuesto nPSi-βCD sobre la expresión de Nrf2, Keap1 y Akt, Erk 1/2 total y fosforilada, proteínas relacionadas a la vía antioxidante	115
8. Discusión	120
9. Conclusiones	135
10. Referencias	136
11. Anexos	162

INDICE DE FIGURAS

	PAGINA
Figura 1. Representación esquemática de los componentes morfológicos de una placa vulnerable.	28
Figura 2. Regulación de ROS en células.	31
Figura 3. Estructura de la proteína Nrf2 y Keap1 humana.	34
Figura 4. Mecanismo de activación de Nrf2.	36
Figura 5. Estructura química de los compuestos fenólicos, ácido fenólico y flavonoide.	41
Figura 6. Imágenes de microscopia electrónica de células HUVEC.	51
Figura 7. Etapas de la síntesis de las micropartículas de nPSi oxidadas.	54
Figura 8. Esquema experimental de la síntesis de la micropartícula de composito nPSi-βCD.	55
Figura 9. Representación esquemática de la preparación de soluciones stock para los polifenoles ácido cafeico y pinocembrina.	60
Figura 10. Esquema de la reacción química de conversión de la sal de tetrazolium en formazán.	62
Figura 11. Esquema de la reacción química para la detección de células vivas mediante sustrato fluorescente	63
Figura 12. Representación esquemática del protocolo de diluciones de cDNA	72
Figura 13. Monitoreo del proceso de síntesis de micropartículas de composito nPSi-βCD.	78
Figura 14. Análisis morfológico de micropartícula de composito nPSi-βCD.	79
Figura 15. Distribución de tamaño y composición elemental de la micropartícula de composito nPSi-βCD.	80
Figura 16. Monitoreo del proceso de carga de los polifenoles en las micropartículas de composito nPSi-βCD.	82
Figura 17. Análisis morfológico de micropartícula de composito nPSi-βCD cargada con polifenoles.	83
Figura 18. Distribución de tamaño y composición elemental de la micropartícula de composito nPSi-βCD cargada con polifenoles.	84
Figura 19. Análisis TGA de micropartículas en diferentes etapas de síntesis.	85
Figura 20. Capacidad de carga de polifenoles de micropartículas de composito nPSi-βCD.	86
Figura 21. Perfil 1 de liberación de polifenoles en PBS a 37°C.	87
Figura 22. Perfil 2 de liberación de polifenoles en PBS a 37°C.	89
Figura 23. Viabilidad de HUVECs tratadas con ácido cafeico.	91
Figura 24. Viabilidad de HUVECs tratadas con pinocembrina.	92
Figura 25. Efecto de la exposición de micropartículas de nPSi-βCD sobre HUVECs cultivadas	94
Figura 26. Viabilidad de HUVECs expuestas a micropartículas de nPSi-βCD.	95
Figura 27. Viabilidad de HUVECs tratadas con H ₂ O ₂ .	96

Figura 28. Evaluación de estrés oxidativo en HUVECs tratadas con H ₂ O ₂ .	97
Figura 29. Efecto antiangiogénico del tratamiento con ácido cafeico y pinocembrina sobre la formación de vasos en la membrana acantocoriónica de huevos de pollo embrionados.	99
Figura 30. Efecto antiangiogénico del tratamiento con ácido cafeico y pinocembrina sobre la formación de vasos en la membrana acantocoriónica de huevos de pollo embrionados.	100
Figura 31. Efecto del tratamiento con ácido cafeico en solución y cargado en la micropartícula de composito nPSi-βCD sobre la capacidad de HUVECs para formar estructuras tubulares en matrigel.	101
Figura 32. Efecto del tratamiento con ácido cafeico en solución y cargado en la micropartícula de composito nPSi-βCD sobre la capacidad de HUVECs para formar estructuras tubulares en matrigel.	102
Figura 33. Efecto del tratamiento con pinocembrina en solución y cargada en la micropartícula de composito nPSi-βCD sobre la capacidad de HUVECs para formar estructuras tubulares en matrigel.	103
Figura 34. Efecto del tratamiento con pinocembrina en solución y cargada en la micropartícula de composito nPSi-βCD sobre la capacidad de HUVECs para formar estructuras tubulares en matrigel.	104
Figura 35. Capacidad antioxidante de ácido cafeico y pinocembrina en solución, expresada en equivalentes de Trolox (mg/L).	106
Figura 36. Cinética de la capacidad antioxidante de ácido cafeico y pinocembrina cargados en la micropartícula de composito nPSi-βCD, expresada en equivalentes de Trolox (mg/L).	108
Figura 37. Efecto del tratamiento con ácido cafeico sobre en la expresión de genes relacionados a la vía antioxidante.	110
Figura 38. Efecto del tratamiento con pinocembrina sobre en la expresión de genes relacionados a la vía antioxidante.	111
Figura 39. Efecto del tratamiento con ácido cafeico cargado en la micropartícula de composito nPSi-βCD sobre en la expresión de genes relacionados a la vía antioxidante.	113
Figura 40. Efecto del tratamiento con pinocembrina cargada en la micropartícula de composito nPSi-βCD sobre en la expresión de genes relacionados a la vía antioxidante.	114
Figura 41. Efecto del tratamiento con ácido cafeico en solución y cargado en la micropartícula de composito nPSi-βCD, sobre en la expresión de proteínas relacionadas a la vía antioxidante y angiogénica.	116
Figura 42. Representación gráfica del efecto del tratamiento con ácido cafeico en solución y cargado en la micropartícula de composito nPSi-βCD, sobre en la expresión de proteínas relacionadas a la vía angiogénica.	117
Figura 43. Efecto del tratamiento con pinocembrina en solución y cargada en la micropartícula de composito nPSi-βCD sobre en la expresión de proteínas relacionadas a la vía antioxidante y angiogénica.	118
Figura 44. Representación gráfica del efecto del tratamiento con pinocembrina en solución y cargada en la micropartícula de compósito nPSi-βCD sobre en la expresión de proteínas relacionadas a la vía angiogénica.	119

INDICE DE TABLAS

	PAGINA
Tabla 1. Principales modificaciones químicas que ocurren en la activación y represión de la vía de señalización Nrf2/Keap/ARE.	39
Tabla 2. Caracterización de componentes de propóleos según: origen geográfico y fuente vegetal. Adaptado de Silva-Carvalho <i>et al.</i> , (2015) & Barrientos <i>et al.</i> , (2013).	45
Tabla 3. Características fisicoquímicas de los polifenoles ácido cafeico y pinocembrina.	58
Tabla 4. Grupos experimentales de los diferentes tratamientos utilizados para ácido cafeico y pinocembrina tanto en solución como cargados en la micropartícula de composito nPSi-βCD.	59
Tabla 5. Grupos experimentales que se incluyeron para el ensayo en membrana acantocoriónica de pollo.	66
Tabla 6. Secuencia de partidores utilizados para evaluación de la expresión de genes asociados a la vía antioxidante y angiogénesis.	71
Tabla 7. Anticuerpos utilizados y diluciones recomendadas con el fabricante para utilizar en Western Blot.	75
Tabla 8. Cinética de liberación in-vitro de ácido cafeico y pinocembrina en PBS a 37°C.	90
Tabla 9. Capacidad antioxidante de ácido cafeico y pinocembrina en solución.	105
Tabla 10. Cinética de la capacidad antioxidante de ácido cafeico y pinocembrina cargados en la micropartícula de composito nPSi-βCD.	107

INDICE DE ANEXOS

	PAGINA
Anexo 11.1: Copia artículo publicado	162
Anexo 11.2: Copia artículo publicado	163
Anexo 11.3: Curva de calibración de Trolox para capacidad antioxidante	164
Anexo 11.4: Curva de eficiencia de partidores	165
Anexo 11.5: Porcentaje de eficiencia obtenido para cada partidor	166
Anexo 11.6: Curva de calibración para cuantificación de proteínas por método BCA	167

ABREVIACIONES

ABTS• ⁺	2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina)-6-ácido sulfónico
AC	Ácido cafeico
ACV	Accidente cerebrovascular
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Elementos de respuesta antioxidantes
ARN	Ácido ribonucleico
ATE	Aterosclerosis
ATP	Adenosina trifosfato
ATR-FTIR	Reflectancia total atenuada-espectroscopia infrarroja transformada de Fourier
βCD	β-Ciclodextrina
C	Carbono
c-LDL	Colesterol-LDL
CAPE	Ácido cafeico fenil-éster
CEs	Células endoteliales
CFs	Compuestos fenólicos
CHCl ₃	Cloroformo
CMLs	Células musculares lisas
CTR	Región C-terminal
Cys	Cisteína
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECGM	Medio de crecimiento de células endoteliales
ECVs	Enfermedades cardiovasculares
EDX	Espectroscopia de rayos X dispersiva
EGGC	Epigallocatequina galato
EIC	Enfermedad isquémica coronaria
EO	Estrés oxidativo
ERK	Quinasa regulada por señal extracelular
EtOH	Etanol
FBS	Suero fetal bovino
H ₂ O	Agua
H ₂ O _m	Agua molecular
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HeLa	Células de adenocarcinoma cérvico-uterino
HepG2	Células de cáncer de hígado humano
HF	Fluoruro de hidrógeno
HIP	Hemorragia intraplaca
HUVECs	Células endoteliales de vena umbilical humana
ICAM	Molécula de adhesión intracelular
INE	Instituto de estadística
IRES	Sitio de entrada ribosómico interno sensible a redox
Keap1	Proteína 1 asociada a ECH similar a Kelch
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LDLox	Lipoproteína de baja densidad oxidada
MEC	Matriz extracelular
N	Nitrógeno

Na	Sodio
nPSi	Silicio nanoporoso
Nrf2	Factor de transcripción eritroide tipo 2
NTR	Región N-terminal
NV	Neovascularización
O	Oxígeno
O ₂	Oxígeno molecular
O ₂ ^{-•}	Anión superóxido
OH	Hidroxilo
OH•	Radical hidroxilo
OMS	Organización mundial de la Salud
P	Fósforo
PCK	Proteína C quinasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PEE:	Eficiencia de atrapamiento del polifenol
PI3K	Quinasa-3 fosfatidilinositol
Pin	Pinocembrina
PLE	Eficiencia de carga del polifenol
PRDX	Peroxirredoxina
Qui	Quitosa
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SEM	Microscopia electrónica de barrido de presión variable
Si	Silicio
SiOH	Silanol
sMaf	Pequeñas proteínas Maf
SOD	Superóxido dismutasa
tBHQ	Terbutilhidroquinona
TGA	Análisis termogravimétrico
VCAM	Molécula de adhesión de células vasculares
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VV	Vasa vasorum

RESUMEN

La aterosclerosis es una enfermedad silenciosa y multifactorial, cuyo progreso desencadena en la aparición de patologías cardiovasculares agudas y severas que generan altos índices de discapacidad y mortalidad a nivel mundial. El avance de la enfermedad aterosclerótica conduce al estrechamiento u obstrucción del lumen vascular de grandes vasos causado por el engrosamiento de la capa intermedia de la pared arterial. Durante el establecimiento de la lesión aterosclerótica avanzada, la angiogénesis constituye un proceso relevante, debido a que se forman nuevos vasos que son frágiles que pueden romper fácilmente, lo conlleva a la formación de placas ateroscleróticas inestables que tienen mayor riesgo de ruptura, por esta razón la neoangiogénesis en la placa de ateroma representa una interesante diana farmacológica. En este contexto los polifenoles han sido estudiados, ya que poseen diversas actividades biológicas como antiinflamatorio, antiangiogénico, antioxidante y antibacterial, entre otras. Si bien los polifenoles desde el punto de vista farmacológico tienen un gran potencial, la principal desventaja es que poseen baja biodisponibilidad en el sitio deseado. Frente a esta problemática, la utilización de sistemas biocompatibles para la liberación de drogas es una estrategia que actualmente ha cobrado gran interés. Los biomateriales como por ejemplo algunos polímeros son muy utilizadas por su capacidad de encapsular y entregar eficientemente una variedad de fármacos. El objetivo de este estudio fue obtener micropartículas de nPSi- β CD cargadas con ácido cafeico y pinocembrina, principales constituyentes bioactivos de propóleos chileno, y evaluar el efecto de la microencapsulación sobre la actividad antioxidante y antiangiogénica de los polifenoles. Respecto a la metodología, se utilizaron células HUVEC expuestas a H_2O_2 y a tratamientos con polifenoles en solución y cargados en la micropartícula de composito. Para lo cual se incorporaron los polifenoles dentro de una micropartícula utilizando como biomaterial nPSi, quitosana y ciclodextrina. Seguidamente se evaluaron diferentes parámetros que permitieron la caracterización físico-química de la micropartícula para luego evaluar algunos parámetros de viabilidad celular principalmente mediante MTS. La evaluación del efecto antiangiogénico de los tratamientos con polifenoles en solución y microencapsulados se realizó mediante ensayos funcionales de migración y formación de estructuras tubulares en matrigel. La detección de cambios en la expresión de genes blanco asociados a la vía antioxidante y angiogénesis a través qPCR, mientras que la expresión proteica se evaluó por Western Blot. Para el análisis estadístico se utilizó test de ANOVA seguido del post-test de Dunnett, cuando los datos seguían una distribución gaussiana. En caso contrario, se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis, con post-test de Dunn's. El nivel de significancia que fue utilizado es $p \leq 0.05$. Los resultados obtenidos mostraron que la micropartícula de nPSi- β CD presenta una mejor liberación controlada de los polifenoles en comparación con la micropartícula nPSi (control), además es citocompatible hasta concentraciones de 0,25 mg/mL. Por lo tanto, es apropiada para ser utilizada como una sistema de transporte y liberación controlada de ácido cafeico y pinocembrina. Se demostró que ácido cafeico y pinocembrina, presentan actividad antioxidante y antiangiogénica tanto en solución como microencapsulados. En ácido cafeico se observó un efecto biológico mayor en comparación a pinocembrina, especialmente cuando está incorporado a la micropartícula de composito nPSi- β CD. Por último, en células HUVEC tratadas con ácido cafeico y pinocembrina encapsulados, se observaron cambios en la expresión génica de Akt y Glut-P. Sin embargo, estos cambios no se observan en la expresión de las proteínas analizadas. Finalmente, en base la evidencia antes mencionada, la micropartícula de composito nPSi- β CD podría ser utilizada como un sistema alternativo de administración oral de fármacos, pues permite una liberación controlada, pudiendo de esta forma mejorar la biodisponibilidad de ácido cafeico y pinocembrina y eventualmente otros polifenoles con potencial terapéutico.

ABSTRACT

Atherosclerosis is a silent and multifactorial disease, the progress of which triggers the appearance of acute and severe cardiovascular diseases that generate high rates of disability and mortality worldwide. The progression of atherosclerotic disease leads to narrowing or obstruction of the vascular lumen of the great vessels caused by thickening of the intermediate layer of the arterial wall. During the establishment of the advanced atherosclerotic lesion, angiogenesis constitutes a relevant process, because new vessels are formed that are fragile that can easily break, leading to the formation of unstable atherosclerotic plaques that have a greater risk of rupture, for this reason neoangiogenesis in the atheroma plaque represents an interesting pharmacological target. In this context, polyphenols have been studied, since they have various biological activities such as anti-inflammatory, anti-angiogenic, antioxidant and antibacterial, among others. Although polyphenols have great pharmacological potential, the main disadvantage is that they have low bioavailability at the desired site. Faced with this problem, the use of biocompatible systems for drug delivery is a strategy that is currently gaining great interest. Biomaterials such as some polymers are widely used for their ability to encapsulate and efficiently deliver a variety of drugs. The objective of this study was to obtain microparticles of nPSi- β CD loaded with caffeic acid and pinocembrin, the main bioactive constituents of Chilean propolis, and to evaluate the effect of microencapsulation on the antioxidant and antiangiogenic activity of polyphenols. Regarding the methodology, HUVEC cells exposed to H_2O_2 and to treatments with polyphenols in solution and loaded in the composite microparticle were used. For which the polyphenols were incorporated into a microparticle using nPSi, chitosan and cyclodextrin as biomaterial. Next, different parameters were evaluated that allowed the physical-chemical characterization of the microparticle to later evaluate some parameters of cell viability, mainly through MTS. The evaluation of the antiangiogenic effect of the treatments with polyphenols in solution and microencapsulated was carried out through functional tests of migration and formation of tubular structures in matrigel. The detection of changes in the expression of target genes associated with the antioxidant pathway and angiogenesis through qPCR, while the protein expression was evaluated by Western Blot. For statistical analysis, ANOVA test was used followed by Dunnett's post-test, when the data followed a Gaussian distribution. Otherwise, the Kruskal-Wallis test was applied, with Dunn's post-test. The level of significance that was used is $p \leq 0.05$. The results obtained showed that the nPSi- β CD microparticle has a better controlled release of polyphenols compared to the nPSi microparticle (control), and it is also cytocompatible up to concentrations of 0.25 mg / mL. Therefore, it is suitable to be used as a transport system and controlled release of caffeic acid and pinocembrin. Caffeic acid and pinocembrin were shown to have antioxidant and antiangiogenic activity both in solution and microencapsulated. In caffeic acid, a greater biological effect was observed compared to pinocembrin, especially when it is incorporated into the nPSi- β CD composite microparticle. At last, in HUVEC cells treated with encapsulated caffeic acid and pinocembrin, changes were observed in the gene expression of Akt and Glut-P. However, these changes are not observed in the expression of the proteins analyzed. Finally, based on the evidence cited above, the nPSi- β CD composite microparticle could be used as an alternative oral drug administration system, as it allows a controlled release, thus improving the bioavailability of caffeic acid and pinocembrin and eventually others. polyphenols with therapeutic potential.

Palabras claves: actividad anti-angiogénica y antioxidante, ácido cafeico, pinocembrina, polifenoles, HUVECs, liberación controlada, micropartícula de composito nPSi/ β CD.

1. INTRODUCCION Y MARCO TEORICO

1.1 Enfermedad cardiovascular: un problema de salud pública

Las enfermedades cardiovasculares (ECVs) son la primera una causa de muerte en el mundo (WHO, 2019). Según datos publicados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) hasta el año 2019 se registraron 17,9 millones de muertes por esta causa, lo cual representa un 32 % de todas las muertes registradas en el mundo (WHO, 2019). En Chile, la realidad no es diferente, ya que de acuerdo con cifras entregadas por el Instituto Nacional de Estadística (INE) al año 2017, el 26,4 % de las muertes que se registraron en el país correspondieron a ECVs (INE, 2017).

Las ECVs se clasifican dentro del grupo de enfermedades no transmisibles, abarcan una variedad de condiciones patológicas que afectan al corazón (estructura y/o función) y la vasculatura de grandes vasos sanguíneos, principalmente corazón y cerebro. Dentro de este grupo encontramos: insuficiencia cardíaca, cardiopatía reumática y miocardiopatía, enfermedad arterial periférica, enfermedad isquémica coronaria y accidente cerebrovascular, entre otras (Herrington *et al.*, 2016). En Chile y el mundo el 60% y 85%, respectivamente, del total de muertes ocurridas por ECVs fueron causadas por enfermedad isquémica coronaria (EIC) y accidente cerebrovascular (ACV) (WHO, 2019; INE, 2017).

La prevalencia de eventos agudos graves como el síndrome coronario agudo (infarto agudo al miocardio), accidentes cerebrovasculares isquémicos, ataques isquémicos cerebrales transitorios o aneurismas, se debe a que muchas personas cursan con una patología silenciosa conocida como aterosclerosis (Ambale-Venkatesh *et al.*, 2017). La progresión de la lesión aterosclerótica puede provocar bloqueo parcial o total del flujo sanguíneo, desencadenando estos cuadros fatales con altas tasa de discapacidad en el mundo. Actualmente, se han identificado un gran número de factores de riesgo que predisponen a la ocurrencia de alguna ECVs y aterosclerosis, dentro de los cuales podemos mencionar edad, género, dislipidemia, hipertensión arterial, diabetes, obesidad, tabaquismo, consumo de alcohol, sedentarismo, entre otros (Lechner *et al.*, 2020).

1.1.1 Aterosclerosis

La aterosclerosis (ATE) es una enfermedad inflamatoria crónica, progresiva y multifactorial, que se caracteriza por el engrosamiento de la pared arterial de grandes vasos que irrigan el corazón y/o cerebro, impidiendo el flujo sanguíneo. El engrosamiento se produce debido a la acumulación de lípidos (Lu *et al.*, 2015) y/o también de material fibroso en la capa más interna de las arterias, resultando en la formación de lo que se conoce como placa de ateroma (Libby, 2002). En la pared arterial se distinguen 3 capas: la más interna llamada íntima compuesta por una monocapa de células endoteliales (CEs), la media formada por células musculares lisas (CMLs) y también matriz extracelular (MEC) y finalmente la capa más externa adventicia, es la que irriga la capa media ya que en ella se encuentra la vasa vasorum (VV), terminaciones nerviosas y mastocitos (Araldi *et al.*, 2015).

La incidencia de la aterosclerosis se ha asociado a la presencia de diversos factores de riesgo, dentro de los cuales destacan la hipercolesterolemia e hipertensión arterial, condiciones contribuyen en la iniciación y la progresión de esta patología (Ference *et al.*, 2017). La lesión aterosclerótica temprana comienza con cambios a nivel de la CEs, la cual es susceptible al estrés oxidativo. El estrés oxidativo (EO) es generado por alteraciones en el patrón normal de flujo sanguíneo y la presencia de factores pro-aterogénicos como, por ejemplo, el incremento sostenido de colesterol LDL (c-LDL) circulante; conduciendo a un estado inflamatorio constante (Gimbrone, *et al.*, 2016). Además, el EO genera que las c-LDL sean modificadas químicamente a través de oxidaciones, luego ingresen y se acumulen en el espacio subendotelial (Kattoor *et al.*, 2019). Paralelamente la inflamación produce que la CEs expresen moléculas de adhesión como ICAM y VCAM (Hartmann *et al.*, 2015), atrayendo una gran cantidad de monocitos y favoreciendo su ingreso a la capa íntima (Cybulsky, *et al.*, 1991). En la íntima, los monocitos se convierten en macrófagos, los cuales fagocitan las LDLox transformándose en células espumosas (Libby *et al.*, 2019). Las células espumosas se acumulan en la íntima y forman la estría grasa, que puede permanecer allí por años, dando cuenta de que la aterosclerosis es una enfermedad silenciosa y progresiva. Durante la evolución de la placa de ateroma, las CMLs migran desde la capa media hacia la íntima y proliferan (Bennett *et al.*, 2016), hay síntesis de MEC la cual genera que las c-LDL queden atrapadas, favoreciendo la acumulación de lípidos (Bennett *et al.*, 2016). También se ha visto que ocurre infiltración de leucocitos, apoptosis de macrófagos y CMLs. La acumulación de restos celulares y LDLox forma lo que se conoce como centro fibroso y necrótico (Yurdagul *et al.*, 2018), esto reduce la

disponibilidad de oxígeno lo que conduce a la hipoxia (Kim *et al.*, 2014). Este efecto es producido por un aumento en la demanda metabólica, así como por el engrosamiento de la capa íntima, lo que reduce el suministro de oxígeno y contribuye de forma sinérgica a exacerbar la hipoxia en las lesiones ateroscleróticas (Araldi *et al.*, 2015).

En la etapa tardía muchas placas de ateroma desarrollan regiones de calcificación (Alexopoulos & Raggi, 2009; Virmani *et al.*, 2014). Dependiendo del grado de calcificación se asocia al desarrollo de placas ateroscleróticas estables o inestables. En este sentido, la calcificación irregular o microscópica se ha asociado con inestabilidad mecánica de la placa, mientras que largas regiones de calcificación puede asociarse con baja probabilidad de desarrollar un evento trombótico (Mauriello *et al.*, 2013). Ahora bien, el progreso de esta patología conlleva al estrechamiento u obstrucción del lumen vascular, lo que sumado a la presencia de otros factores puede desencadenar en la generación de placas ateroscleróticas inestables en etapas avanzadas de la enfermedad. Finalmente, las placas inestables tiene mayor riesgo de ruptura por lo que trae consigo cuadros clínicos graves como trombosis, infarto agudo al de miocardio y accidentes cerebrovasculares, todos ellos asociados a una elevada tasa de mortalidad.

1.1.2 Vulnerabilidad de la placa de ateroma

El proceso aterosclerótico normalmente permanece silencioso durante meses, años e incluso décadas y puede que nunca dé lugar a manifestaciones clínicas (Chatzizisis *et al.*, 2014). Sin embargo, hay estudios que muestran que la aparición de cuadros clínicos agudos graves puede ser de un momento a otro (Silvestre-Roig *et al.*, 2014). Estos cuadros graves son producidos como consecuencia de una serie de eventos patológicos que conducen a la progresión, complicación de la lesión aterosclerótica y a un estado vulnerable. La vulnerabilidad de la placa es un concepto que actualmente se utiliza para el conjunto de características morfológicas que presenta la placa de ateroma y que contribuyen a desarrollar un fenotipo de placa estable o inestable (Badimon *et al.*, 2014).

1.1.3 Fenotipo de placa inestable

El fenotipo de placa inestable puede conducir a la aparición de los fenómenos de ruptura o erosión de la placa de ateroma (Libby *et al.*, 2015). A pesar del gran número de investigaciones en esta área, aún no ha sido posible establecer un modelo animal

idóneo para estudiar los mecanismos que promueven que una lesión ateromatosa sea más susceptible a desarrollar complicaciones que desencadenen la ruptura o erosión de la placa. No obstante, estudios histológicos realizados en placas ateromatosas humanas han permitido caracterizar las placas que sufrieron rotura o erosión (Bentzon *et al.*, 2014). En este sentido, una placa inestable propensa a la erosión posee un núcleo lipídico pequeño, muestra menor acumulación de células inflamatorias y contiene CMLs en proliferación, abundantes proteoglicanos e hialuronano y presenta neovascularización (Hansson *et al.*, 2006).

Por otro lado, una placa inestable propensa a la ruptura se caracteriza por la presencia de una capa fibrosa delgada de $<65\ \mu\text{m}$ de espesor, que cubre un gran núcleo necrótico rico en lípidos, además hay un aumento de la carga de placa, infiltración de macrófagos y células inflamatorias como células T y mastocitos, lo que conlleva a que estas lesiones se encuentren altamente inflamadas (Virmani *et al.*, 2006). Los macrófagos se consideran un factor importante de vulnerabilidad de la placa porque participan en la captación y metabolismo de las lipoproteínas, la secreción de factores de crecimiento, producción de enzimas metaloproteinasas (Moore *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2014) y metabolitos tóxicos que promueven la degradación de colágeno, por ende el debilitamiento de la capa fibrosa y la ruptura de la placa (Le Dall *et al.*, 2010). Además se ha reportado que la acumulación de macrófagos en la íntima induce la producción de ROS a través de NADPH oxidasa y mieloperoxidasas (Gough *et al.*, 2006). Por otra parte, también se ha asociado la desestabilización de la placa con la apoptosis de las CMLs en la capa fibrosa, lo que conduce a una reducción en la producción de proteínas de la MEC y un aumento de la inflamación de la placa de ateroma. Este mecanismo puede amplificar la señal inflamatoria transformándose en un círculo vicioso que promueve aún más el fenotipo de la placa inestable (Mury *et al.*, 2018). Otras características que han sido descritas para las placas altamente inestables (**Figura 1**) son un gran volumen de placa con remodelación positiva expansiva, es decir hacia fuera (Ahmadi *et al.*, 2015), hemorragia intraplaca, inflamación adventicia y neovascularización (Chistiakov *et al.*, 2015). La presencia de angiogénesis o neovascularización (NV) intraplaca es un proceso importante que se relaciona con la progresión de la placa aterosclerótica, ya que promueve la conversión de una placa estable al fenotipo inestable (Tanaka *et al.*, 2011). En este sentido, se estudiaron placas ateromatosas de pacientes con angina de pecho inestable que habían desarrollado NV, encontrando que estas lesiones poseían todas las características de placas vulnerables en comparación con aquellas lesiones en donde no hubo NV (Tian *et al.*, 2012). Varios autores sugieren que la señal que induce la neo-angiogénesis en la placa es un estado

hipóxico, pro-oxidante e inflamatorio. La hipoxia activa la vía de señalización de HIF-1 α / factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el cual es un potente estimulador de la formación de nuevos vasos sanguíneos (Forsythe *et al.*, 1996, Ferrara *et al.*, 2009). Algunos estudios han reportado un incremento en la expresión de HIF-1 α en macrófagos (Sluimer *et al.*, 2008), ROS (Nakagawa *et al.*, 2011), y LDLox (Hutter *et al.*, 2013). Asimismo, se encontraron mayores niveles de VEGF en placas inestables en comparación a las estables. Adicionalmente, se sabe que VEGF aumenta en lesiones ateroscleróticas lo que se asocia a una mayor renovación de células endoteliales y/o angiogénesis. Es así como la angiogénesis es un proceso muy clave en la progresión de la lesión aterosclerótica, ya que, contribuye e incrementa la generación de placas ateroscleróticas inestables que tienen mayor riesgo de ruptura (Gossl *et al.*, 2010, Tanaka *et al.*, 2011, Sun, 2014), lo que finalmente induce la aparición de cuadros clínicos graves.

1.1.4 Importancia de la angiogénesis en la vulnerabilidad de la placa de ateroma

La formación de nuevos vasos sanguíneos es esencial y necesaria para muchos procesos fisiológicos como embriogénesis, reparación de tejidos y regeneración de órganos, menstruación, entre otros (Favier & Corvol, 2001). La angiogénesis se define como la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes (Risau, 1997), para proporcionar nutrientes y oxígeno a tejidos que se están formando (Heistad *et al.*, 1981). Este proceso está sometido a una regulación compleja, mediante la expresión coordinada tanto de factores proangiogénicos como antiangiogénicos (Zhao & Li, 2015). Desde la perspectiva patológica, el crecimiento vascular exacerbado y de forma anormal promueve el desarrollo de múltiples enfermedades como: cáncer, retinopatía diabética, artritis reumatoide, endometriosis, psoriasis, enfermedad inflamatoria intestinal (Carmeliet, 2003). Además, el crecimiento y preservación inadecuada de vasos conlleva a procesos isquémicos que conducen al desarrollo de patologías cardiovasculares (Krupinski *et al.*, 1994).

La angiogénesis es un proceso complejo que depende de la interacción conjunta de factores de crecimiento, enzimas, proteínas, moléculas de adhesión y factores de transcripción (Herbert *et al.*, 2011). En el proceso participan e interactúan varios tipos celulares como lo son CE, pericitos (Ribatti *et al.*, 2011), CMLs y fibroblastos y ocurren una serie de etapas como i) activación de CE, debido al incremento de factores proangiogénicos ii) aumento de la permeabilidad vascular iii) proliferación y migración de CE, iv) degradación proteolítica de la membrana basal y la MEC circundante, v)

formación de una estructura tubular y lumen y vi) maduración funcional del capilar recién formado mediante el fortalecimiento de las uniones entre CEs (Guo *et al.*, 2017). Por otro lado, dentro de los factores de crecimiento que promueven la formación de nuevos vasos sanguíneos se encuentran: el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), angiopoyetina, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento tumoral β (TGF) (Gabhann *et al.*, 2008).

En la primera etapa de la progresión de la aterosclerosis, la angiogénesis se produce como un mecanismo de respuesta el aumento progresivo del tamaño de la placa, aumento del EO e inflamación que generan el desarrollo de regiones hipóxicas intraplaca (Bjornheden *et al.*, 1999). La formación de microvasos se produce a partir de la vasa vasorum (Vv) preexistente en la capa adventicia, los cuales alcanzan la íntima e infiltran la placa aterosclerótica con el fin de suministrar nutrientes y oxígeno, de esta manera proteger la pared de los vasos del daño isquémico. En este sentido, un estudio demostró que la presencia de regiones hipoxias en placas ateroscleróticas avanzadas se correlacionó con el desarrollo de angiogénesis intraplaca en arterias carótida humanas. Ahora bien, la disminución de la tensión de oxígeno promueve la estabilización de factor inducible por hipoxia (HIF-1). Un factor de transcripción heterodimérico compuesto por una subunidad HIF-1 α y HIF-1 β , que actúan uniéndose a elementos sensibles a la hipoxia y regulando transcripcionalmente diferentes genes blanco, como por ejemplo, aquellos que están asociados a la estimulación y secreción de VEGF (Hirota & Semenza, 2006). Por su parte, VEGF activa vías señalización que inducen la expresión de genes como Erk 1/2 y Akt que promueven la supervivencia de la célula y los procesos angiogénicos. Se ha encontrado VEGF-A en lesiones coronarias ricas en lípidos y placas coronarias estenóticas, particularmente en CEs y macrófagos que rodean microvasos. Adicionalmente, se ha visto que la expresión de VEGF puede ser modulada por EO y nicotina lo cual sería una vía independientemente de la presencia de hipoxia (Khatri *et al.*, 2004). Por lo tanto, la angiogénesis en esta etapa resulta ser un mecanismo esencial en respuesta a la falta de oxígeno. Sin embargo, posteriormente el estado inflamatorio constante y el EO que hay intraplaca, conduce a un desbalance entre los factores antiangiogénicos y proangiogénico estimulando aun más la neo-angiogénesis (Perrotta *et al.*, 2018).

Los nuevos vasos formados son inmaduros y frágiles, de un calibre bastante grande en comparación con los capilares normales, poseen una pared delgada debido a la falta de pericitos, no tienen soporte estructural porque poseen escasa cantidad de

CMLs y carecen de uniones completas entre CEs (Sluimer *et al.*, 2009). Todas estas características hacen que los neovasos se rompan fácilmente causando hemorragia intraplaca (HIP) (Moreno *et al.*, 2004) lo que conlleva a la salida de componentes sanguíneos como eritrocitos y plaquetas e infiltración de células inflamatorias en la placa de ateroma (Doyle & Caplice, 2007). Además se ha encontrado que tanto macrófagos activados como mastocitos secretan y liberan mayor cantidad de proteasas causando más daño a los microvasos y facilitando la hemorragia dentro de la placa. En consecuencia, después de la neovascularización, la HIP se ha relacionado con la progresión de la placa. Es por esta razón, que la angiogénesis representa una diana farmacológica para disminuir la inestabilidad de la placa y por ende reducir el riesgo cardiovascular (Van der Veken *et al.*, 2016). En este sentido se ha visto que al inhibir la NV intraplaca se reduce la acumulación de macrófagos y la progresión de la lesión aterosclerótica avanzada (Parma *et al.*, 2017).

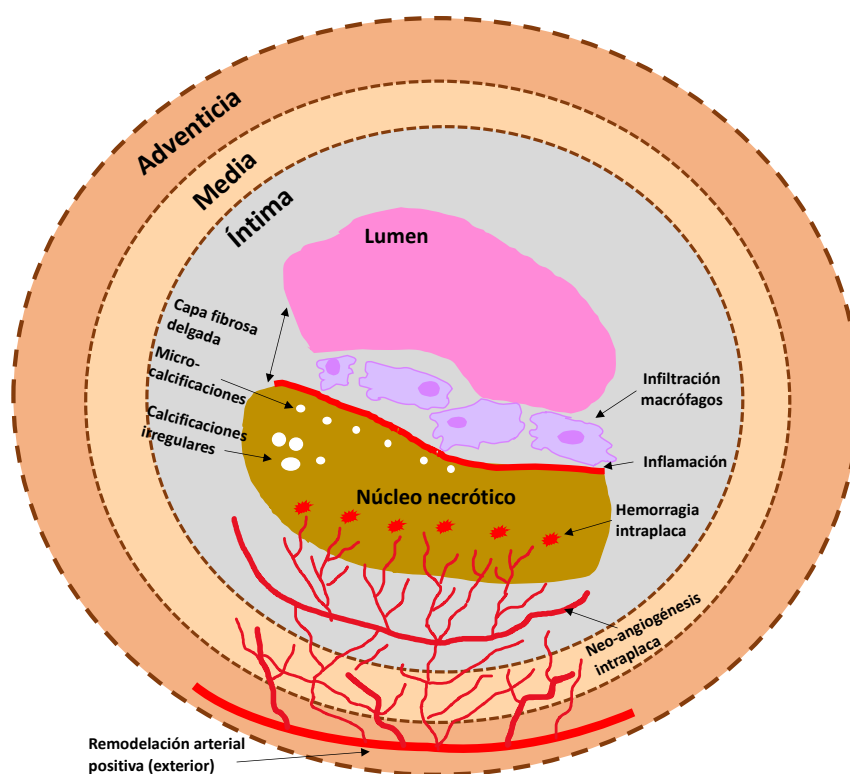


Figura 1. Representación esquemática de los componentes morfológicos de una placa inestable y/o vulnerable. Extraído y adaptado de Mushenkova *et al.*, (2020).

1.2 Especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo

Todos los organismos vivos requieren de energía para llevar a cabo diferentes funciones biológicas (Dunn *et al.*, 2015). El oxígeno molecular (O_2) es parte fundamental en aquellos organismos aeróbicos, ya que es el aceptor final de electrones en el proceso de generación de ATP en la mitocondria. En la mitocondria, el oxígeno es reducido para formar agua (H_2O), sin embargo, durante este proceso se pueden generar metabolitos de O_2 altamente reactivos como: anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y radical hidroxilo ($OH^{\cdot}$) (Jakubczyk *et al.*, 2020). A estas moléculas se les conoce como especies reactivas del O_2 (ROS). La producción de ROS en la mitocondria corresponde al 1-2% del total producido en la célula, por lo que el resto es generado como sub-producto en todas las reacciones enzimáticas donde haya transferencia de electrones. ROS en la célula se puede considerar como un agente que potencialmente puede causar daño específicamente, a nivel de lípidos, proteínas y ADN (Cadet & Wagner, 2013). Por su parte, la célula se protege de los posibles daños a través de la activación de la respuesta de fase II (Keum, 2012; Bernatoniene & Kopustinskiene, 2018), en la cual están involucradas enzimas detoxificantes y antioxidantes como: glutatión S-transferasa (GST), NADPH quinona oxidoreductasa (NQO1), hemoxigenasa 1 (HMOX1), entre otras. Estas enzimas realizan la conversión de ROS en moléculas más solubles, estables e inocuas (Itoh *et al.*, 1997). Cuando la maquinaria celular es incapaz de prevenir el daño causado por altas concentraciones de ROS, se habla de estrés oxidativo. Por lo tanto, el estrés oxidativo se produce a causa de un desbalance entre la producción de ROS y la actividad de las enzimas antioxidantes (Sies, 2015). Aún cuando ROS siempre ha sido relacionado con procesos que conllevan a alteraciones patológicas del estado redox de la célula, en el último tiempo se ha visto que ROS a bajas concentraciones tiene un rol fisiológico en los procesos de regulación y señalización celular (Ray *et al.*, 2012, Indo *et al.*, 2016; Sies, 2017).

1.2.1 H_2O_2 , regulador y señalizador celular

Uno de los metabolitos de O_2 altamente reactivos más estables es el H_2O_2 . Un agente oxidante débil, capaz de difundir a través de las membranas celulares. Se genera a partir de la reacción catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD), la cual convierte el $O_2^{\cdot-}$ que proviene de NADPH oxidasas y de la mitocondria (Sies & Jones, 2020). H_2O_2 participa en un mecanismo de señalización celular redox (**Figura 2**), implicado en la oxidación de residuos cisteína (Cys) en las proteínas mediado por H_2O_2 . Esta vía de señalización corresponde a un mecanismo de transducción de señales

reversible. Se basa en la oxidación del grupo tiol (-SH) que está presente en la cadena lateral del residuo de Cys y que se encuentra como anión tiolato (Cys-S⁻). Como resultado de la oxidación se pueden formar puentes disulfuro intra e intermoleculares y también ácido sulfénico (-S-OH), ácido sulfinico (-SO₂H) y ácido sulfónico (-SO₃H) (Moldogazieva *et al.*, 2018). Como consecuencia, la proteína sufre una modificación alostérica que altera su función. Un ejemplo de esto es la regulación que ocurre a nivel de las enzimas peroxirredoxina (PRDX) que eliminan el H₂O₂. El mecanismo implica la oxidación del grupo SH en el residuo Cys a -S-OH en una subunidad de las proteínas y luego la hiperoxidación a -SO₂H, resultando en la activación e inactivación de la enzima, respectivamente (Rhee *et al.*, 2005). Este mecanismo también ocurre en numerosas vías de transducción de señal cuando un ligando se une a su receptor (Moldogazieva *et al.*, 2018).

Varios investigadores demostraron que los polifenoles a muy baja concentración, en cultivo celular, generan bajas concentraciones de H₂O₂, lo que aumenta la proliferación celular, la reparación de heridas y la supervivencia; sin embargo, a altas concentraciones debido a la alta generación de H₂O₂, inhiben la proliferación, la angiogénesis, la reparación de heridas y disminuyen la supervivencia celular (Costa *et al.*, 2020). Por otro lado, se encontró que el preconditionamiento de las células con H₂O₂ modula las enzimas de fase II a través de la activación de PI3K/Akt quinasa (fosfatidilinositol-3 quinasa / proteína quinasa B), MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos) y JNK (c-Jun N-terminal quinasa) (Angeloni *et al.*, 2011, Mo *et al.*, 2012).

El H₂O₂ en concentraciones de 1 a 5 M generado a partir de t-BHQ (terc-butilhidroquinona), resveratrol y curcumina, activa Nrf2 y las enzimas de fase II en los astrocitos (Rhee *et al.*, 2000).

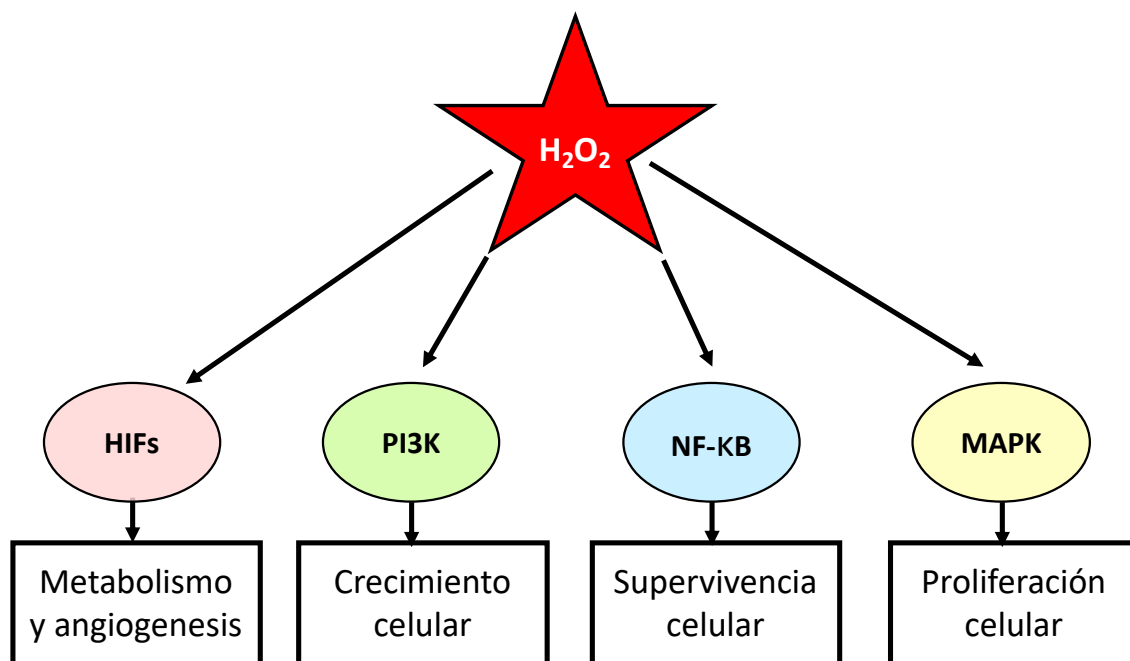


Figura 2. Regulación de ROS en células. H_2O_2 se requiere para la activación de varias vías celulares. Extraído y modificado de Schieber & Chandel (2014).

1.2.2 Vía de señalización antioxidante *Nrf2/Keap1/ARE*

Todas las células animales poseen un sistema de respuesta frente a condiciones de estrés oxidativo, siendo una regulación compleja, altamente sensible y capaz de responder a muchos estímulos o inductores diferentes. El sistema más estudiado es el complejo formado por Nrf2/Keap-1 (Ma, 2013).

1.2.2.1 *Nrf2*, factor de transcripción eritroide tipo 2

El Nrf2, es un miembro de la familia de factores de transcripción Cap'n'Collar (CNC), que posee una región básica tipo zipper, rica en leucina conocida como bZip (Silva-Islas & Maldonado, 2018). Se distribuye a lo largo de múltiples tipos celulares y está compuesta por 605 residuos de aminoácidos (Itoh *et al.*, 1997), demostró por primera vez que Nrf2 es el principal factor de transcripción que regula la expresión de genes que codifican para enzimas detoxificantes fase II. Por lo tanto, su función es la regulación del estado redox en la célula. En este sentido, se ha demostrado que la delección y/o disminución de esta proteína se encuentra asociada al incremento del EO (Miller *et al.*, 2012), lo cual lo hace ser una molécula crítica para la mantención de la

homeostasis celular (Li *et al.* 2012). Estructuralmente, posee 7 dominios altamente conservados llamados Neh1-Neh7 como se observa en la **figura 3A** (Baird & Yamamoto, 2020). Neh1 es el dominio hidrofóbico del tipo bZip, una región básica de leucina, la cual le permite formar un heterodímero al interaccionar con la familia de pequeñas proteínas Maf (sMaf) y otros factores de transcripción como Jun (Tkachev *et al.*, 2011). El heterodímero se une al ADN específicamente a una región conocida como elementos de respuesta antioxidantes (ARE). Neh2 y Neh6 son regiones de aminoácidos involucradas en la degradación de la proteína (degron). Al dominio Neh2 se une la proteína Keap1, el principal represor de Nrf2. Los dominios Neh3, Neh4 y Neh5 son regiones de transactivación, que mediante la unión de factores de transcripción favorecen la tasa de expresión de genes activados por Nrf2. Por último, Neh7 es un dominio implicado en una vía de represión de Nrf2 diferente a Keap-1 (Silva-Islas & Maldonado, 2018). La regulación de Nrf2 ocurre en 3 niveles: I) transcripcional: a través de factores de transcripción (PPAR γ , NF- κ B, c-Jun), autoregulación y mecanismos epigenéticos. II) traduccional: Nrf2 es regulado por mTORC1 cuando las condiciones de la células están en homeostasis, mientras que, en situaciones de estrés oxidativo la regulación de Nrf2 es llevada a cabo por el mecanismo de sitio de entrada ribosomal interno (IRES) III) post-traduccional: La regulación es llevada a cabo vía inducción de ubiquitinación en el proteosoma principalmente a través de Keap-1.

1.2.2.2 Keap-1, *proteína 1 asociada a ECH similar a Kelch*

La proteína Keap-1 corresponde a una metaloproteína de zinc que pertenece a la superfamilia de proteínas BTB-Kelch, constituida por 627 residuos de aminoácidos (Moi, 1994). Posee 5 dominios estructurales como se muestra en la **figura 3B** la región N-terminal (NTR), el dominio BTB responsable de la dimerización e interacción con la proteína Culin-3 que contiene el complejo E3 ubiquitina ligasa (Cul3-E3). Un dominio intermedio (IVR) que contiene residuos de cisteína sensibles a la oxidación y a señales de exportación nuclear (motivos NES) (Silva-Islas & Maldonado, 2018). Dentro de los residuos de cisteína que se han identificado y que están implicados en la represión de la actividad de Nrf2 mediada por Keap-1 y en la ubiquitinación de Nrf2 dependiente de Keap1 están: Cys151, Cys257, Cys273, Cys288, Cys297, Cys434 y Cys613 (Tkachev *et al.*, 2011; Dinkova-Kostova *et al.*, 2002; Zhang & Hannink, 2003; Yamamoto *et al.*, 2008). También presenta un dominio DGR/Kelch que consiste en 6 repeticiones tipo Kelch que median la asociación de la proteína Keap-1 con Nrf2 y proteínas del citoesqueleto, y por último una región C-terminal (CTR) (Tkachev *et al.*, 2011; Silva-Islas & Maldonado, 2018). Keap-1 actúa como un sensor molecular de estrés químico y

oxidativo para un amplio rango de compuestos, que activan la proteína en Nrf2 (Tkachev *et al.*, 2011). Además, es el principal regulador negativo de la proteína Nrf2 (Baird & Dinkova-Kostova, 2011).

1.2.2.3 ARE, elementos de respuesta antioxidante

El factor de transcripción Nrf2 regula la expresión de muchos genes, los cuales poseen en la región promotora elementos *cis*-reguladores transcripcionales denominados elementos de respuesta antioxidante (ARE). Los ARE corresponde a una secuencia de ADN central compuesta por 5'-TGACnnnGC-3' (n = cualquier base), que luego se expande a 16 pares de bases 5'-TMAnnRTGAYnnnGCR-3' donde M = A o C, R = A o G, Y = C o T (Rushmore *et al.*, 1991; Nioi *et al.*, 2003). Muchos factores de transcripción interactúan con AREs reprimiendo o activando la expresión de múltiples genes citoprotectores tales como: NQO1, HMOX-1, glutatión S-transferasa A1 (GSTA1), glutamato-cisteína ligasa subunidad modificadora y catalítica (GCLM y GCLC) (Alam *et al.*, 1999; Venugopal & Jaiswal, 1996; Moinova & Mulcahy, 1999). Dentro de los factores de transcripción más importantes se encuentran Nrf2, proteínas Jun, sMaf, Bach1, ATF4, entre otros (Raghunath *et al.*, 2018). Cuando la célula está en homeostasis Bach1 (BTS), un represor transcripcional de ARE, forma un heterodímero con la proteína sMaf, bloqueando la unión de Nrf2 al ADN. Mientras que en condiciones de EO, Nrf2 se transloca al núcleo se une a ARE y Bach1 es degradado (Ma, 2013). Esto proceso activa la expresión de genes diana dependientes de ARE (Abed *et al.*, 2015) que están involucrados en la respuesta antioxidante y detoxificación, proliferación celular, metabolismo, señalización, ciclo y supervivencia celular, entre otros (Silva-Islas & Maldonado, 2018). La región promotora de Nrf2 también tiene secuencias ARE, lo que ayuda en la amplificación de su propia transcripción durante la respuesta de defensa en las células eucariotas (Nguyen *et al.*, 2003).

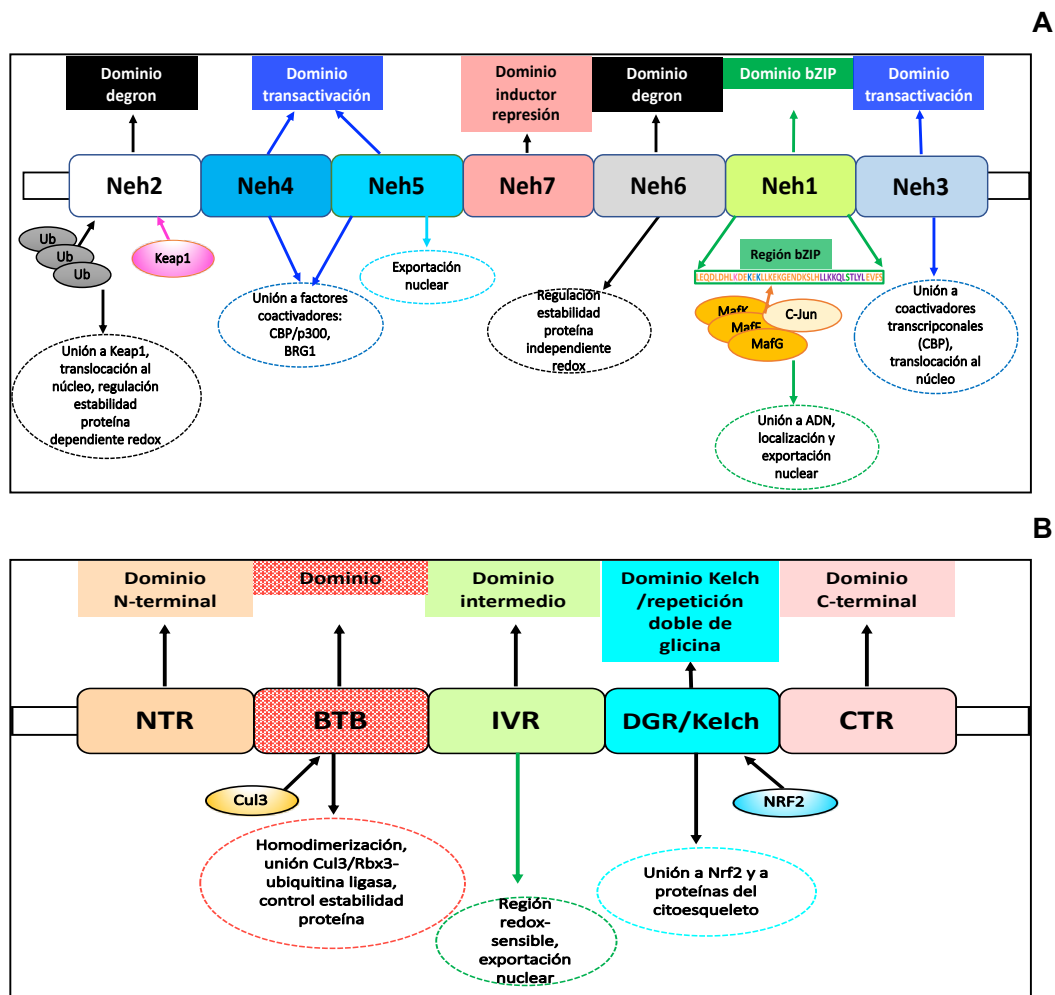


Figura 3. Estructura y dominios de la proteína Nrf2 y Keap-1 humana. (A) Proteína Nrf2 (B) Proteína Keap1. Extraído y modificado de Tkachev *et al.*, (2011) y Silva-Islas & Maldonado (2018).

1.2.3 Mecanismo de activación y regulación del sistema Nrf2/Keap1/ARE, dependiente de Keap-1

En condiciones de homeostasis celular (**figura 4A**), el nivel de Nrf2 y su activación está controlada principalmente por Keap-1. Se produce cuando el motivo_{ETGE} en el dominio Neh2 de Nrf2 interacciona fuertemente con la superficie del dominio Kelch del promotor del homodímero de Keap-1. Posteriormente ocurre una interacción similar, pero con menor afinidad, entre el motivo_{DLG} en Neh2 con el segundo promotor de otro homodímero de Keap-1 (Taguchi *et al.*, 2011), formando el complejo Nrf2-Keap-1 (Magesh *et al.*, 2012). La conformación cerrada del complejo formado orienta una región rica en lisina presente en el dominio Neh2 de Nrf2 para que ocurra el proceso de

ubiquitinación dependiente de Keap-1, donde participan el complejo de ubiquitina ligasa E3 y las proteínas Cul3 y Rbx1. El complejo Nrf2-Keap1 ubiquitinado es transferido al proteosoma 26s para su degradación. Nrf2 es degradado rápidamente (vida media <20 minutos), lo que resulta en una disminución de Nrf2 (Kobayashi *et al.*, 2004; Canning *et al.*, 2015; Suzuki & Yamamoto, 2015).

Por otro lado, en presencia de un estado de EO (**figura 4B**), Nrf2 es activado induciendo la expresión de diferentes genes blanco que están involucrados en procesos de citoprotección (Baird *et al.*, 2011). Nrf2 puede ser inducido por muchas moléculas como ROS, compuestos electrofílicos como sulforafano o ter-butil hidroquinona y iones metálicos como cadmio (Cd^{+2}), Arsénico (As^{+3}) y selenio (Se^{+4}), entre otros (McMahon *et al.*, 2010). La activación de Nrf2 se produce cuando está presente alguna molécula inductora. Existen 3 modelos que describen como se llevaría a cabo este proceso, no obstante, se desconoce cuál es el que ocurre exactamente. El modelo más reciente se basa en que la presencia de inductores causa la oxidación de grupos tiols en los residuos de cisteína (Cys) presentes en Keap1 (Abed *et al.*, 2015), lo que provoca un cambio conformacional de su estructura. Este cambio induce la interacción del complejo Nrf2-Keap-1 a través de una conformación cerrada modificada, evitando que la región rica en lisina, presente en Nrf2, quede bien orientada para la ubiquitinación (Fukutomi *et al.*, 2014; Baird & Yamamoto, 2020). Por lo tanto, la degradación de Nrf2 disminuye, así como también el nivel de Keap1 (Gremmels *et al.*, 2017). La proteína Nrf2 queda libre en el citosol, tras lo cual sufre modificaciones post-traduccionales como por ejemplo la fosforilación en dos residuos de serina (**Tabla 1**) por acción de las quinasas AMPK y PKC δ . Estas modificaciones permiten que el factor de transcripción Nrf2 que establezca (vida media de hasta a 200 minutos) y sea translocado al núcleo (McMahon *et al.*, 2006). Nrf2 en el núcleo, interacciona con las proteínas pequeñas Maf a través de su dominio bZIP para formar un heterodímero, el cual se une a las secuencias ARE activando la transcripción de genes como Hemo oxigenasa-1 (HMOX1), GCL and GSTs, entre otros. En esta etapa ocurre una serie de modificaciones químicas en los residuos de lisina del heterodímero de Nrf2, algunas de las cuales se detallan en la **tabla 1** y también se unen proteínas coactivadoras como CBP/p300. Ambos eventos son relevantes para la unión al ADN y en la actividad de Nrf2, respectivamente. Adicionalmente ocurre un fenómeno de auto amplificación de la transcripción del mensajero de Nrf2 (Nguyen *et al.*, 2003) lo que se traduce en un aumento de la cantidad de esta proteína en el citoplasma. Este proceso está relacionado con la presencia de un sitio de entrada ribosómico interno sensible a redox (IRES) en el extremo 5'UTR del ARNm de Nrf2 (Li *et al.*, 2010). IRES-Nrf2 consta de dos regiones de unión de rARN, una de las cuales es muy conservada y

está ubicada cerca del elemento inhibidor, tiene estructura de horquilla y evita la interacción de IRES-Nrf2 con ribosomas en condiciones fisiológicas normales. Bajo estrés oxidativo la supresión se elimina, la actividad de IRES-Nrf2 aumenta, lo que conduce a un incremento de la traducción de Nrf2.

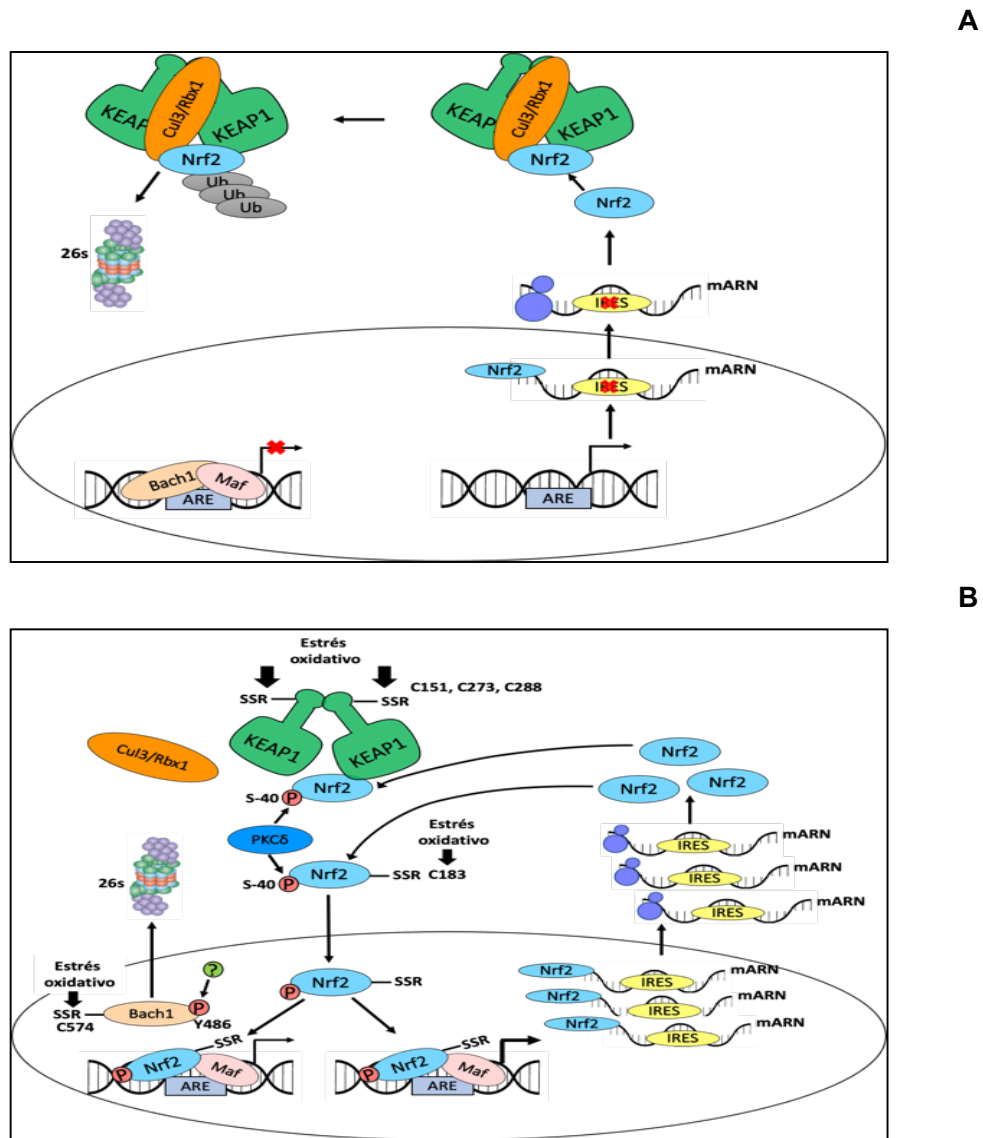


Figura 4. Mecanismo de activación de Nrf2. (A) Regulación de la actividad de Nrf2/Keap1/ARE bajo condiciones de homeostasis celular (B) Activación Nrf2/Keap1/ARE en respuesta a estrés oxidativo. Extraído y adaptado de Tkachev *et al.*, (2011).

1.2.4 Mecanismo de activación y regulación del sistema Nrf2/Keap1/ARE independiente de Keap-1

Adicional a la activación del sistema Nrf2/Keap1/ARE anteriormente descrito, se ha reportado un mecanismo de activación que es independiente de la proteína represora Keap1. Este mecanismo regula la expresión de genes dependiente de ARE a través de la fosforilación de las proteínas Nrf2 y Keap-1, mediante la activación de diferentes vías de transducción de señal como: las de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) tanto ERK (quinasa regulada por señal extracelular) como JNK (quinasa c-jun N-terminal), quinasa-3 fosfatidilinositol (PI3K/Akt), proteína quinasa C (PKC), (Kim & Jang, 2014). Diversos estudios han reportado que las proteínas quinasas activadas por mitógenos ERK, JNK y p38 participan en la regulación de la actividad del sistema Nrf2/Keap1/ARE. No obstante, el control que estas enzimas pudieran ejercer sobre la actividad de Nrf2 es discutible, debido que no está claro el mecanismo por el cual éstas quinasas son activadas. Nrf2 puede ser activado por una serie de moléculas inductoras de estrés, fito-antioxidantes y condiciones patológicas. En este sentido, un estudio demostró el rol de la vía MAPK en la inducción de genes detoxificantes. Los autores observaron que el tratamiento con sulforafano o tBHQ, dos potentes inductores de Nrf2, estimula la actividad de ERK2 en células HepG2, en tanto que el uso de inhibidores de las proteínas MEK genera reducción del contenido de Nrf2 presente en las células, lo que da cuenta que la fosforilación dependiente de ERK da como resultado la estabilización del factor de transcripción, lo que debilita su interacción con Keap1 (Yu *et al.*, 1999). Otro estudio encontró que EGCG, la catequina más abundante del té verde, indujo de forma potente la expresión génica mediada por ARE, a través de la activación de la vía de la MAPK. Esta a su vez estimuló la actividad de caspasa-3 induciendo apoptosis en células HeLa, contribuyendo de esta forma a rol quimiopreventivo de EGCG (Chen *et al.*, 2000). De la misma forma, curcumina y ácido cafeico fenil-éster (CAPE) inducen la expresión de Nrf2 y su unión a ARE a través de la activación de MAPK. Este efecto fue asociado al aumento de expresión y actividad de la enzima HMOX-1 la cual actúa protegiendo a la célula contra diversas formas de estrés (Balogun *et al.*, 2003). Similarmente, un estudio reportó mayor translocación al núcleo de Nrf2 y con ello la inducción de la expresión del gen HMOX-1, en células hepáticas humanas sometidas a estrés por etanol y tratadas con quercetina. Estos hallazgos se evidenciaron en ausencia de inhibidores de la vía MAPK, mientras que en presencia de inhibidores p38 y ERK el efecto fue el opuesto. Por lo tanto, quercetina estimula la expresión de Nrf2 en el núcleo y de HMOX-1 mediante la activación de la vías de señalización p38 y ERK (Yao *et al.*, 2007). Por otro lado, Sun *et al.*, (2009) demostraron de Nrf2 es

fosforilado por MAPKs, que la pérdida de la fosforilación provoca cambios moderados en la actividad transcripcional de la proteína y también una leve mejora en la concentración nuclear de Nrf2. A pesar de estos hallazgos los autores concluyeron que el mecanismo por el cual las MAPK regulan la vía de señalización de Nrf2/ARE se basa en una combinación tanto de fosforilación directa e indirecta sobre la proteína Nrf2 (Sun *et al.*, 2009).

La PKC δ (Niture *et al.*, 2009) regula la interacción de Nrf2 con Keap1 mediante fosforilación de un residuo de serina (S40) en el dominio Neh2 de Nrf2, situado entre los motivos ETGE y DLG. Esto genera el aumento de la estabilidad de Nrf2 y su vida media en la célula (Huang *et al.*, 2002). Para la activación completa del sistema de señalización Nrf2/Keap1/ARE a través de PKC, es necesario que ocurra tanto la fosforilación del factor de transcripción Nrf2 como la modificación de los residuos de cisteínas en el represor Keap1. Por otro lado, un estudio reportó que la actividad de Nrf2 aumenta bajo activación sostenida de la ruta PI3K-Akt (Murakami & Motohashi, 2015). Asimismo, otros autores han señalado que la cascada de señalización de la proteína PI3K/Akt se activa en diferentes tipos de celulares cuando son estimuladas por acción de moléculas como sulforafano, triterpenoides, peroxinitrito o un fenol antioxidante como curcumina (Li *et al.*, 2007). Por ejemplo, se ha visto que la activación de ésta vía regula el estado redox de las células endoteliales aórticas en ratones y previene el desarrollo de placas ateroscleróticas a través de la activación de Nrf2 (Dai *et al.*, 2007). EGCG estimula la translocación nuclear de Nrf2 mediante la inhibición de PTP1B, una fosfatasa, que regula la activación la vía de señalización PI3K/Akt impidiendo la desfosforilación y, por la tanto, la inactivación de la vía. De esta forma modula la transcripción de Nrf2, aumentando la expresión de genes diana como las enzimas antioxidantes HMOX-1 y NQO1 (Mi *et al.*, 2018).

La curcumina proporciona neuroprotección en modelos in vivo de lesión cerebral traumática e isquemia-reperfusión cerebral a través de las vías de señalización p-Akt y p-mTOR (diana de la rapamicina en mamíferos) y Nrf2-ARE (elemento de respuesta antioxidante) (Dai *et al.*, 2018).

También se encontró que el resveratrol confiere neuroprotección en ratones contra los déficits relacionados con el envejecimiento a través de un mecanismo dependiente de Erk 1/2 (Allen *et al.*, 2018).

Además de las enfermedades representativas descritas arriba, Nrf2 ha sido implicado en una amplia gama de otras enfermedades crónicas, incluida la diabetes (Jiménez-Osorio *et al.*, 2014), cardiovascular (Li *et al.*, 2009), gastrointestinal (Khor *et al.*, 2006), enfermedades hepáticas y autoinmunes (Kurzawski *et al.*, 2012; Maicas *et al.*, 2011), todos que se asocian característicamente con el estrés oxidativo (Abed *et al.*, 2015). En lo que respecta al desarrollo de la enfermedad, el daño oxidativo agrava las condiciones fisiopatológicas.

Por lo tanto, Nrf2 puede participar en múltiples efectos protectores contra una variedad de enfermedades crónicas al regular el estrés oxidativo y la señalización de la respuesta al estrés antioxidante. Por tanto, la vía Keap1-Nrf2-ARE se muestra ampliamente involucrada en diversas enfermedades y mecanismos biológicos, lo que genera interés en la vía como un objetivo farmacológico prometedor para la prevención y el tratamiento de enfermedades.

Las quinonas (p. Ej., 1,4-naftoquinona) y los derivados polifenólicos (p. Ej., curcumina) también inducen genes ARE mediados por Nrf2 (Magesh *et al.*, 2012). A diferencia de las quinonas, el catecol, los compuestos polifenólicos y la hidroquinona (p. Ej., Terc-butilhidroquinona, tBHQ) se oxidan a quinonas electrófilas que contienen aceptores de Michael en presencia de suficiente oxígeno y cobre II u otros metales de transición, lo que activa la transcripción mediada por ARE (Sirota *et al.*, 2015).

Tabla 1. Principales modificaciones químicas que ocurren en la activación y represión de la vía de señalización Nrf2/Keap/ARE.

Residuo aminoacídico	Ubicación	Modificación	Función
K438, K443, K445, K533, K536 y K538	Dominio bZIP (Nrf2)	Acetilación	Permite la unión a ADN
S558		Fosforilación	Translocación de Nrf2 al núcleo
S40	Dominio Neh2 (Nrf2)	Fosforilación	Translocación de Nrf2 al núcleo
K44, K50, K52, K53, K56, K64 y K68		Ubiquitinación	Aceptores de aminoácidos de ubiquitina
C273, C288 y C297	Dominio BTB (Keap1)	Oxidación	Disminuir la degradación de Nrf2 e incrementar su activación y translocación al núcleo
C151	Dominio IVR (Keap1)		

1.3 Propóleos y polifenoles: compuestos bioactivos

Desde la antigüedad, el uso de compuestos naturales ha sido de gran importancia para la medicina principalmente en la prevención y tratamiento de diferentes patologías (Li *et al.*, 2014; Fraga *et al.*, 2010). Es por esto que representan la principal fuente de compuestos utilizados en el descubrimiento y/o desarrollo de nuevos fármacos (Silva-Carvalho *et al.*, 2015). En la actualidad han sido identificados más de 8000 compuestos naturales (Fraga *et al.*, 2010). Un ejemplo de compuesto natural con potencial bioactivo es el propóleos, el cual es utilizado comúnmente en la medicina popular desde hace varios siglos. La palabra propóleos viene del griego que significa “para o ir en defensa de la ciudad”, es un compuesto resinoso rico en polifenoles (Burdock, 1998) producido por las abejas a partir de exudados vegetales (Sforcin & Bankova, 2011). Las abejas lo utilizan como mecanismo de defensa para la colmena de depredadores o microorganismos y también como aislante térmico. Estudios tanto in vitro como in vivo han identificado para el propóleos una amplia variedad de actividades biológicas como: antibacteriano (Grange & Davey, 1990), antifúngico (Dobrowolski *et al.*, 1991), antioxidante (Daleprane *et al.*, 2013), antiinflamatorio (Tan-No *et al.*, 2006), anticancerígeno (Grunberger *et al.*, 1988) y antiangiogénico (Daleprane *et al.*, 2012). Todas las bioactividades que han sido descritas para el propóleos se atribuyen a su composición rica en compuestos fenólicos.

1.3.1 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos (CFs) bioquímicamente, son metabolitos secundarios sintetizados exclusivamente en las plantas a través de tres rutas metabólicas: pentosa-fosfato, shikimato y fenilpropanoide. En la planta, cumplen múltiples funciones durante el crecimiento, desarrollo y defensa, por lo cual, se encuentran en hojas, frutos y semillas, así como en una amplia gama de alimentos de origen vegetal como: verduras, té, cacao, vino, etc. (Manach, *et al.*, 2004). Se caracterizan por poseer una gran poder antioxidante que está ligado a su capacidad como agentes reductores ya sea como donadores de hidrógeno o electrones. Además, tienen la capacidad de quelación de metales, particularmente hierro y cobre, suprimiendo la formación de radicales libres catalizados por metales. La estructura básica de un CF consta de uno o mas grupos hidroxilos unidos a dos o tres anillos aromáticos **figura 5A** (Vermerris & Nicholson, 2006). En este sentido, el número de grupos hidroxilo y su posición en relación con el grupo funcional carboxilo influye en la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos (Balasundram *et al.*, 2006).

1.3.2 Clasificación de compuestos fenólicos

De forma general los CFs se clasifican como fenoles simples y polifenoles. También, se pueden clasificar según el número de anillos aromáticos que posee, tipo y número elementos estructurales unidos al anillo aromático (Vermerris & Nicholson, 2006). Los grupos mas importantes de CFs son: compuestos fenólicos simples, ácidos fenólicos, estilbenes (resveratrol) y flavonoides (Vermerris & Nicholson, 2006). Dentro de los ácidos fenólicos podemos mencionar al ácido cinámico, p-cumarínico, ferúlico, gálico y cafeico (Durazzo *et al.*, 2019). Químicamente, los ácidos fenólicos tienen como mínimo un anillo aromático donde al menos un hidrógeno está sustituido por un grupo hidroxilo (Heleno *et al.*, 2015) (**Figura 5B**). Estas moléculas se encuentran en una gran variedad de frutas como berries, manzana, tomate, ciruelas y también en semillas y cereales.

Por otra parte, encontramos al grupo más grande de CFs los flavonoides. Se caracterizan por presentar dos anillos aromáticos (A y B), unidos por un puente de tres carbonos, frecuentemente en forma de un anillo heterocíclico (C) (**Figura 5C**). El anillo presenta diferentes patrones de sustituciones lo que da origen a la variedad de clases de flavonoides. Dentro de este grupo encontramos a flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavonoles, antocianidinas, biflavonas, chalconas, auronas, y cumarinas (Vermerris & Nicholson, 2006). Algunos ejemplos de flavonoides son la apigenina y luteolina encontradas en cereales y hierbas aromáticas como perejil, romero y tomillo, quercetina y kaempferol que son predominantes en verduras y frutas. Las isoflavonas se encuentran con mayor frecuencia en las legumbres, antocianidinas están presentes en las manzanas y uvas. Otros flavonoides incluyen curcumina, pinocembrina, pinobanksina entre muchos más.

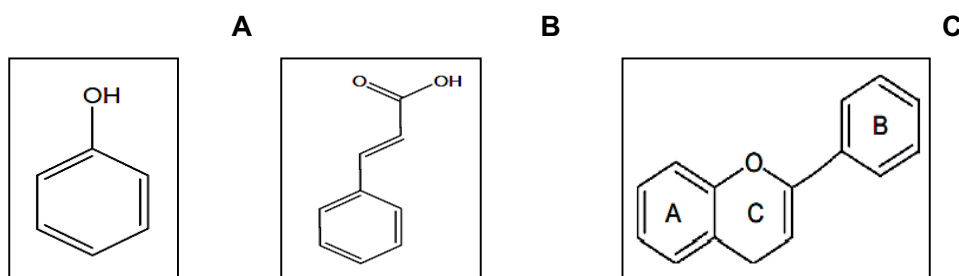


Figura 5. Estructura química de compuestos fenólicos. (A) Estructura básica de fenoles. (B) Estructura de ácido fenólico. (C) Estructura de flavonoide.

1.3.3 Propiedades de los polifenoles

Actualmente se sabe que los polifenoles poseen diferentes propiedades biológicas con efectos benéficos para la salud (Fraga *et al.*, 2019; Lorenzo *et al.*, 2021), que en parte son atribuible a su capacidad como antioxidantes. Dentro de las propiedades biológicas podemos destacar: relajantes, ya que son capaces de generar vasodilatación en células endoteliales (Woodman & Chan, 2004), antioxidantes pues eliminan radicales como superóxido y peróxido, además de inhibir una variedad de enzimas responsables de la producción de radicales libres (Sedlak *et al.*, 2018), antitrombóticas pues inhiben la actividad del factor tisular en monocito de sangre periférica y así como también la actividad de la trombina (Bijak *et al.*, 2014), antiangiogénicas ya que inhiben la proliferación, migración y diferenciación morfogénica de las células endoteliales (Paeng *et al.*, 2015), antiinflamatorias (Gao *et al.*, 2014), anticancerígenas (Turrini *et al.*, 2015), entre otras. Estudios en una cohorte prospectiva revelaron una relación inversa entre el consumo de frutas y vegetales ricos en polifenoles y el riesgo de enfermedades no transmisibles como la diabetes o el cáncer (Sedlak *et al.*, 2018; Gu *et al.*, 2019). En este sentido, Lall *et al.*, (2015) concluyeron que el consumo de polifenoles en la dieta modula cambios epigenéticos como acetilación de histonas y miRNAs de oncogenes, además de que afectan etapas en la tumorigénesis en el cáncer de próstata. Otros autores indican que dietas con alta ingesta de polifenoles reducen el riesgo de mortalidad por enfermedades cardiovasculares (Poti *et al.*, 2019). Evidencia de esto es un estudio realizado en ratones *knockout* para ApoE que fueron alimentados durante 8 semanas con una mezcla de polifenoles. Entre los resultados obtenidos, se encontró una reducción significativa la placa aterosclerótica en el seno aórtico y aorta ascendente (Norata *et al.*, 2007). De la misma manera, otro estudio reveló que la suplementación de la dieta con extracto de caqui rico en polifenoles, mantiene los niveles de lípidos plasmáticos en ratones hipercolesterolémicos en comparación a los ratones alimentados sólo con dieta hipercolesterolémica, así como también disminuyó significativamente las lesiones ateroscleróticas en la aorta (Gorinstein *et al.*, 2011). Mientras que el uso de una mezcla de resveratrol, ácido cafeico y catequina reduce significativamente la placa de ateroma en ratones *knockout* para ApoE (Norata *et al.*, 2007). Por lo anterior es que algunos autores han postulado que cuando se incluye en las dietas alimentos ricos polifenoles, el riesgo de desarrollar enfermedades no transmisibles como las cardiovasculares disminuye, por lo tanto, también previene el desarrollo de lesiones ateroscleróticas (Cullen *et al.*, 2020). Debido a esto, los polifenoles son considerados como buenos candidatos como agentes farmacológicos útiles en la prevención y/o terapia de diferentes enfermedades entre ellas las

cardiovasculares. Sin embargo, la evidencia indica que la ingesta diaria de polifenoles trae muchos beneficios a la salud (Pandey & Rizvi, 2009), pero, su eficiencia como tal es muy diversa, ya depende de muchos factores tales como: concentración, sitio de unión y estructura (Fraga *et al.*, 2010; D'Archivio *et al.*, 2019), entre otros.

1.3.4 Propóleos y polifenoles: moléculas con potencial farmacológico para el desarrollo de nuevas drogas

Gracias a las múltiples propiedades descritas para el propóleos y también para los polifenoles es que actualmente estas moléculas son muy utilizadas en la industria cosmética y farmacéutica. Químicamente, el propóleos está compuesto por resina, ceras, aceites esenciales, polen, además de minerales, vitaminas, aminoácidos y compuestos fenólicos (Anjum *et al.*, 2019). Se han identificado mas de 300 componentes, lo que favorece que el propóleos sea considerado como un buen y potencial candidato para el descubrimiento de nuevos fármacos, que puedan ser útiles en el tratamiento de diferentes condiciones patológicas. Desde este punto de vista, muchas enfermedades que actualmente afectan a un grupo amplio y variado de personas en el mundo, sobre todo en la vejez; cursan con una característica en común, y es que desarrollan procesos patológicos que conllevan a inflamación, EO e angiogénesis. Dentro de este grupo de enfermedades encontramos las reumáticas, oftalmológicas, cáncer, cardiovasculares, entre otras. Debido a esto, se han evaluado una serie de compuestos, entre ellos los polifenoles, cuyo potencial farmacológico derivaría en su uso para el tratamiento de estas enfermedades. Diversos estudios han reportado que polifenoles como quercetina, luteolina, curcumina, ácido cafeico fenilester muestran gran capacidad antiangiogénica (Diniz *et al.*, 2017) la cual ha sido asociada principalmente al grado de actividad antioxidante que estas moléculas presentan. También se ha visto que el tratamiento con propóleos disminuye los cambios en el cartílago y previene el desarrollo de osteoartritis en modelo de ratas senescentes (Arias *et al.*, 2019). Otro estudio demostró el efecto neuroprotectivo y antiinflamatorio del resveratrol en ratas sometidas a injuria cerebral por radiación (Zhang *et al.*, 2020). A pesar de la enorme variedad de estructuras químicas que se encuentran presentes en el propóleos y de toda la evidencia disponible hasta la fecha que da cuenta de su potencial farmacológico, aún no ha sido posible establecer cual es la composición y abundancia exacta de los polifenoles en el propóleos.

1.3.5 Variabilidad de polifenoles en la composición del propóleos

Varios estudios evidencian que la composición química y abundancia de polifenoles presentes en el propóleos es altamente variable debido a su estrecha dependencia con el origen botánico de las plantas, clima, ubicación geográfica como se muestra en la **tabla 2**, año y época de recolección (Silva-Carvalho *et al.*, 2015; Barrientos *et al.*, 2013; Bankova, 2005). Es por ésta razón que la separación de los componentes del propóleos es muy compleja, lo que dificulta su estandarización. Ejemplos de esta importante dependencia son los estudios de tres propóleos brasileños, uno polaco y uno chileno. Para el propóleos brasileño, Daleprane *et al.*, (2012) informó que la artepellina C, pinocembrina y kampferol eran los componentes más abundantes del propóleos verde; mientras que para el propóleos rojo 3-hidroxi-8,9-dimetoxipterocarpano, medicarpina y daidezeína fueron sus principales componentes; en tanto que pinocembrina, ácido cafeico fenilester, quercetina y galangina fueron los componentes principales del propóleos marrón. En el caso del propóleos polaco, Szliszka *et al.*, (2013) detectó que estaba compuesto principalmente por los flavonoides pinobanksina, crisina y metoxiflavanona; y los ácidos fenólicos cumarina, ferúlico y cafeico. Finalmente, para el propóleos chileno con actividad anti-aterogénica y antiangiogénica (Cuevas *et al.*, 2015), los principales polifenoles detectados en el extracto etanólico fueron el ácido cafeico (un ácido fenólico) y la pinocembrina (una flavonona) (Cuevas *et al.*, 2014).

Tabla 2. Caracterización de componentes de propóleos, según origen geográfico y fuente vegetal*.

Origen Geográfico	Fuente Botánica	Mayores componentes
Chile		
Región Valparaíso	<i>Trevoa quinquenervia</i> Gill. et Hook., <i>Retanilla trinervia</i> Gill. et Hook., <i>Colliguaja odorifera</i> Mol., <i>Escallonia pulverulenta</i> Pers.	Ácido cafeico, quercetina, kaempferol, apigenina, pinocembrina, CAPE, galangina
Región Metropolitana	<i>Cardamine</i> o <i>Menonvillea</i> , <i>Proustia pyrifolia</i> DC., <i>Quillaja saponaria</i> Mol., <i>Eucalyptus globulus</i> Labill.	Ácido cafeico, resveratrol, miricetina, quercetina, kaempferol, apigenina, pinocembrina, ácido cafeico fenetil ester, galangina
Región del Libertador Bernardo O'Higgins	<i>Lithrea caustica</i> Hook. et Arn., <i>Raphanus sativus</i> L., <i>Galega officinalis</i> L., <i>Retanilla trinervia</i> Gill. et Hook.	Ácido cafeico, miricetina, kaempferol, apigenina, pinocembrina, ácido cafeico fenetil ester, galangina
Región de La Araucanía	<i>Lotus uliginosus</i> Schk., <i>Buddleja globosa</i> Hope, <i>Hypochaeris</i> or <i>Taraxacum</i> , <i>Caldcluvia</i> or <i>Eucryphia</i>	Ácido cafeico, miricetina, quercetina, kaempferol, apigenina, pinocembrina, ácido cafeico fenetil ester, galangina
Brasil		
Propóleos Verde	<i>Baccharis</i> spp., predominantemente <i>B. dracunculifolia</i>	Fenilpropanoides prenilados, ácidos fenólicos, ácidos p-cumarico, acetofenonas, ácidos diterpénico, ácidos cafeilquinico, Kaempferido, isosakuranetina y kaempferol
Propóleos rojo	<i>Dalbergia acastaphyllum</i>	Formononetina, isoliquiritigenina, liquiritigenina, medicarpina y biochanina A
Cuba, Venezuela	<i>Clusia</i> spp., más específicamente <i>C. Rosea</i> y <i>C. minor</i>	Benzofenonas poliisoprenilado, más específicamente nemorosona, xantoquimol y gutiferona E
Turquía	<i>Populus</i> spp., <i>Eucayptus</i> spp., y <i>Castanea sativa</i>	Pinocembrina, pinobanksina y su acetato, ácido cafeico prenil ester, ácido ferúlico, ácidos diterpénicos de tipo pimarico, isopimarico, abietico, ácido dihidroabietico, cinamato cinamil y oleato etil, ácidos aromáticos esterificados como bencil cinamato, ácido benceno dicarboxílico y flavonoides como benzopirano y crisina.
Australia	<i>Acacia paradoxa</i> <i>C. terrelliana</i> tres (fruit resins)	Xantoroel, pterostilbeno, sakuranetina, pinostrobin, stilbenes, tetrahidroxistilbenes prenilados, ácido cinámico prenilado, flavononas, flavonoles y chalconas

*Adaptado de Silva-Carvalho *et al.*, (2015) & Barrientos *et al.*, (2013).

1.3.6 Farmacocinética de polifenoles

Diversos autores han reportado que los polifenoles tienen una baja farmacocinética, lo que indica baja biodisponibilidad (Pandareesh *et al.*, 2015). Esto se debe a que la farmacocinética de los polifenoles se ve influenciada tanto por factores intrínsecos que son inherentes a la molécula como tal, así como también factores extrínsecos aquellos que se asocian al individuo como edad, estado de salud, ambiente de la microbiota intestinal y la dieta de los pacientes, así como por sus tratamientos con antibióticos orales (Krook & Hagerman, 2012; Lesser *et al.*, 2004). Dentro de los factores intrínsecos encontramos la concentración, sitio de unión, estructura química y peso molecular, estabilidad en el ambiente gastrointestinal y solubilidad acuosa, que, en

general, tienen un impacto negativo en los niveles de absorción, grado de metabolización, distribución por todo el cuerpo, vida media y excreción (Fraga *et al.*, 2010; D'Archivio *et al.*, 2010). Todo lo anterior se traduce en diferentes informes de baja biodisponibilidad de polifenoles, por ejemplo, 0.56–4.54 nmol/L para antocianinas (Milbury *et al.*, 2010), 0.46-1.28 μ mol/L para flavononas (Manach *et al.*, 2010) y 37-60 nmol/L para ácidos fenólicos (Simonetti *et al.*, 2001). Otro estudio clínico mostró que después de la administración oral de 500 mg/kg de curcumina, los valores encontrados en suero habían disminuido a 0.06 ± 0.01 μ g/ml, es decir, la biodisponibilidad oral de curcumina fue ~1% (Yang *et al.*, 2007). Por otra parte, muchos polifenoles se encuentran glicosilados, lo que dificulta su entrada a través de transportadores gastrointestinales y otros son lábiles a pH ácidos o alcalinos. Sumado a lo anterior, una vez absorbidos sufren modificaciones químicas como sulfatación, metilación, glucoronidación lo cual facilita su eliminación a través de la bilis u orina (Chiou *et al.*, 2014). Sin embargo, y a pesar de que algunos ensayos clínicos de fase I han demostrado que los polifenoles como fármacos seguros, incluso en dosis altas; su administración oral sin protección se traduce en pobre absorción y biodisponibilidad, rápido metabolismo y eliminación sistémica, por ende, baja eficiencia en el sitio de acción (Luca *et al.*, 2020). Es por esto que se han desarrollado varias estrategias para mejorar la biodisponibilidad y bioactividad de los polifenoles, como por ejemplo: la encapsulación con biomateriales, combinación con otras drogas o fitoquímicos, conjugación con aminoácidos, glicosilación, entre otros (Pandareesh *et al.*, 2015).

1.4 Biomateriales y sus aplicaciones

La utilización de biomateriales es un área que actualmente es muy explorada, debido su gran la versatilidad y a sus múltiples usos y beneficios. Sin embargo, su uso se remonta hace miles de años ya que algunas civilizaciones lo utilizaban para la fabricación de partes del cuerpo defectuosas. Un biomaterial es “una sustancia que ha sido diseñada para tomar una forma que, sola o como parte de un sistema complejo, se utiliza para dirigir, mediante el control de interacciones con componentes de sistemas vivos, el curso de cualquier procedimiento terapéutico o diagnóstico, en medicina humana o veterinaria”(Williams, 2009). En el último tiempo el uso de biomateriales tiene varias aplicaciones, principalmente en dermocosmética e industria farmacéutica ya que, mejora la farmacocinética y farmacodinamia de moléculas con uso terapéutico (Golba *et al.*, 2021). En la medicina se utiliza por ejemplo en la fabricación de implantes, marcapasos, stent, catéter urinarios, articulaciones, dispositivos para la administración de fármacos, entre muchos otros (Moya-Ortega *et al.*, 2012; Reddy *et al.*, 2015). Pueden

ser clasificados en distintas categorías de acuerdo a su forma, propiedades fisicoquímicas y a los materiales usados para su síntesis.

1.4.1 Silicio Nanoporoso y β -Ciclodextrina

Un tipo de biomaterial ampliamente utilizado es el silicio poroso (Psi). El Psi está constituido por nanocristales de silicio sumergidos en un esqueleto de sílice poroso (Bisi *et al.*, 2000). Esta compleja estructura porosa puede alcanzar una gran superficie interna ($\sim 500 \text{ m}^2/\text{cm}^3$) (Granitzer *et al.*, 2010). El nanocristal de silicio es redondo y está cubierto por silicio amorfo que se oxida con el tiempo (Petrova *et al.*, 2000). Es un excelente biomaterial que se ha utilizado con éxito para la liberación controlada de diferentes fármacos y biomoléculas (Anglin *et al.*, 2008), debido a su gran superficie, estructura porosa, biocompatibilidad, biodegradabilidad y biorreabsorbibilidad y resistencia a pH bajo (Martín-Palma *et al.*, 2014; Hernández-Montelongo *et al.*, 2015). Estas biopropiedades de Psi se deben a su particular susceptibilidad a la oxidación (Anglin *et al.*, 2008), el óxido de silicio se disuelve fácilmente con los fluidos corporales y se elimina de forma no tóxica como ácido silícico en la orina (Reffitt *et al.*, 1999).

Por otra parte, debido a la versatilidad de su química de superficie, se han explorado diferentes rutas de estrategias de funcionalización para mejorar la carga y liberación controlada de fármacos (Maniya *et al.*, 2016). Una técnica refinada consiste en incrustar polímeros en sus nanoporos para formar composito (Liu *et al.*, 2014). Combinando un polímero flexible y blando dentro de la matriz inorgánica porosa de nPSi, se pueden mejorar tanto la estabilidad como el control de la liberación del fármaco. En este sentido, la β -ciclodextrina (β CD), que es una molécula biocompatible y soluble en agua, se ha utilizado con éxito en aplicaciones de administración de fármacos. La amplia aplicación de β -CD en este campo se relaciona con la posibilidad de formar la complejo “huésped-huésped” (β -CD/fármaco) (Gidwani & Vyas, 2015); los fármacos se encapsulan en la estructura de su cavidad lipofílica, mientras que su superficie exterior es hidrofílica y se puede reticular con otras moléculas (Ej. ácido cítrico), produciendo una red de polímero 3D adecuada para aplicaciones de administración de fármacos. Por lo tanto, al combinar un polímero como la β -CD flexible y blando dentro de una matriz inorgánica altamente porosa de nPSi como sustrato, tanto la estabilidad como el control de la liberación de fármacos pueden mejorarse, aumentando su potencial terapéutico al ir reduciendo su degradación antes de que alcancen los tejidos diana (Hernández-Montelongo *et al.*, 2018). Esta estructura puede aumentar el potencial terapéutico de los

fármacos al disminuir su degradación antes de que alcancen los tejidos diana (Gidwani & Vyas, 2015).

2. PRESENTACIÓN DEL PROBLEMA

La aterosclerosis es una enfermedad de progresión silenciosa que precede a la aparición de cuadros clínicos agudos y graves que ocasionan altos índices de discapacidad y elevadas tasas mortalidad en el mundo. La aterosclerosis es una enfermedad cuya patogenia es muy compleja y que en estadios avanzados conducen a la generación de neoangiogénesis generando como consecuencia un fenotipo de placa aterosclerótica inestable con gran riesgo de ruptura. Por esta razón, la inhibición de la angiogénesis constituye un nuevo blanco terapéutico que hace necesaria la búsqueda de nuevos agentes con potencial farmacológico antiangiogénico. En la actualidad la industria farmacéutica centra sus esfuerzos en el estudio de productos naturales de origen vegetal, focalizándose en el estudio de fitoquímicos, sustancias biológicamente activas que provienen de diversas fuentes vegetales, como por ejemplo, los polifenoles.

Los polifenoles son metabolitos secundarios sintetizados exclusivamente por las plantas, destacándose dentro éstos a los flavonoides y ácidos fenólicos. Un compuesto natural rico en polifenoles es el propóleo, sustancia de origen apícola que presenta un gran número de componentes bioactivos. No obstante, existe una gran variabilidad en su composición química que depende de varios factores, lo que dificulta el aislamiento de sus constituyentes. Adicionalmente estudios reportan baja disponibilidad en circulación, siendo detectado en suero sólo algunos de tales componentes. Se han identificado en el propóleo diferentes efectos biológicos como, por ejemplo, antiangiogénico. Actualmente, existen varias estrategias mediante las cuales se puede mejorar la biodisponibilidad de muchos fármacos, una de ellas es el uso de biomateriales, complejos sistemas que transportan y liberan drogas.

En base a la evidencia disponible y a los antecedentes antes mencionados, es que este estudio pretende abordar aspectos relevantes sobre la angiogénesis como blanco terapéutico para el desarrollo de nuevos agentes antiangiogénicos, derivados de los principales compuestos bioactivos encontrados en el propóleo. Además, dar a conocer el uso de biotecnología como herramienta para mejorar el efecto biológico, la especificidad y la eficiencia de la terapia farmacológica.

3. HIPÓTESIS

La microencapsulación de ácido cafeico y pinocembrina, principales constituyentes bioactivos del propóleos chileno, mejora la actividad antioxidante y antiangiogénica de estos polifenoles, lo que se ve reflejado en cambios de la expresión génica y proteica de genes asociados a respuesta antioxidante vía NRF2/KEAP-1 y al proceso de angiogénesis.

4. OBJETIVO GENERAL

Obtener micropartículas de nPSi- β CD cargadas con ácido cafeico y pinocembrina, principales constituyentes bioactivos de propóleos chileno, y evaluar el efecto de la microencapsulación sobre la actividad antioxidante y antiangiogénica de los polifenoles.

5. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- I. Establecer si las micropartículas nPSi- β CD son un material adecuado y seguro para la carga y la liberación controlada de ácido cafeico y pinocembrina, dos de los componentes principales del propóleos chileno.
- II. Evaluar el efecto antiangiogénico y antioxidante de polifenoles en solución y microencapsulados a través de estudios funcionales.
- III. Evaluar cambios en la expresión de genes blanco y proteínas asociadas a vías de señalización antioxidante y antiangiogénica en células tratadas con polifenoles en solución y microencapsulados.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1 Línea Celular HUVEC

6.1.1 Descripción general y características

Las células HUVEC corresponden a células endoteliales aisladas de la vena umbilical humana normal, proporcionando un modelo clásico para estudiar diversos aspectos de la función endotelial y en enfermedad, como angiogénesis normal, anormal y asociada al tumor, estrés oxidativo, hipoxia, además de vías relacionadas con la inflamación del endotelio en condiciones normales y patológicas, complicaciones relacionadas con enfermedades cardiovasculares asociadas con diversas enfermedades, modo de acción y efectos de protección cardiovascular de diversos compuestos, entre otros.

La línea celular HUVEC (#200p-05n) fue obtenida a Cell Application Inc (San Diego, CA, USA), siendo criopreservada al final del cultivo primario y pudiendo ser cultivada y propagada al menos 16 duplicaciones. Su patrón de crecimiento es en monocapa adherente y su morfología alargada, aplanada, con núcleo prominente y largas filopodias (**Figura 6**). El tamaño celular varía entre 50-80 μm . y los marcadores de linaje mas característicos son CD34, ICAM, VCAM, factor VIII y factor von Willebrand.

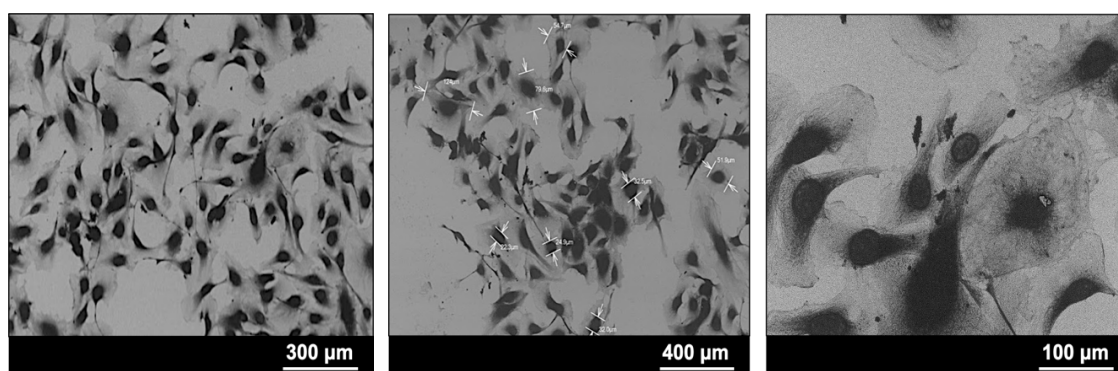


Figura 6. Imágenes de microscopia electrónica de células HUVEC.

6.1.2 Mantención y cultivo de HUVECs

Se cultivaron y mantuvieron células endoteliales de vena umbilical humana (HUVECs) utilizando un medio de crecimiento para células endoteliales (ECGM) (Cell Application, Sigma Aldrich, USA). El medio ECGM fue suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 1% de Glutamina y de antibiótico penicilina/estreptomicina (Corning, New York, NY, USA). Las células fueron cultivadas a una temperatura de 37°C y en un ambiente con 5% CO₂, realizando cambios de medio de cultivo de manera periódica cada 48 horas. Si debido al crecimiento celular la superficie de la botella o placa de cultivo presentó una confluencia >80% se realizaron subcultivos utilizando tripsina/EDTA 0,25% (1:2) (Gibco™, USA) para desadherir las células durante 5 minutos a 37°C. La acción de la tripsina se detuvo adicionando el doble del volumen de tripsina de SFB o solución neutralizadora de tripsina 1X (Corning, New York, NY, USA). Durante el cambio de medio o subcultivo de las células se realizaron 2 lavados a la monocapa con PBS o DPBS 1X (Corning, New York, NY, USA) para eliminar las células no adheridas y/o restos celulares.

6.1.3 Descongelación de HUVECs

Antes de iniciar la descongelación se desinfectaron todas las superficies de trabajo dentro de la cámara de flujo laminar y se preparó el material necesario. Brevemente, primero se retiró el criotubo del nitrógeno líquido, se limpió alrededor de la tapa de criotubo con una toalla de papel empapada en alcohol al 70% y se giró la tapa del tubo para eliminar cualquier residuo de nitrógeno que pudiera haber quedado. Luego se procedió a cerrar el criotubo y se sumergió parcialmente en un baño termoregulado a 37°C para permitir la descongelación del contenido. Posteriormente, se ingresó el criotubo a la cámara de flujo, traspasando el contenido completo del criotubo a un frasco de cultivo T-75 con 5 mL medio de cultivo ECGM completo (SFB, Glutamina y antibiótico). Finalmente, se dejó el frasco dentro de la incubadora en las condiciones estándares de cultivo: temperatura 37°C y en ambiente de 5% CO₂. Al día siguiente se realizó cambio de medio de cultivo para remover el crioprotector residual, lavando con DPBS 1X tibio. Finalmente, se adicionó 10 a 12 mL. de medio completo fresco dejando en el incubador para que las células se repliquen.

6.1.4 Recuento celular

Para establecer la cantidad de células totales vivas a utilizar en los distintos tratamientos, se realizaron recuentos celulares. Para ello se tomó un alícuota de la suspensión celular y se le adicionó como colorante azul tripán 0,5% en una dilución 1:1. El conteo se realizó utilizando un sistema automático LUNA-II (Logos Biosystems, Korea del Sur). Finalmente, previo a la aplicación de cada tratamiento el medio de crecimiento celular fue reemplazado por medio con los diferentes tratamientos suplementado con 1-10% de suero fetal bovino.

6.2 Preparación de la micropartícula de composito de nPSi-βCD

6.2.1 Obtención de micropartículas de silicio nanoporoso

La preparación de la micropartícula de composito nPSi-βCD se realizó utilizando obleas de silicio nanoporoso (nPSi), las cuales se limpiaron mediante ultrasonificación utilizando acetona, isopropanol y agua destilada, durante un período de 15 minutos en cada disolvente. La acetona se utilizó para eliminar las sustancias grasas y aceitosas; luego se agregó isopropanol para retirar restos de acetona, y finalmente se enjuagó con agua destilada para eliminar cualquier residuo de isopropanol. Posteriormente, se fabricaron capas de nPSi mediante grabado electroquímico a partir de las obleas de nPSi limpias, utilizando una solución de HF (48%), EtOH (1:2) bajo condiciones de formación controlada: tiempo de grabado de 30 minutos y densidad de corriente de 80 mA·cm⁻². Se aplicó un pulso de electropulido para obtener capas de nPSi independientes. Para eso, la densidad de corriente aplicada se mejoró a 150 mA·cm² durante 2 segundos. Las capas independientes de nPSi se rasparon con una punta de diamante para obtener micropartículas. Se molieron, se recogieron en EtOH y se sometieron a 10 minutos de agitación con ultrasonido para su homogeneización. Finalmente, las micropartículas de nPSi obtenidas se oxidaron químicamente con H₂O₂ al 30% v/v, durante 12 horas en agitación orbital y se enjuagaron con EtOH (**Figura 7**).

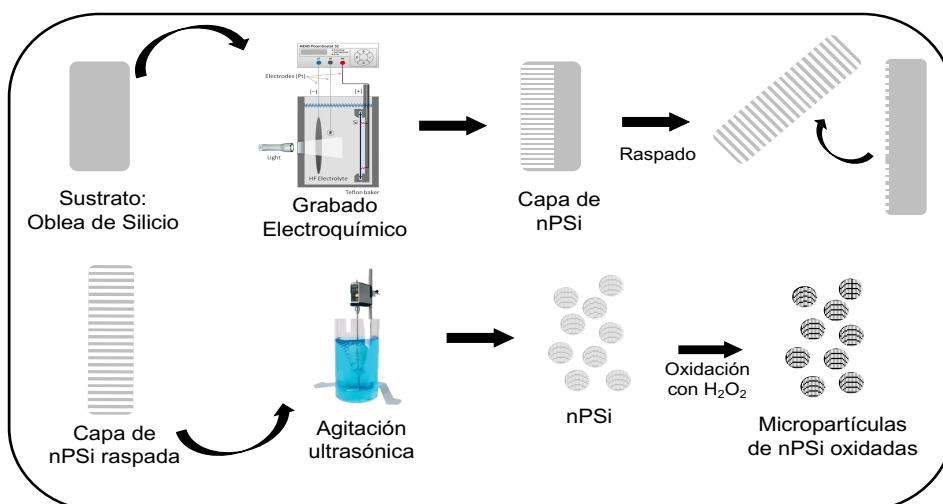


Figura 7. Etapas de la síntesis de las micropartículas de nPSi oxidadas.

6.2.2 Síntesis de micropartícula de compuesto nPSi-βCD

Las micropartículas de nPSi oxidadas fueron el sustrato para sintetizar el compuesto de acuerdo con el protocolo descrito por Hernández-Montelongo *et al.* (2018) (**Figura 8**). Las micropartículas de nPSi fueron sumergidas en una solución de quitosana (Qui) al 1% $\text{p}\cdot\text{v}^{-1}$ durante 15 minutos y después se enjuagaron con EtOH (nPSi-Qui). La solución de Qui se preparó previamente con ácido acético glacial 100 mM, luego, se ajustó el valor de pH a 4 con una solución de HCl 0.1/NaOH. Para la síntesis del compuesto (nPSi-βCD), se preparó una solución del monómero con 10 g de βCD, 3 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ como catalizador y 10 g de ácido cítrico en 100 mL de agua destilada. Luego, nPSi-Qui se sumergió en esta solución durante 15 minutos en agitación.

Las muestras se secaron primero a temperatura ambiente y luego a 90°C, durante 1 hora en cada caso. La polimerización in situ de βCD-ácido cítrico en nPSi-Qui se realizó a 140°C durante 25 minutos. Posteriormente, las muestras se enjuagaron con EtOH, se secaron a 90°C durante 1 hora y se molieron para su homogeneización.

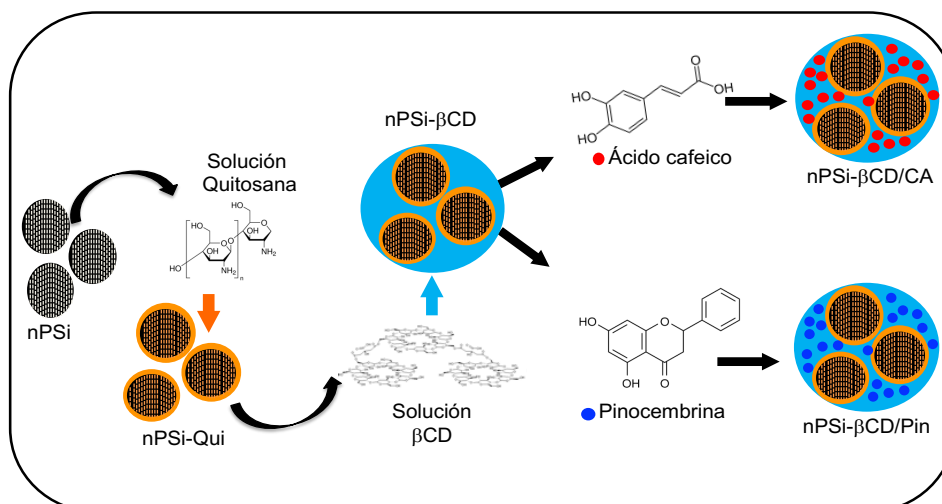


Figura 8. Esquema experimental de la síntesis de la micropartícula de compuesto nPSi-βCD.

6.3 Caracterización fisicoquímica de la micropartícula de compuesto nPSi-βCD

6.3.1 Potencial Zeta

El análisis del potencial zeta se utilizó para determinar por la movilidad electroforética de las micropartículas dentro de un campo eléctrico y con ello evaluar la carga eléctrica de éstas a través de ZetaSizer Nano-ZS (Malvern Ltd., Reino Unido). Para ello primero se enjuagó la celda con agua y las muestras se resuspendieron en agua destilada y se cargó 1 mL de cada muestra cuidando no dejar burbujas de aire.

6.3.2 Análisis químico

Los análisis químicos de las micropartículas se realizaron a través de espectroscopia infrarroja transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR), utilizando un espectrómetro FTIR (CARY 630 FTIR Agilent Technologies, USA.), en el rango entre 4000 y 600 cm^{-1} con una resolución de 1 cm^{-1} (NS = 4). Los espectros obtenidos fueron procesados matemáticamente mediante un suavizado de datos y normalización espectral.

6.3.3 Análisis morfológico, tamaño y composición elemental

La morfología y el tamaño de las micropartículas nPSi- β CD se evaluaron mediante microscopía electrónica de barrido de presión variable (VP-SEM, SU-3500 Hitachi, Japón), utilizando un voltaje de aceleración de 5 kV. La distribución del tamaño de las muestras se presentó como histogramas y el procesamiento de las imágenes de SEM se realizó utilizando el software ImageJ disponible gratuitamente. Por otro lado, el porcentaje atómico se obtuvo por análisis de espectroscopia de rayos X dispersiva (EDX) con una mira X INCA de Oxford Instruments dentro del equipo VP-SEM.

6.3.4 Análisis termogravimétrico

Los análisis termogravimétricos (TGA) se realizaron en una atmósfera de N_2 a una velocidad de calentamiento de $10^\circ\text{C}/\text{minuto}$ (DTG-60H Shimadzu, Japón).

6.4 Carga y liberación de polifenoles

6.4.1 Carga de polifenoles ácido cafeico y pinocembrina

Los polifenoles AC y Pin, se reconstituyeron con DMSO al 100% a una concentración de $200\ \mu\text{M}$ y se almacenaron a -20°C hasta el momento de realizar los ensayos in vitro. Las muestras se cargaron con AC y Pin por medio de una solución acuosa concentrada de cada polifenol ($2\ \mu\text{M}$), posteriormente se colocaron en una incubadora con agitador horizontal (NB-2005LN Biotek, Chile) a 100 RPM y temperatura ambiente. Después de la carga de polifenoles, las muestras se secaron a temperatura ambiente y se molieron por homogeneización.

Para determinar la carga máxima de polifenoles, se hidrolizaron muestras de soluciones de NaOH 0,1 M los cuales se analizaron por espectrometría UV-visible (espectrómetro Uvmini-1240 Shimadzu, Japón). AC y Pin se detectaron a 310 y 322 nm, respectivamente. Los datos de liberación de polifenoles se obtuvieron en diferentes momentos utilizando como medio de liberación una solución de PBS en agitación a 100 RPM y a 37°C . Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se usaron muestras de nPSi como controles en estos experimentos cinéticos.

6.4.2 Mecanismos de liberación del fármaco

Para determinar el mecanismo de liberación del fármaco, se ajustaron tres modelos a los perfiles de liberación: modelos de primer orden, Higuchi y Korsmeyer-Peppas. La ecuación de primer orden es (Gibaldi & Feldman, 1967):

$$\ln M_t - \ln M_0 = k_1 t \quad (1)$$

donde M_t es la cantidad acumulativa absoluta de fármaco liberado en el punto de tiempo t , M_0 es la cantidad inicial de fármaco en la solución, y k_1 es la constante cinética de liberación de primer orden. La ecuación de Higuchi es (Higuchi, 1963):

$$M_t = k_H t^{1/2} \quad (2)$$

donde M_t es la cantidad acumulativa absoluta de fármaco liberado en el punto de tiempo t , y k_H es la constante cinética de liberación de Higuchi. El modelo semiempírico Korsmeyer-Peppas está dado por (Korsmeyer *et al.*, 1983):

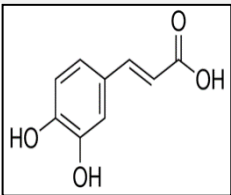
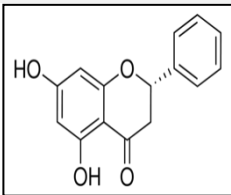
$$M_t/M_\infty = k_{KP} t^n \quad (3)$$

donde M_t/M_∞ es la liberación fraccionada del fármaco, t es el tiempo de liberación, k_{KP} es la constante cinética de liberación de Korsmeyer-Peppas y n es un exponente que caracteriza el mecanismo de liberación. La adaptación de los modelos se realizó con el software SigmaPlot 14.

6.5 Generalidades de polifenoles

Los polifenoles AC y Pin fueron obtenidos a Sigma Aldrich (Louis, MO, USA). Las características fisicoquímicas de polifenoles utilizados se presentan en la **tabla 3**.

Tabla 3. Características fisicoquímicas de los polifenoles ácido cafeico y pinocembrina.

	Ácido cafeico	Pinocembrina
<i>Formula</i>	C ₉ H ₈ O ₄	C ₁₅ H ₁₂ O ₄
<i>Peso molecular</i>	180,16 g/mol	256,25 g/mol
<i>Pureza</i>	> 98 % (HPLC)	95 % (TLC)
<i>Color</i>	Amarillo pálido a oscuro	Blanquecino a amarillo
<i>Solubilidad</i>	50 mg/mL, EtOH	20 mg/mL, CHCl ₃
<i>Estructura</i>		

6.5.1 Preparación de stock de polifenoles

Los polifenoles fueron disueltos en DMSO 100% (Thermo Scientific, USA). El esquema de preparación de soluciones stock de polifenoles se presenta en la **figura 9**.

6.5.1.1 Ácido cafeico

Se preparó un stock para AC de 500.000 µM, pesando 90 mg de AC, para luego ser disueltos en 1 mL de DMSO 100%. Posteriormente cada vez que se necesitó preparar las distintas concentraciones de los tratamiento, se realizó una dilución inicial de 1:200 con el cual se redujo el porcentaje de DMSO al 1% y la concentración de cada polifenol a 2500 µM, para finalmente obtener las concentraciones para cada polifenol mediante la fórmula matemática:

$$\text{Volumen 1} \times \text{Concentración 1} = \text{Volumen 2} \times \text{Concentración 2}$$

6.5.1.2 Pinocembrina

Para Pinocembrina se preparó un stock de 200.000 μM , pesando 25 mg de Pin, los cuales fueron disueltos con 0,487 mL de DMSO 100%. Posteriormente, cada vez que se necesitó preparar las distintas concentraciones de los tratamiento, se realizó una dilución inicial de 1:200 con el cual se redujo el porcentaje de DMSO al 1% y la concentración de cada polifenol a 1000 μM , para finalmente obtener las concentraciones para cada polifenol mediante la fórmula matemática:

$$\text{Volumen 1} \times \text{Concentración 1} = \text{Volumen 2} \times \text{Concentración 2}$$

6.6 Tratamientos experimentales

Todos los tratamientos se realizaron en triplicado técnico y biológico usando células HUVEC sub-cultivadas que estaban entre el pasaje 5 al 10. Las células HUVEC fueron expuestas a los tratamientos que se detallan en la **tabla 4**, por un máximo de 24 horas en condiciones estándares de cultivo a temperatura de 37°C y atmósfera de 5% CO_2 .

Tabla 4. Grupos experimentales de los diferentes tratamientos utilizados para ácido cafeico y pinocembrina, tanto en solución como cargados en la micropartícula de composito nPSi- β CD.

TRATAMIENTOS		
	En solución	Microencapsulados
Ácido cafeico	Control	Control
	Vehículo (DMSO)	Vehículo (Composito)
	50 μM	M + 50 μM
	150 μM	M + 150 μM
	350 μM	M + 350 μM
Pinocembrina	10 μM	M + 10 μM
	20 μM	M + 20 μM
	65 μM	M + 65 μM

6.6.1 Preparación de tratamientos

Todos los tratamientos se prepararon a partir de una solución stock de cada polifenol de 500.000 μM y 200.000 μM para AC y Pin, respectivamente. Para esto se descongelaron las alícuotas de cada stock y se preparó una dilución inicial 1:200, cuyo objetivo fue reducir el porcentaje de DMSO a concentraciones en las cuales la viabilidad de la célula no se viera afectada. Finalmente se obtuvieron las concentraciones de AC y Pin a utilizar para los distintos tratamientos experimentales como se muestra en la figura 9.

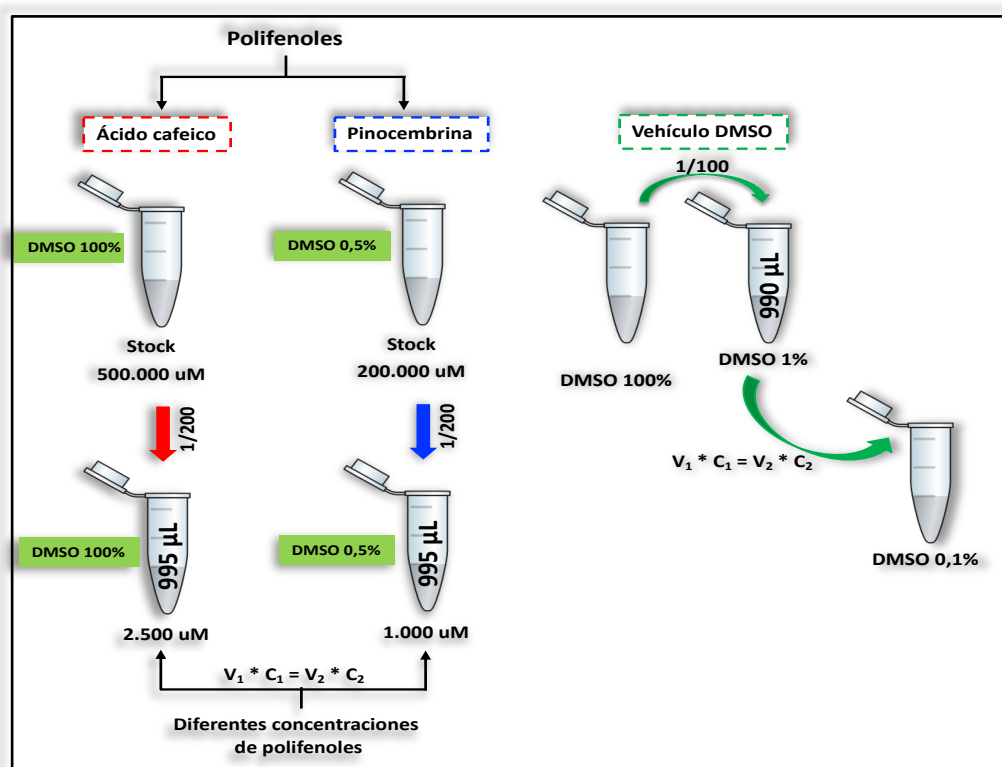


Figura 9. Representación esquemática de la preparación de soluciones stock para los polifenoles ácido cafeico y pinocembrina, así como también de las concentraciones utilizados para los diferentes tratamientos.

6.7 Ensayos de viabilidad y citotoxicidad

6.7.1 Viabilidad de HUVECs expuestas a ácido cafeico y pinocembrina

Para determinar el efecto citotóxico de AC y Pin sobre la viabilidad de HUVEC cultivadas in vitro, se utilizó el kit de proliferación celular CellTiter 96® Aqueous One Solution (MTS) (Promega, CA, USA.). El ensayo MTS se basa en la reducción de la sal de tetrazolio en formazán, un producto soluble, coloreado que se forma a partir de la actividad de enzimas deshidrogenasas en la mitocondria de células vivas en condiciones optimas de temperatura (37°C). La cantidad de formazán producido es directamente proporcional al número de células vivas en cultivo (**Figura 10**).

Los ensayos se realizaron de acuerdo a lo descrito previamente por *Goodwin et al.*, (1995); *Berridge et al.*, (1993). Brevemente, fueron sembradas 2.5×10^3 células/pocillo, en un volumen final de 100 µL para placas de cultivo de 96 pocillos. La placa se dejó incubar en condiciones estándares de cultivo por un periodo de 18-24 horas para permitir la adherencia de las células. Al día siguiente, se prepararon concentraciones entre 2-2000 µM para cada polifenol siguiendo el procedimiento antes descrito en el punto 6.7.1. Posterior a las 24 horas de tratamiento se descartó el medio con tratamiento y se agregó a cada pocillo 100 µL de medio de cultivo fresco y 20 µL del reactivo MTS. Seguidamente, se dejó incubar a 37°C por 4 horas en ambiente humidificado y atmósfera de 5% CO₂ protegido de la luz, para posteriormente realizar la lecturas de absorbancias a una longitud de onda de 490 nm usando un lector de microplaca (NanoQuant, Infinite® M200PRO – Tecan). Como control se utilizaron células sin tratamiento y células tratadas con DMSO 0,1% (vehículo). La absorbancia de fondo fue corregida incluyendo un blanco reactivo (medio de cultivo + reactivo MTS). Se restó la absorbancia de los pocillos menos la del blanco para obtener las absorbancias corregidas. El porcentaje de viabilidad celular fue calculado usando la densidad óptica de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Viabilidad celular (\%)} = ((\text{D.O. tratamientos}) / (\text{D.O. control})) \times 100$$

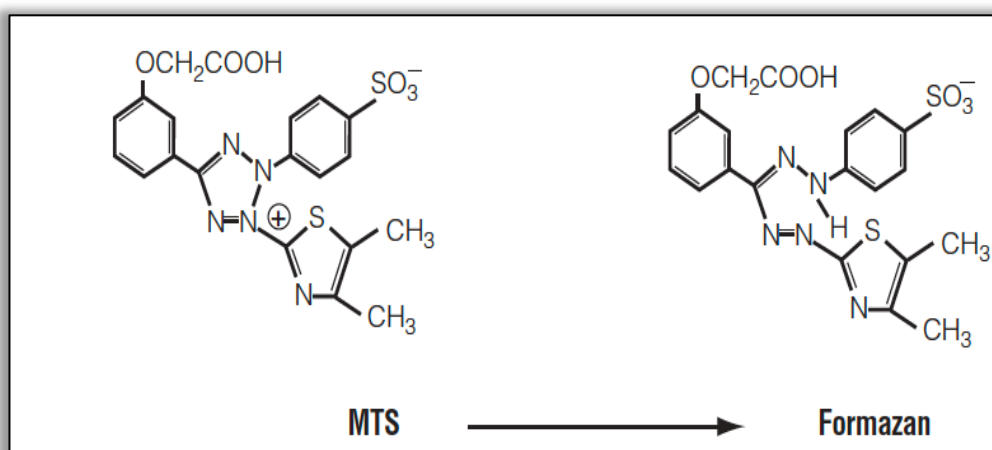


Figura 10. Esquema de la reacción química de conversión de la sal de tetrazolium en formazán. El MTS es metabolizado por las células, a nivel mitocondrial, produciendo formazan. Extraído de boletín técnico, Promega.

6.7.2 Concentración efectiva

La concentración efectiva es utilizada para evaluar la eficacia, potencia o la concentración de un fármaco (polifenoles) con la cual se observa una respuesta o efecto deseado, es decir en este caso, porcentaje de viabilidad celular.

Para esto se realizó un screening el cual incluyó un rango amplio de concentraciones desde 2 hasta 2000 μM para cada polifenol. Posteriormente se realizó el ensayo MTS, como se describe en el punto 6.8.1, para obtener una ecuación general para una curva dosis-respuesta. En este tipo de curvas, se muestra la respuesta en función del logaritmo de concentración, donde X es el logaritmo de la concentración e Y es la respuesta. Finalmente, a partir de un modelo matemático de regresión no lineal se obtienen los datos.

6.7.3 Citotoxicidad de la micropartícula de compuesto nPSi- β CD

Para determinar el efecto de la micropartícula de compuesto (nPSi- β CD) sobre la viabilidad celular de HUVEC, se utilizó el ensayo de viabilidad celular CellTiter-Fluor™ (Promega, USA.). Este ensayo mide la actividad de una proteasa constitutiva y conservada dentro de células vivas, usando un sustrato peptídico fluorogénico (glicil-

fenilalanil-aminofluorocoumarina; GF-AFC). El sustrato ingresa a las células intactas donde es escindido por la actividad de la proteasa generando una señal fluorescente proporcional al número de células vivas (**Figura 11**).

El ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se expusieron 1×10^5 células a diferentes concentraciones de composito por un periodo de 8 horas. Una vez pasadas las horas de tratamiento, se agregó un volumen de 100 μL /pocillo de reactivo CellTiter-Fluor™, se mezcló durante unos segundos con agitación orbital para posteriormente incubar durante 30 minutos a 37°C . Finalmente se obtuvieron fotografías usando un microscopio láser confocal (CLSM, FV1000 Olympus, Japón) con longitudes de onda de excitación y emisión de 390 nm y 505 nm, respectivamente. El análisis de intensidad de fluorescencia se realizó con el software Olympus Fluoview (FV1000 v2.0).

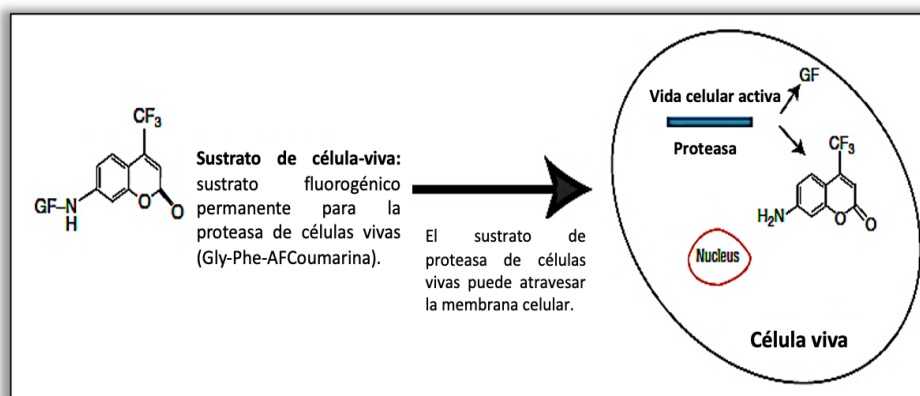


Figura 11. Esquema de la reacción química para la detección de células vivas mediante la utilización del sustrato fluorescente glicil-fenilalanil-aminofluorocoumarina. Extraído de boletín técnico, Promega.

6.8 Inducción de estrés oxidativo con H_2O_2

6.8.1 Citotoxicidad de H_2O_2

La concentración de H_2O_2 que se utilizó para estimular la producción de estrés oxidativo en células HUVEC fue determinada a través de un ensayo de viabilidad con MTS Promega (CA, USA). Se basa en la reducción de la sal de tetrazolio en formazán,

un producto soluble, coloreado que se forma a partir de la actividad de enzimas deshidrogenasas en la mitocondria de células vivas en condiciones optimas de temperatura (37°C). La cantidad de formazán producido es directamente proporcional al número de células vivas en cultivo (**Figura 10**).

Los ensayos se realizaron de acuerdo a lo descrito previamente por Goodwin *et al.*, (1995); Berridge *et al.*, (1996) . Brevemente, fueron sembradas 2.5×10^3 células/pocillo, en un volumen final de 100 μL para placas de cultivo de 96 pocillos. La placa se dejó incubar en condiciones estándares de cultivo por un periodo de 18-24 horas para permitir la adherencia de las células. Al día siguiente, se prepararon concentraciones entre 50 – 0,2 mM de H_2O_2 . Posterior a las 12 horas de tratamiento se descartó el medio con tratamiento y se agregó a cada pocillo 100 μL de medio de cultivo fresco y 20 μL del reactivo MTS. Seguidamente, se dejó incubar a 37°C por 4 horas en ambiente humidificado y atmósfera de 5% CO_2 protegido de la luz, para posteriormente realizar la lecturas de absorbancias a una longitud de onda de 490 nm usando un lector de microplaca (NanoQuant, Infinite® M200PRO – Tecan). Como control se utilizaron células sin tratamiento y células tratadas con DMSO 0,1% (vehículo). La absorbancia de fondo fue corregida incluyendo un blanco reactivo (medio de cultivo + reactivo MTS). Se restó la absorbancia de los pocillos menos la del blanco para obtener las absorbancias corregidas. El porcentaje de viabilidad celular fue calculado usando la densidad óptica de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Viabilidad celular (\%)} = ((\text{D.O.tratamientos})/(\text{D.O.control})) \times 100$$

6.8.2 Inducción estrés oxidativo

Para evaluar la cantidad de estrés oxidativo generado por el tratamiento con diferentes concentraciones de H_2O_2 , se utilizó la sonda CM-H2DCFDA, la cual es un indicador general de estrés oxidativo. Primero se reconstituyó la sonda a 2000 μM en DMSO 100% y luego se estandarizó la cantidad a usar, para esto se probaron concentraciones de sonda entre 3 y 0,125 μM . Brevemente, se sembraron 2×10^5 células/pocillo, en un volumen final de 500 μL para placas de cultivo de 24 pocillos. La placa se mantuvo en cultivo por un periodo de 18-24 horas, posteriormente se agregó a cada pocillo 300 μL de PBS con la sonda CM-H2DCFDA y se dejó incubar en oscuridad durante 40 minutos a 37°C. Luego se descartó el PBS y las células fueron tratadas con

diferentes concentraciones de H_2O_2 . Transcurrido el tiempo de tratamiento, se eliminó el medio con tratamiento y se lavó una vez con PBS. Se agregaron 250 μL de tripsina a cada pocillo para despegar las células. La tripsina fue inactivada con 500 μL de SFB para después coleccionar las células en tubos para citómetro. Los tubos se centrifugaron a 800 rpm por 8 minutos, se descartó el sobrenadante por inversión de tubo y se adicionaron 300 μL de PBS frío para lavar las células. Se realizó nuevamente una centrifugación y finalmente se resuspendió el pellet con 150 μL de PBS frío. Los tubos se llevaron al citómetro para ser leído a 492-95 nm/517-57 nm de excitación y emisión, respectivamente.

6.9 Evaluación de la actividad antiangiogénica de ácido cafeico y pinocembrina

6.9.1 Ensayo en membrana acantocoriónica de pollo

El ensayo en membrana acantocoriónica de pollo (CAM) es un modelo que ha sido utilizado para el estudio *in vivo* de la angiogénesis. De acuerdo a lo anterior, se realizó este ensayo utilizando diversos grupos experimentales, los que se presentan en la **tabla 5**.

Para el ensayo en CAM de pollo, los huevos fueron comprados en el Instituto de Salud Pública de Chile y la fertilización se realizó como fue descrito por Sinning *et al.*, (2012). Brevemente, los huevos fertilizados de gallinas White Legorn (*Gallus gallus*) fueron mantenidos en una incubadora a 38,2°C en una atmósfera humidificada. Se marcó el polo (ápice) del embrión y fue incubado a 37°C durante otras 72 horas. Luego se perforó en la cascara del huevo un pequeño orificio (1 mm) en el polo previamente marcado para extraer ~2 mL de albúmina y así evitar la adherencia de el embrión a la corteza superior. Posteriormente, en la etapa 20 del desarrollo embrionario se creó una gran apertura (2 × 1 cm) en el polo embrionario el cual fue sellado con papel plástico (Saran-wrap). Una semana después, la cubierta de plástico fue retirada y sobre la membrana corioalantoidea en crecimiento y contacto directo con la región vascularizada, se colocó un filtro de metilcelulosa estéril de 5 mm de diámetro embebido con 10 μL de cada tratamiento.

Después de 3 días, CAMs fueron retirados de los huevos, fijados en 4% de p-formaldehído, luego deshidratado, embebido en parafina y teñido con hematoxilina-

eosina. Los vasos sanguíneos en las muestras histológicas de cada grupo se contaron utilizando un Microscopio Óptico (Motic BA310) con aumento de 400x. El conteo se realizó en 25 campos microscópicos en forma ciega por dos examinadores. Los resultados se expresaron como N° de vasos sanguíneos/por campo. Se tomaron microfotografías representativas de cada grupo.

Tabla 5. Grupos experimentales que se incluyeron para el ensayo en membrana acantocoriónica de pollo.

Grupo experimental	Tratamientos
Control	Fetos en condiciones normales con DMSO
1	AC 50 μ M
2	AC 150 μ M
3	AC 350 μ M
4	Pin 10 μ M
5	Pin 20 μ M
6	Pin 65 μ M

6.9.2 Formación de estructuras tubulares en matrigel

La capacidad de HUVECs para formar estructuras parecidas a los vasos sanguíneos, fue evaluada mediante un ensayo utilizando matrigel alto en factores de crecimiento (Corning, New York, NY, USA) en presencia de H₂O₂, a una concentración previamente estandarizada, y distintas concentraciones de polifenoles AC y Pin tanto en solución como microencapsulados.

Este ensayo fue realizado de acuerdo a un protocolo previamente descrito por Arnaoutova *et al.*, (2010), con algunas modificaciones. Brevemente, un día antes de iniciar al ensayo se sub-cultivaron las células de forma normal y luego se sembraron 5x10⁵ células en un frasco T-75. Paralelamente se descongeló el matrigel desde -20°C a 4°C. Al día siguiente se cargaron 50 μ L de matrigel por pocillo evitando la formación de burbujas y manteniendo la placa en hielo. Luego se dejó la placa de 96 pocillos a 37°C por 30 minutos para que gelificara el matrigel. Mientras tanto, se tripsinizó la botella T-75 que se dejó del día anterior, para luego centrifugar, cuantificar el número de células y evaluar viabilidad. Posteriormente, se resuspendió el pellet de células a una concentración de 1,5x10⁵ células/mL y se cargó 1 mL de la suspensión en tubos cónicos

de 15 mL (1 para cada condición). Seguido a esto, se realizó una centrifugación a 1000 RPM por 5 minutos y se descartó sobrenadante. Por último, se agregó 1 mL de medio de cultivo con tratamiento para cada condición y se resuspendieron las células cuidadosamente, pipeteando 100 μ L de la suspensión (15.000 células) por pocillo. La placa se incubó durante 4 horas con H_2O_2 a una concentración de 0,39 mM previo al tratamiento con los polifenoles el cual se mantuvo por un periodo de 8 horas.

Se obtuvieron fotografías utilizando un microscopio invertido (Olympus). El procesamiento de las imágenes fue realizado con el software *Image Processing and Analysis in Java* (ImageJ 1.52a, macros Angiogenesis Analyzer).

6.10 Determinación de la actividad antioxidante de polifenoles

La capacidad antioxidante de los polifenoles AC y Pin tanto en solución como microencapsulados, se determinó mediante el método de radical ABTS, el cual se basa en la capacidad del antioxidante para reducir y estabilizar el radical catiónico coloreado 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina)-6-ácido sulfónico ($ABTS^{\bullet+}$). Cuando el radical se reduce se observa una decoloración de la solución verde-azul. Así, mientras mayor sea la capacidad de reducción del radical libre, mayor será la decoloración de la solución que lo contiene, lo cual se traduce en una disminución de la absorbancia a 734 nm.

6.10.1 Preparación y reacción química del reactivo radical ABTS

El método más actual considera la formación del catión radical ABTS a partir de una reacción entre el cromóforo ABTS verde-azul y persulfato de potasio. Por lo tanto, la preparación de la solución madre del radical ABTS se realizó mezclando 0,0166 g de $K_2S_2O_8$ (2,45 mM) y 0,096 g de ABTS (7 mM) en 25 mL de agua destilada. La solución stock se dejó reposar durante toda la noche en oscuridad. Para diluir el reactivo radical ABTS stock, se preparó buffer acetato de sodio/ácido acético 20 mM mezclando 186 μ L CH_3COOH glacial y 0,24 g $CH_3COONa \cdot 3H_2O$. El buffer se ajustó a pH 4,5 y se aforó a 250 mL con agua destilada. La solución de trabajo del reactivo ABTS se diluyó hasta obtener una absorbancia de $0,700 \pm 0,010$ a una longitud de onda de 734 nm.

La reacción de decoloración del radical ABTS se realizó siguiendo el siguiente esquema de pipeteo: 50 μ L de polifenol + 1450 μ L reactivo radical ABTS. La reacción se dejó incubar en oscuridad durante 30 minutos. Se cronometró un minuto entre cada reacción realizada para no variar el tiempo de reacción con el radical entre cada

medición. La lectura de absorbancia fue realizada a 734 nm utilizando un espectrofotómetro. Como blanco se utilizó el buffer acetato y se registró la absorbancia del radical ABTS ($0,700 \pm 0,010$). Para determinar el %Inhibición se utilizó la siguiente ecuación:

$$\%I = (\text{Abs ABTS} - \text{Abs muestra}) / (\text{Abs ABTS}) \times 100$$

Las mediciones se realizaron según la metodología propuesta por Re *et al.*, (1999) con algunas modificaciones. Los resultados fueron expresados como equivalentes de Trolox.

6.11 Evaluación de la expresión génica de Nrf2, Keap1, Akt, Cat, Glut-P, Hmox1, Gclc y Gclm

Se evaluó la expresión de genes relacionados a la respuesta antioxidante y angiogénesis en células que fueron sometidas a estrés oxidativo (H_2O_2) y luego tratadas con diferentes concentraciones de dos polifenoles AC y Pin, tanto en solución como microencapsulados. Los genes evaluados fueron los siguientes: Nrf2: Factor nuclear eritroide humano tipo 2, Keap1: Proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch, Akt: Proteína quinasa de serina-treonina, Cat: Catalasa, Glut-P: Glutación Peroxidasa, Hmox1: Hemo oxigenasa-1, Gclc: Glutamato-cisteína ligasa subunidad catalítica y Gclm: Glutamato-cisteína ligasa subunidad modificadora. Como genes normalizadores (*housekeeping*) se evaluaron los genes ribosomales: Rps13, Rps29, Rpl27, Rpl30 y GADPH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

6.11.1 Extracción de ARN total

La extracción de ARN total se realizó a partir de células HUVEC tratadas. Para esto se sembraron $1,5 \times 10^5$ células/placa p-60 por cada tratamiento. Las células fueron mantenidas en cultivo durante 18 a 24 horas para posteriormente ser estimuladas durante 4 horas con 0,4 mM de H_2O_2 y luego tratadas durante las siguientes 24 horas con diferentes concentraciones de los polifenoles en solución y microencapsulados. Al término del tratamiento se retiró el medio de cultivo y posteriormente el ARN fue aislado utilizando el reactivo Trizol Ambion (Invitrogen, USA) siguiendo las instrucciones del

fabricante. Brevemente, las células fueron lisadas con 1000 μL de reactivo Trizol y 10 μL de 2-mercaptoetanol (Biorad, USA), la mezcla fue homogeneizada utilizando una jeringa y vortex, para luego ser incubada por 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se adicionó 200 μL de cloroformo agitando vigorosamente la mezcla por 15 segundos y incubando por 15 minutos en hielo. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 12000 g durante 15 minutos a 4°C. La fase acuosa e incolora superior que contiene el ARN fue transferida a un tubo de microcentrífuga estéril, al cual se agregó 500 μL de isopropanol puro, luego se mezcló e incubó a -20°C toda la noche para dejar precipitar el ARN. Transcurrido el tiempo de precipitación las muestras se centrifugaron nuevamente a 12000 g durante 15 minutos a 4°C. El pellet obtenido fue lavado con 1000 μL de etanol 75% y centrifugado a 7500 x g por 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el pellet durante 15 minutos. Finalmente, el ARN fue resuspendido en 30 μL de agua libre de nucleasas y almacenado a -80°C hasta su utilización.

6.11.2 Evaluación de integridad, concentración y pureza del ARN

La integridad de las muestras de ARN extraído fueron evaluadas a través de una electroforesis en gel de agarosa al 1,2%. Para la preparación del gel se utilizó buffer TBE 1X y agua con DEPC estéril. Las condiciones de la corrida electroforética fueron 40 minutos a 70 volt y 300 mA. El ARN fue visualizado en transiluminador UV (G:Box chemi XQR, Syngene, USA), para lo cual se utilizó gel red el cual fue agregado en el buffer de carga.

La concentración y pureza del ARN extraído fue determinada mediante espectrofotometría UV (Sambrook *et al.*, 2001), utilizando un espectrofotómetro Nanoquant (Infinite® M200PRO – Tecan). El ARN absorbe luz a 260 nm, debido a esta propiedad se puede relacionar de manera directa la cantidad de luz absorbancia con la concentración, pudiendo así, estimar la concentración de ARN ($\mu\text{g/ml}$) en cada muestra. Por otra parte, se utilizó relación A260/280 para determinar la pureza del ARN. Cuando la relación A260/A280 está en un rango de 1.8 y 2.0, se considera una buena pureza, mientras que, valores > 2.0 indica la presencia de ADN y < 1.7 significa que hay presencia de proteínas y fenol. Las lecturas de absorbancia se realizaron por duplicado cargando 2 μL de cada muestra de ARN extraído.

6.11.3 Eliminación del ADN genómico y síntesis de ADN complementario

Previo a la síntesis del ADN complementario, el ARN extraído fue sometido a un tratamiento con desoxirribonucleasa I (DNasa I) (kit Turbo DNA-free, Invitrogen, USA) para la eliminación del ADN genómico. El tratamiento se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, a 1 µg de ARN se le agregó 1 µL de enzima Dnasa (1U/ µL), 3 µL de buffer de la enzima 10X para un volumen final de 30 µL. Posteriormente, se mezcló pipeteando suavemente y se incubó a 37°C durante 30 minutos. La reacción fue detenida añadiendo 3 µL del reactivo de inactivación de la Dnasa, para luego incubar la reacción durante 5 minutos a temperatura ambiente (22-26°C), homogeneizando la reacción 2 a 3 veces. Las muestras se centrifugaron a 10.000 g durante 1,5 minutos. Finalmente el sobrenadante que contiene el ARN se transfirió a un tubo de microcentrífuga estéril para ser cuantificado nuevamente.

La síntesis de ADN complementario (ADNc) se realizó mediante una reacción de transcripción reversa (RT-PCR), utilizando el kit iScript Reserve Transcription Supermix (BIO-RAD, USA). Cada reacción fue realizada en un volumen final de 20 µL, para esto se agregó 4 µL del reactivo iScript Supermix, 1 µg ARN tratado con Dnasa I y volumen de agua variable. El protocolo de PCR correspondió a: una etapa de cebado por 5 minutos a 25°C, reacción de RT por 20 minutos a 46°C y finalmente la inactivación de la RT por 1 minuto a 95°C. El ADNc sintetizado fue almacenado a -20°C hasta su utilización.

6.12 Análisis de la expresión génica mediante PCR en tiempo real

6.12.1 Diseño y eficiencia de partidores

Para el diseño de los partidores se utilizó la plataforma del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) y para la revisión de posibles formación de dímeros se utilizó el programa AmplifX (Nicolás Jullien 2004-2013, v1.7.0). Los partidores se diseñaron con una temperatura annealing de 60°C. La **tabla 6** presenta las secuencia de partidores utilizados para evaluación de la expresión de genes asociados a la vía antioxidante y angiogénesis.

Tabla 6. Secuencia de partidores utilizados para evaluación de la expresión de genes asociados a la vía antioxidante y angiogénesis.

Gen	Secuencia Forward (5'-3')	Secuencia Reverse (3'-5')
NRF2	TGA CTG AAA CGT AGC CGA AGA	TAC TCC CAG GTT GCC CAC AT
KEAP1	GGG TCA AGT ACG ACT GCG AA	AGC TGC ATC TGC AGG AAG TT
AKT	CAG GAT GTG GAC CAA CGT GA	AAG GTG CGT TGC ATG ACA GT
CAT	ATG CAA ATG GGG AGG CAG TT	TTC CTG TGG CAA TGG CGT TA
GLUT-P	GCG GGG CAA GGT ACT ACT TA	CGT TCT TGG CGT TCT CCT GAT
HMOX1	CTT TTG GAG GTT TGA GAC AG	CAA TGG CCT AAA CTT CAG AG
GCLC	TGG AGC AAC CTA CTG TCT AA	CAG GTC CCA GGT AGT CTT TA
GCLM	TCC CAG TAA GGC TGT AAA TGC T	TTG GAG TTG CAC AGC TGG AT
RPS13	AGT AAG GCC CTT CTT GGC CAG TT	TCC CAG TCG GCT TTA CCC TAT CG
RPS29	CAT AGG CAG TGC CAA GGA AGA	CAG TGT TTC CGT CAG TAC GC
RPL27	GGT CAA TTC CAG CCA CCA GAG CAT	TCC GGA CGC AAA GCT GTC ATC
RPL30	TCT GCT TGT ACC CCA GGA CGT ACT	ATG GTG GCC GCA AAG AAG ACG A
GAPDH	TGA ACG GAT TTG GCC GCA TT	GTT CAC GCC CAT CAC AAA CA

Para determinar la eficiencia de la reacción de amplificación para cada par de partidores, se utilizó una curva estándar de cDNA, la cual fue obtenida mediante diluciones seriadas (1:10) como se muestra en la **figura 12**. Posteriormente, cada dilución de cDNA se utilizó como templado para la qPCR. Los datos obtenidos de CT (Cycle Threshold) y concentración de cDNA fueron graficados para obtener la curva estándar de partidor en estudio. Finalmente, la eficiencia de la reacción fue calculada con la siguiente formula:

$$E = 10^{\left(-\frac{1}{slope}\right)}$$

donde S corresponde al valor de la pendiente de la curva estándar. Además, se evaluó la especificidad de la amplificación para cada uno de los fragmentos de los genes investigados, mediante el análisis de las curvas de disociación o de melting.

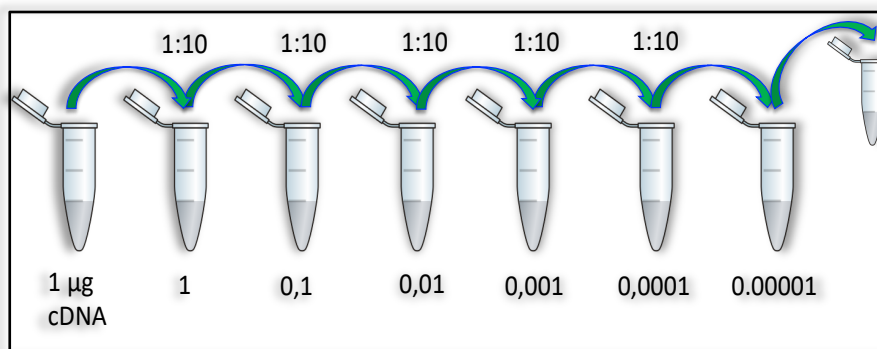


Figura 12. Representación esquemática del protocolo de diluciones de cDNA preparadas de para la obtención de la curva de eficiencia de partidores.

6.12.2 Selección de genes normalizadores

En total fueron testados 5 genes para ser utilizados como normalizadores de la expresión génica, correspondientes a GADPH y los ribosomales RPS13, RPL 27, RPS 29 y RPL30. La selección del mejor normalizador se realizó mediante el programa RefFinder (<https://heartcure.com.au>), herramienta desarrollada para la evaluación y screening de genes de referencia. Esta herramienta agrupa los siguientes programas: geNorm, Normfinder, BestKeeper y el método comparativo de Delta-Ct. El programa compara los genes candidatos y arroja una tabla con el ranking del mejor al peor gen normalizador.

6.12.3 PCR en tiempo real

La expresión génica de Nrf2, Keap1, Akt, Cat, Glut-P, Hmox1, Gclc y Gclm fue evaluada mediante PCR en tiempo real (qPCR) utilizando el equipo Step One (Applied Biosystems, USA.). La reacción de qPCR para todas las muestras se preparó con 4 µL de EvaGreen plus (ROX) qPCR Master Mix (2X, Biotium, Lituania), 1 µL de cada partidador (forward y reserve) en una concentración de 200 nM, 1 µL de cDNA en una dilución 1:10 y agua libre de nucleasa hasta completar un volumen final de 20 µL. El protocolo de amplificación por qPCR constó de una activación inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos que comprenden denaturación a 95°C por 15 segundos, hibridación a 60°C por 20 segundos y extensión a 72°C por 20 segundos. La cuantificación relativa de la expresión génica se analizó utilizando el método para la obtención del valor de ciclo umbral (*Threshold Cycle*, CT) y posterior comparación de Ct entre la cantidad de

transcrito del gen de las muestras y el gen normalizador a través del método $2^{\Delta\Delta Ct}$. Fueron incluidos controles negativos en todas las series de reacciones de qPCR.

6.13 Evaluación de la expresión proteica de Nrf2, Keap1 Akt y Erk 1/2 total y fosforilada a través de Western Blot

La evaluación de la expresión proteica se realizó a través de Western Blot (WB), a partir de células que fueron sometidas a estrés oxidativo (H_2O_2) y luego tratadas con diferentes concentraciones de polifenoles AC y Pin, tanto en solución como microencapsulados. Se evaluaron proteínas relacionadas a la vía de señalización antioxidante: Factor nuclear eritroide humano tipo 2 (Nrf2) y Proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch (Keap1). También proteínas involucradas en la vía de señalización de angiogénesis como: Erk 1/2 y Akt tanto la fracción total como fosforilada. Como proteína normalizadora se utilizó beta-actina.

6.13.1 Extracción de proteínas totales

Para la extracción de proteínas, se sembraron 7×10^5 células/T-75 por cada tratamiento. Las células fueron mantenidas en cultivo durante un periodo de 18-24 horas, para luego ser estimuladas durante 4 horas con 0,39 mM de H_2O_2 y finalmente fueron tratadas con diferentes concentraciones de los polifenoles en solución y microencapsulados durante las siguientes 24 horas. Una vez terminado el tratamiento las células fueron lavadas 3 veces con DPBS 1X frío. Finalmente, las proteínas fueron extraídas utilizando 200 μ L buffer RIPA junto a un coctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas 1X (Aprotinina, Bestatina, E-64, Leupeptina, NaF, β -glicerofosfato, entre otras) (Thermo Scientific, USA).

La cuantificación se realizó por el método BSA (ácido bicinconínico) utilizando el kit BCA Protein Assay kit (Pierce, USA) y una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se tomaron 5 μ L de muestra y 100 μ L de reactivo, luego se mezcló y dejó reaccionar a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente se realizó la lectura la absorbancia a 562 nm usando un lector de microplaca (NanoQuant, Infinite® M200PRO – Tecan). La curva estándar se realizó por triplicado técnico y se incluyeron las siguientes concentraciones 0, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 μ g/mL. Para la obtención de la pendiente y el r^2 se graficaron los datos de concentración μ g/mL versus absorbancia.

6.13.2 Electroforesis proteínas SDS-PAGE

6.13.2.1 Preparación de muestras y corrida electroforética

La preparación de las muestras se realizó de la siguiente manera: para 50 µg de proteína se agregó 6,25 µL de NuPAGE LDS Sample Buffer (4X), 2,5 µL de agente reductor NuPAGE (10X) y una cantidad variable de RIPA hasta completar los 25 µL de volumen final. Luego las muestras fueron denaturadas calentando la mezcla a 70°C por 10 minutos.

Para la corrida electroforética se prepararon 800 mL de buffer de corrida 1X (NuPAGE MOPS SDS Running Buffer 20X + agua desionizada). A continuación se apartaron 200 mL del buffer, a los cuales se les agregó 500 µL de antioxidante NuPAGE para luego homogeneizar bien. Antes del montaje del gel, se debió enjuagar con agua destilada, remover cuidadosamente la cinta blanca inferior y la peineta. Posteriormente, se colocó el gel dentro de la cámara de electroforesis y se llenó el compartimiento interno y externo de la cámara con el buffer de corrida 1X + antioxidante. Los pocillos del gel (NuPAGE Bis-Tris Mini Gel 4-12%, 10 well 1.5 mm) se cebaron con buffer y se cargaron las muestras que fueron previamente denaturadas. La electroforesis se realizó aumentando el voltaje en 25 volt. cada 20 minutos hasta llevar a los 200 Volt.

6.13.3 Transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa

Para la transferencia se preparó buffer de transferencia NuPAGE (2X) con y sin metanol. Para este se mezclaron 10 mL de buffer de transferencia NuPAGE (20X), 0,1 mL de antioxidante NuPAGE, 10 mL de metanol (cuando corresponda) y se completó con H₂O desionizada hasta un volumen final de 100 mL.

A continuación se desmontó el gel de la cámara, se lavó con agua destilada y dejó en buffer de transferencia sin metanol por 10 minutos en agitación. Paralelamente se dejó humedecer la membrana de PVDF (Thermo Scientific, USA) en metanol por 30 segundos, luego se lavó con agua destilada y se sumergió en buffer de transferencia por 5 minutos. Se remojaron en buffer de transferencia papeles Whatman gruesos, los cuales se colocaron en el sistema de transferencia semi-seco para formar el sándwich (papel Whatman, membrana, gel y papel Whatman) evitando la formación de burbujas. La transferencia se realizó durante 1 hora a 20 volt.

6.13.4 Hibridación y revelado

Una vez terminada la transferencia de proteínas, la membrana fue sacada del sistema de transferencia y marcada en un extremo la cara en donde se encuentran las proteínas. Luego se colocó la membrana en la solución de bloqueo de leche descremada (5%) preparada en TBS-T 1X y se incubó 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Posteriormente se prepararon los anticuerpos primarios (Cell Signaling Technology, Beverly MA, USA) en 5% de leche descremada y TBS-T 1X y se incubaron toda la noche a 4°C en agitación. La **tabla 7** presenta los anticuerpos y diluciones utilizadas para la metodología de Western Blot.

Tabla 7. Anticuerpos utilizados y diluciones recomendadas con el fabricante para utilizar en Western Blot.

<i>Anticuerpo</i>	<i>Dilución</i>
<i>AKT #4691s</i>	1:1000
<i>pAKT Ser 473 #4060s</i>	1:2000
<i>ERK 1/2 #4695s</i>	1:1000
<i>pERK 1/2 #4370s</i>	1:2000
<i>NRF2 #12721</i>	1:1000
<i>KEAP-1 #8047</i>	1:1000
<i>β-actina #4970</i>	1:5000

Al término de la incubación con el anticuerpo primario, se procedió a lavar la membrana 3 veces por 10 minutos c/u con TBS-T 1X, para luego continuar con la incubación con el anticuerpo secundario anti-rabbit IgG (Cell Signaling Technology, Beverly MA, USA) con 5% leche descremada en TBS-T 1X (1:10000) durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Nuevamente se realizaron 3 lavados a la membrana por 10 minutos c/u con TBS-T 1X.

Finalmente, el revelado se realizó a través de quimioluminiscencia utilizando una solución de detección Supersignal West pico o Femto (Thermo Scientific, USA) en proporción 1:1, para luego incubar la membrana en oscuridad durante 5 minutos. Las intensidades de las bandas serán cuantificadas utilizando ImageJ 1,52a software (NIH, USA.).

6.14 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron expresados como media y desviación estándar y analizados utilizando el software GraphPad Prism v9.0.0 (San Diego, CA, USA). La detección de outlier se realizó mediante la prueba de ROUT o Grubbs`. La distribución de los datos fue evaluada mediante el test de normalidad de Anderson-Darlin, Shapiro-Wilk, D'Agostino & Pearson o Kolmogorov-Smirnov Normality Test. La comparación entre grupos se realizó a través t-test o ANOVA con un post-test Tukey. Si no fue posible cumplir con el supuesto estadístico de normalidad y homogeneidad de varianza, se realizaron pruebas no paramétricas Mann-Whitne o Kruskal-Wallis con un post-test Dunn`s. Para los análisis se consideró un nivel de significancia estadísticas de $p < 0,05$ y un $n=3$.

7. RESULTADOS

7.1 Caracterización fisicoquímica de la micropartícula de compuesto nPSi-βCD

7.1.1 Potencial Zeta

La síntesis de las micropartículas de compuesto nPSi-βCD, se realizó por atracción electrostática de cargas opuestas. Para evaluar el proceso de síntesis se realizó el análisis del potencial zeta (**Figura 13A**). Esta técnica proporciona una red eléctrica con la cual las micropartículas generadas adquieren una carga eléctrica neta según los grupos funcionales que ésta posea. En el caso de nPSi oxidado químicamente con H₂O₂, el valor potencial zeta fue negativo (-29.06 ± 0.06 mV), mientras que cuando se realizó la incorporación de la Qui, nPSi-Qui mostró valores positivos (16.5 ± 0.6 mV). Por otro lado, se observó un potencial zeta marcadamente negativo para nPSi-βCD (-39.8 ± 1.73 mV) esto concuerda con la presencia de la molécula βCD cuyo valor fue -28.2 ± 9 mV.

7.1.2 Análisis químico

Se realizó un análisis ATR-FTIR para determinar los cambios químicos de micropartículas de nPSi durante los procesos de síntesis (**Figura 13B**). El espectro de nPSi mostró un pico agudo de transmitancia a 1050 cm^{-1} con un hombro a 1170 cm^{-1} , que corresponden al modo de estiramiento Si-O-Si. Además, fueron detectadas bandas débiles a 880 y 795 cm^{-1} relacionadas con -OySi-Hx y SiOH, respectivamente, y la banda de estiramiento O-H de SiOH y H₂O adsorbido a 3350 cm^{-1} . Adicionalmente, se observó una banda de absorción de agua molecular (H₂O) a 1630 cm^{-1} . Estos grupos funcionales detectados están de acuerdo con la oxidación química de nPSi a través de H₂O₂. Por otro lado, el espectro de nPSi-Qui presentó los mismos grupos funcionales que nPSi más dos bandas débiles de N-H y amida III detectadas en 1408 y $1320\text{-}1346\text{ cm}^{-1}$, respectivamente (**Figura 13C**). Esas bandas están relacionadas con las cadenas de poliamino-sacárido presentes en la quitosana, la cual fue usada como puente entre el polímero de y las micropartículas nPSi. En cuanto al espectro de nPSi-βCD, se observaron bandas que corresponden al espectro de βCD nativa como lo son: estiramiento del enlace C-OH (1021 cm^{-1}), C-O-C (1150 cm^{-1}), H₂O (1630 cm^{-1}), estiramiento asimétrico de CH₂ (2930 cm^{-1}) y finalmente estiramiento de O-H de grupos hidroxilo (3300 cm^{-1}). En el espectro de nPSi-βCD sólo mostró una banda extra que βCD a 1721 cm^{-1} que corresponden a grupos C=O generados durante la polimerización lograda entre βCD y ácido cítrico.

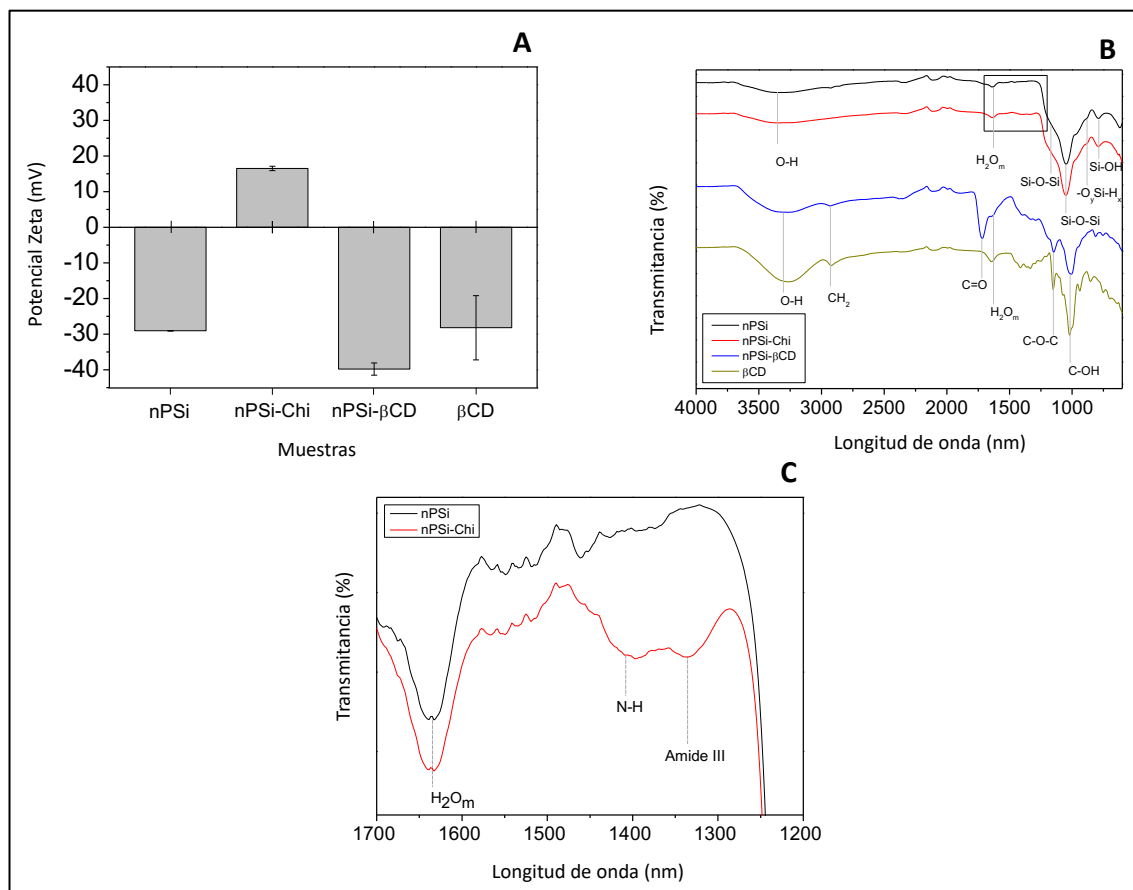


Figura 13. Monitoreo del proceso de síntesis de micropartículas de compuesto nPSi-βCD. (A) Potencial Zeta y (B) Análisis de espectroscopia infrarroja transformada de Fourier-reflectancia total atenuada (ATR-FTIR), (C) Zoom de los espectros ATR-FTIR.

7.1.3 Análisis morfológico, tamaño y composición elemental

Se obtuvieron imágenes de SEM (**Figura 14A**) para analizar el tamaño y la morfología de las micropartículas en las diferentes etapas de síntesis. Primero, se analizaron las imágenes para generar una representación grafica de la distribución de tamaño de las micropartículas como se observa en la **figura 15**. nPSi y nPSi-Chi presentaron formas irregulares con un tamaño promedio de 2-2.5 μm (**Figura 15A1-A2**), ambos tipos de micropartículas mostraron una superficie más rugosa debido a la presencia de poros columnares de ~ 50 nm de ancho. El análisis gravimétrico mostró que las micropartículas presentaron una porosidad promedio de $75 \pm 5\%$. En el caso de las micropartículas de compuesto nPSi-βCD, también presentaron formas irregulares, se

observó un aumento del tamaño alrededor de $14\ \mu\text{m}$, su cara externa exhibió una apariencia más suave en comparación a la observada en las micropartículas de nPSi y nPSi-Qui. Además, fue posible observar los pliegues producidos por la polimerización con βCD /ácido cítrico. Por otro lado, en cuanto al análisis EDX, porcentaje atómico y la relación C/Si, nPSi exhibió principalmente señales de Silicio (Si) y Oxígeno (O) debido a la oxidación realizada por H_2O_2 . Aunque la relación C/Si fue de 0.76 ± 0.2 , la señal carbono (C) fue considerablemente alta ($\sim 18\%$) (**Figura 15B1-2**). En el caso de nPSi-Qui, debido a la caracterización previa (Potencial Zeta y ATR-FTIR), se esperaba identificar una señal Nitrógeno (N) de grupos aminos de la quitosana incorporada, pero no fue así. Sin embargo, es posible observar que la relación C/Si aumentó dos veces hasta 1.5 ± 0.3 debido al injerto del polímero. Con respecto a la muestra nPSi- βCD , se identificó un aumento importante de la señal C, el C/Si se elevó hasta 17.4 ± 8 debido a la polimerización in situ de βCD y ácido cítrico. También se detectaron trazas de los catalizadores Sodio (Na) y Fósforo (P).

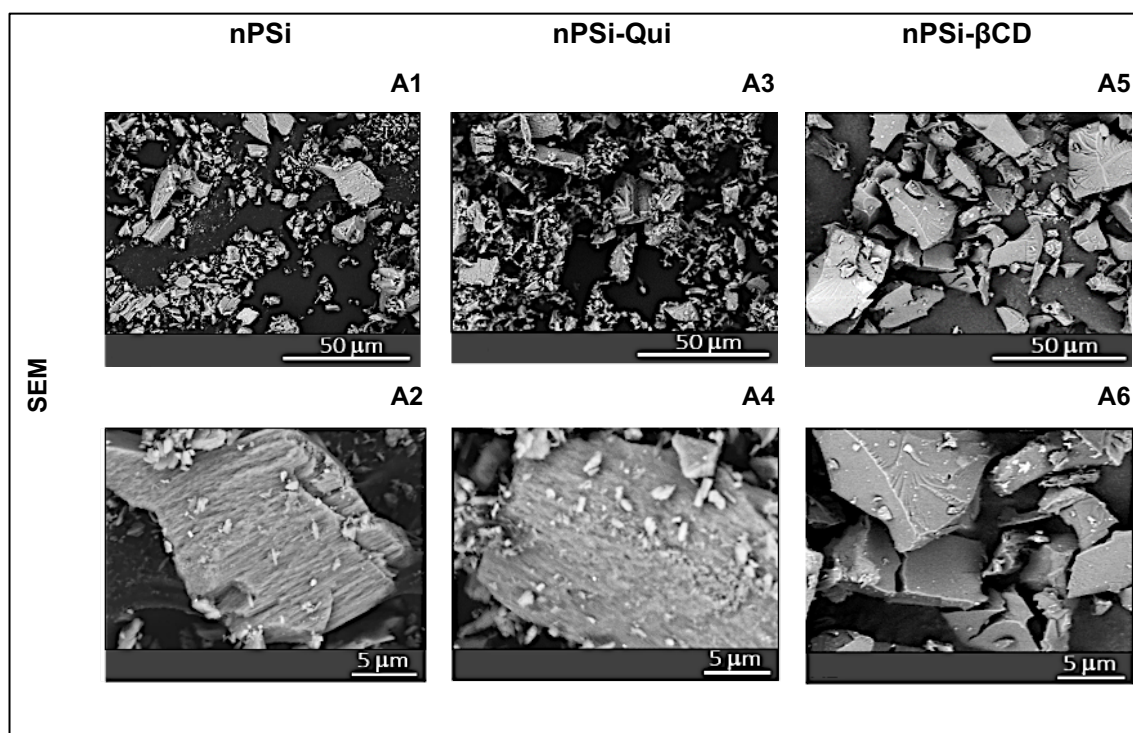


Figura 14. Análisis morfológico de micropartícula de compuesto nPSi- βCD . (A) Imágenes de microscopio electrónico de barrido (SEM) de las etapas de la síntesis de la micropartícula de nPSi- βCD : (A1-A2) micropartícula de silicio nanoporoso (nPSi), (A3-A4) micropartícula de silicio nanoporoso y quitosana (nPSi-Qui), (A5-A6) micropartícula de silicio nanoporoso, quitosana y beta-ciclodextrina (nPSi- βCD).

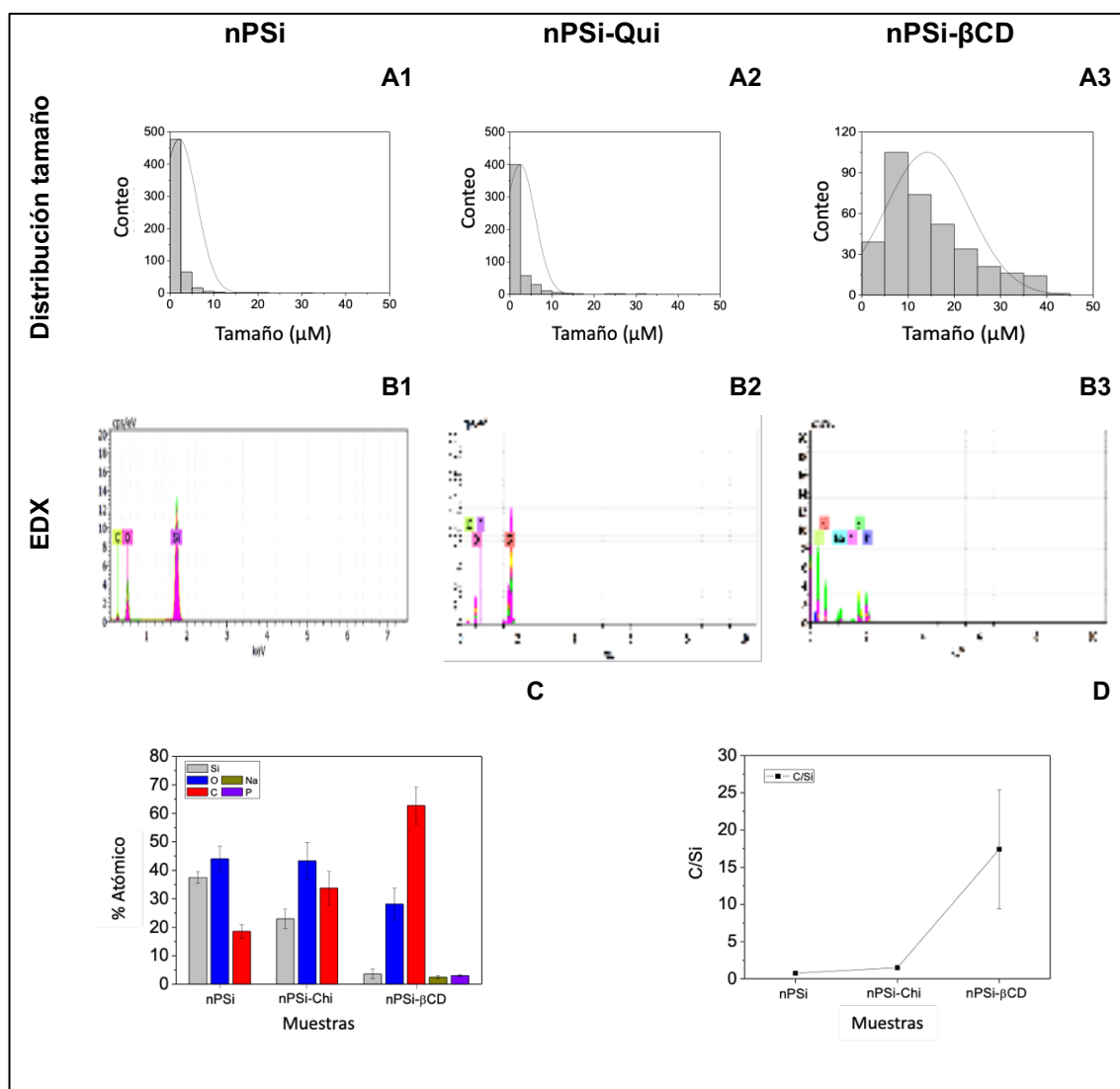


Figura 15. Distribución de tamaño y composición elemental de la micropartícula de compuesto nPSi-βCD. (A) Histogramas de distribución del tamaño de las micropartículas: (A1) nPSi, (A2) nPSi-Qui y (A3) nPSi-βCD. (B) Análisis de rayos X con dispersión de energía (EDX): (B1) nPSi, (B2) nPSi-Qui y (B3) nPSi-βCD. (C-D) Porcentaje atómico y relación C/Si de las muestras obtenidas a partir del análisis EDX.

7.2 Caracterización fisicoquímica de la micropartícula de compuesto nPSi-βCD cargada con polifenoles

7.2.1 Potencial Zeta

Para evaluar los cambios en las micropartículas de compuesto nPSi-βCD con los polifenoles cargados, se realizó el mismo conjunto de caracterización fisicoquímica. La **figura 16A** muestra una reducción del potencial zeta para nPSi-βCD después de la adición de ambos polifenoles: nPSi-βCD/AC y nPSi-βCD/Pin, presentando valores de 5.5 y 10.4 mV, respectivamente en comparación a micropartícula de nPSi-βCD.

7.2.2 Análisis químico

Con respecto al análisis ATR-FTIR (**Figura 16B**), los espectros de nPSi-βCD/AC y nPSi-βCD/Pin exhibieron los mismos grupos funcionales que el espectro de nPSi-βCD. Sin embargo, tanto nPSi-βCD/AC como nPSi-βCD/Pin exhibieron dos bandas adicionales relacionadas con los modos de flexión de CH, que están asociadas a la incorporación de ambos polifenoles (**Figura 16C**): (CH) y (CH) a 1187 y 940 cm⁻¹, respectivamente.

7.2.3 Análisis morfológico, tamaño y composición elemental

Con respecto a la morfología, que se observó mediante imágenes de SEM (**Figura 17A**), nPSi-βCD/AC y nPSi-βCD/Pin no presentó cambios significativos en comparación con nPSi-βCD (**Figura 17A3 y 5**); la superficie de ambas micropartículas cargadas exhibió una apariencia más suave y algunos pliegues producidos por la polimerización (**Figura 17A4 y 6**). Sin embargo, el tamaño de las micropartículas cargadas fue mayor que nPSi-βCD, para nPSi-βCD/AC fue ~19 μm y para nPSi-βCD/Pin fue levemente mas grande ~22 μm (**Figura 18A**). Por otro lado, como resultado del análisis EDX (porcentaje atómico y relación C/Si) se obtuvo que nPSi-βCD/AC y nPSi-βCD/Pin no presentaron más trazas de Na y P (**Figura 18B**). En cuanto a la relación C/Si, aumentó considerablemente en las micropartículas cargadas en comparación con la micropartícula sin cargar, la cual fue de 17.4 ± 8 , mientras que en nPSi-βCD/AC y nPSi-βCD/Pin presentaron 88.75 ± 22.2 y 105.7 ± 30.5 , respectivamente (**Figura 18C y D**).

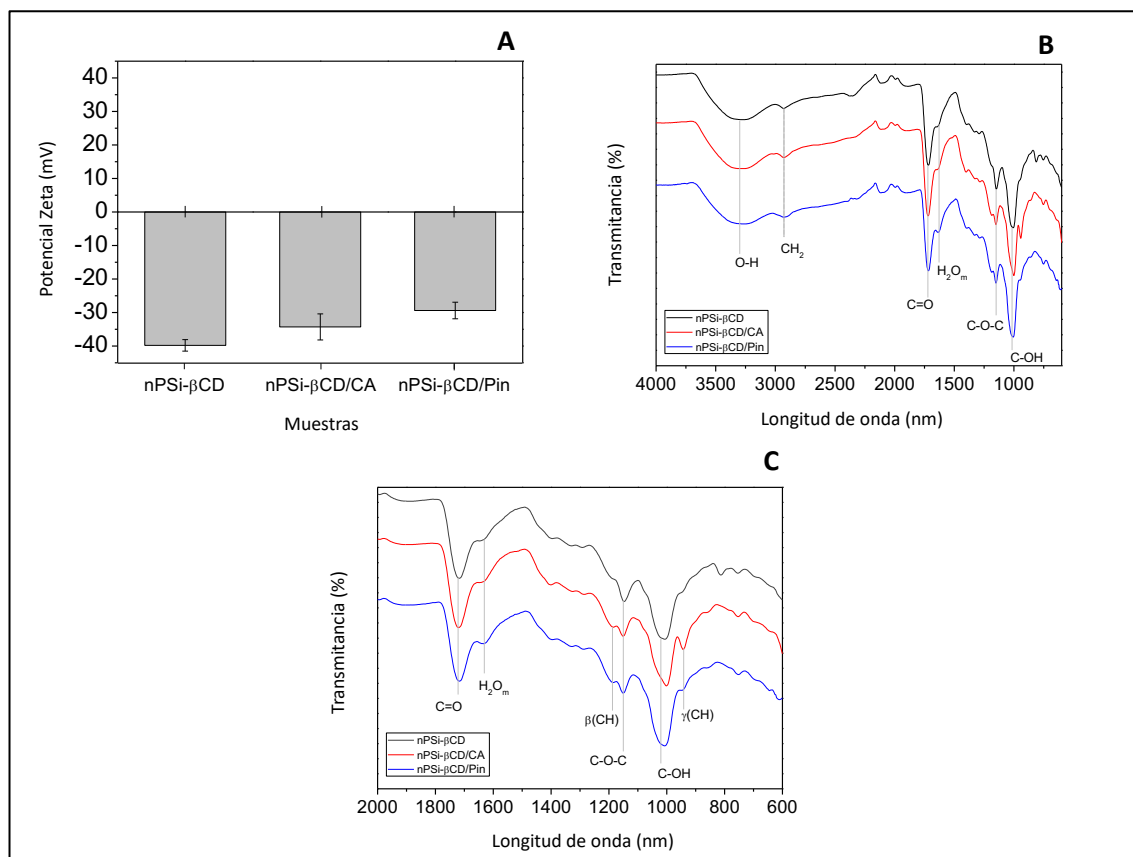


Figura 16. Monitoreo del proceso de carga de los polifenoles en las micropartículas de compuesto nPSi-βCD. (A) Potencial Zeta y (B) Análisis de espectroscopia infrarroja transformada de Fourier-reflectancia total atenuada (ATR-FTIR), (C) Zoom de los espectros ATR-FTIR.

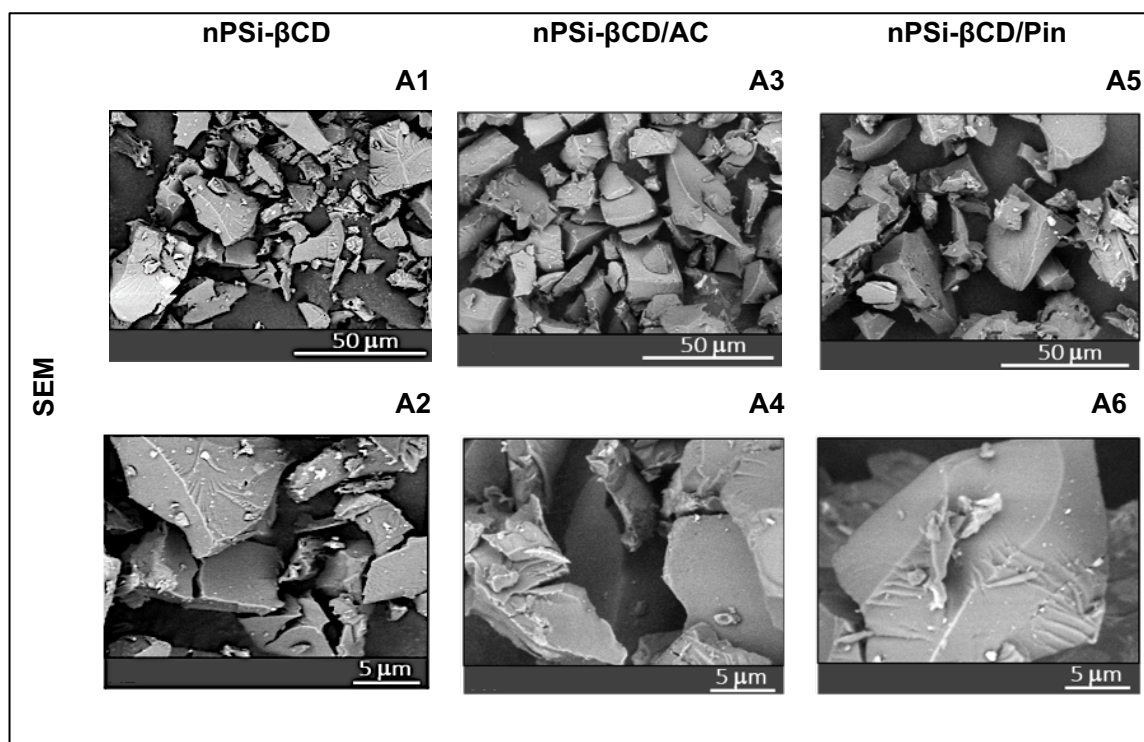


Figura 17. Análisis morfológico de micropartícula de compuesto nPSi-βCD cargada con polifenoles. (A) Imágenes de microscopio electrónico de barrido (SEM) de la micropartícula nPSi-βCD + polifenoles: (A1-A2) nPSi-βCD, (A3-A4) nPSi-βCD/AC y (A5-A6) nPSi-βCD/Pin.

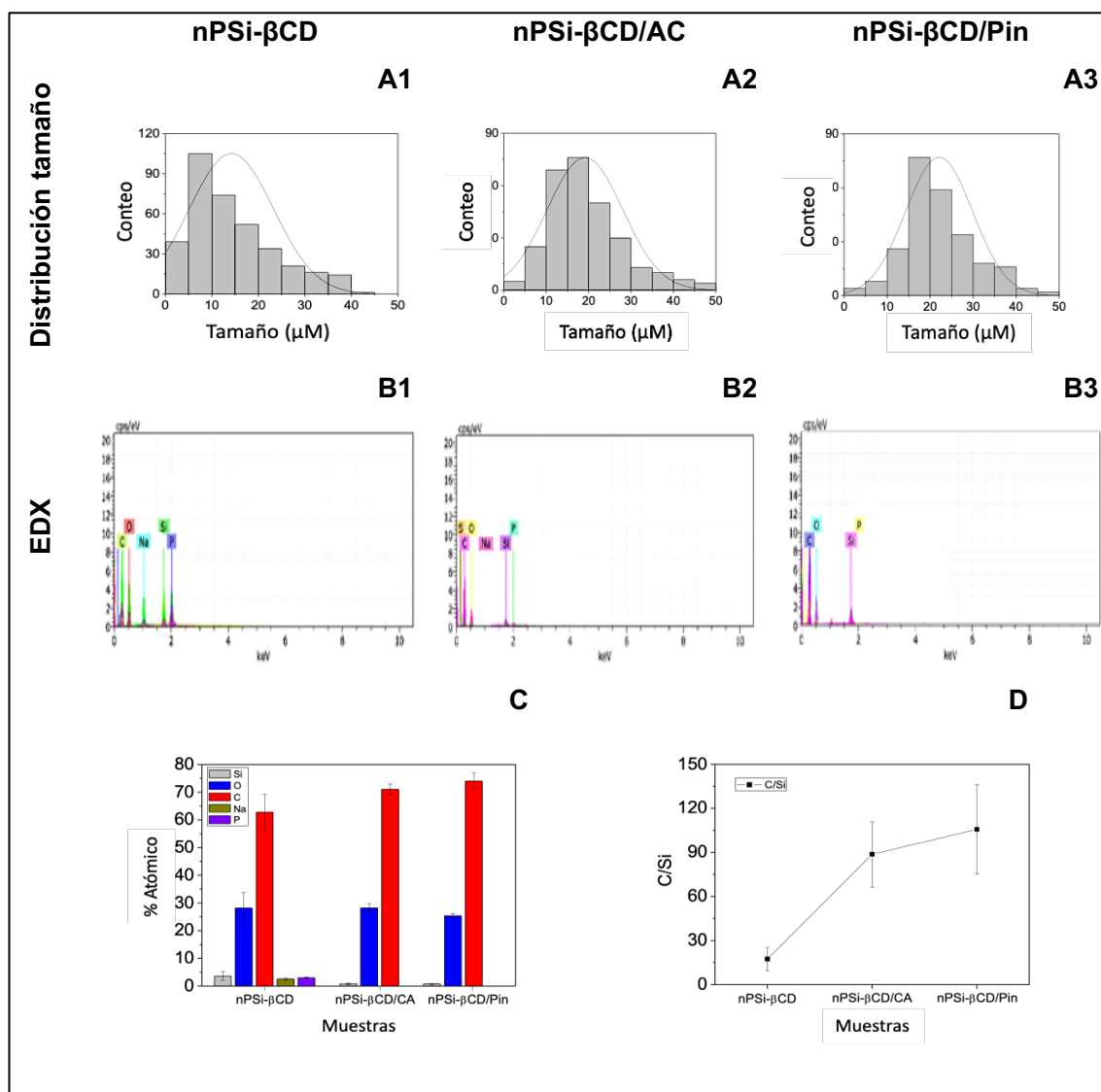


Figura 18. Distribución de tamaño y composición elemental de la micropartícula de compuesto nPSi-βCD cargada con polifenoles. (A) Histogramas de distribución del tamaño de las micropartículas: (A1) nPSi-βCD, (A2) nPSi-βCD/AC y (A3) nPSi-βCD/Pin. (B) Análisis de rayos X con dispersión de energía (EDX): (B1) nPSi-βCD, (B2) nPSi-βCD/AC y (B3) nPSi-βCD/Pin. (C-D) Porcentaje atómico y relación C/Si de las muestras obtenidas a partir del análisis EDX.

7.3 Análisis termogravimétricos

Los análisis de TGA se realizaron para determinar el grado de funcionalización del polímero Qui y β CD integrado en los sustratos de nPSi (**Figura 19**). El gráfico ilustra el porcentaje de masa en función de la temperatura de las muestras bajo una purga de nitrógeno. Como se esperaba, la muestra de nPSi prácticamente no presentó degradación, mientras que nPSi-Qui mostró una ligera descomposición de alrededor del 3%. Adicionalmente, como referencia se realizó el análisis termogravimétrico de β CD nativa. La descomposición del β CD fue claramente apreciable; la primera etapa fue a 100°C que corresponde al nivel de agua absorbida (~10.5%). La segunda etapa, que comenzó a 310°C y terminó a 350°C, la cual está relacionada con la fusión, descomposición y conversión en carbón de las unidades de glucosa de las moléculas de β CD. En el caso de nPSi- β CD, el fenómeno fue gradual, debido a que la estructura neta 3D del polímero β CD es más fuerte, pero similar a la referencia del β CD nativo. Teniendo en cuenta el peso residual a 600°C, fue posible considerar que nPSi- β CD estaba compuesto por 32% de nPSi, 62% de polímero de β CD, 3% de Qui y 3% de humedad. El alto porcentaje de polímero β CD (62%) en la composición del compuesto refleja que además de las interacciones electrostáticas con el polímero mostradas por potencial zeta, la porosidad de las muestras también permitió que fuese como un anclaje para la película polimérica.

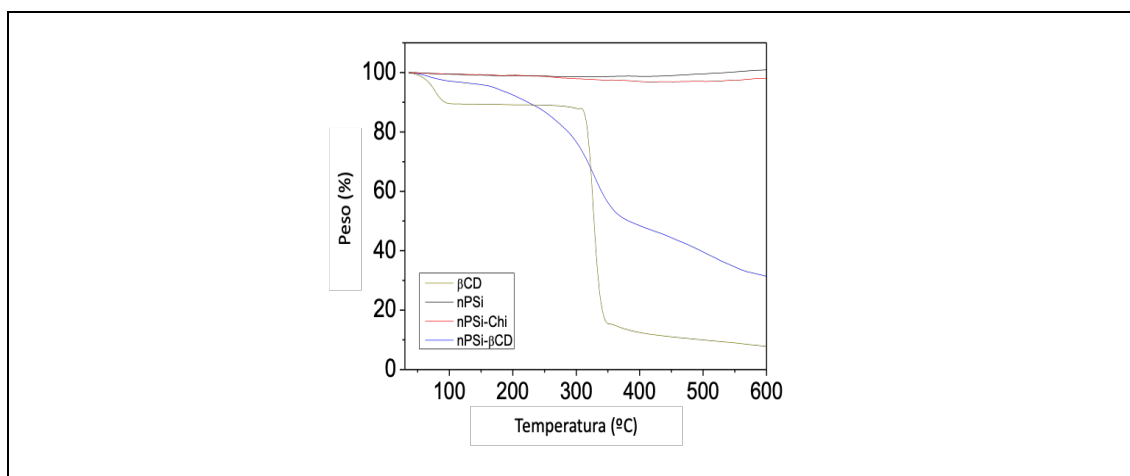


Figura 19. Análisis TGA de micropartículas en diferentes etapas de síntesis.

7.4 Carga y liberación de polifenoles

7.4.1 Capacidad de carga de polifenoles

El % de eficiencia (PEE) y el % de eficiencia de carga del polifenol (PLE) de las muestras se determinaron mediante espectroscopia UV-Vis a 310 y 322 nm para AC y Pin, respectivamente. Aunque nPSi (control) no exhibió una superficie química compatible con polifenoles, las muestras presentaron valores altos de % PEE 50 ± 2.0 para AC y 97.5 ± 2.0 para Pin (**Figura 20**). En el caso de nPSi- β CD, las micropartículas exhibieron $16.6 \pm 1.0\%$ de PEE y $58.5 \pm 1.5\%$ de PEE para AC y Pin, respectivamente. En el mismo sentido, las muestras nPSi presentaron un mayor porcentaje de PLE que nPSi- β CD. La **figura 20** muestra la capacidad carga de los polifenoles para ambos tipos de micropartículas. nPSi presentó una carga de $36 \pm 7 \mu\text{g AC/mg nPSi}$ ($3.6 \pm 0.7\%$ PLE) y $100 \pm 18 \mu\text{g Pin/mg nPSi}$ ($10.0 \pm 1.8\%$ PLE) mientras que nPSi- β CD mostró una carga de $12 \pm 2 \mu\text{g AC/mg nPSi}$ ($1.2 \pm 0.2\%$ PLE) y $60 \pm 7 \mu\text{g Pin/mg nPSi}$ ($6.0 \pm 0.7\%$ PLE). De acuerdo a los resultados que mostró la caracterización previa, es muy posible que los polifenoles se hayan adsorbido principalmente en la gran corona de polímero β CD alrededor de las pequeñas micropartículas de nPSi, que corresponden al sustrato del composito.

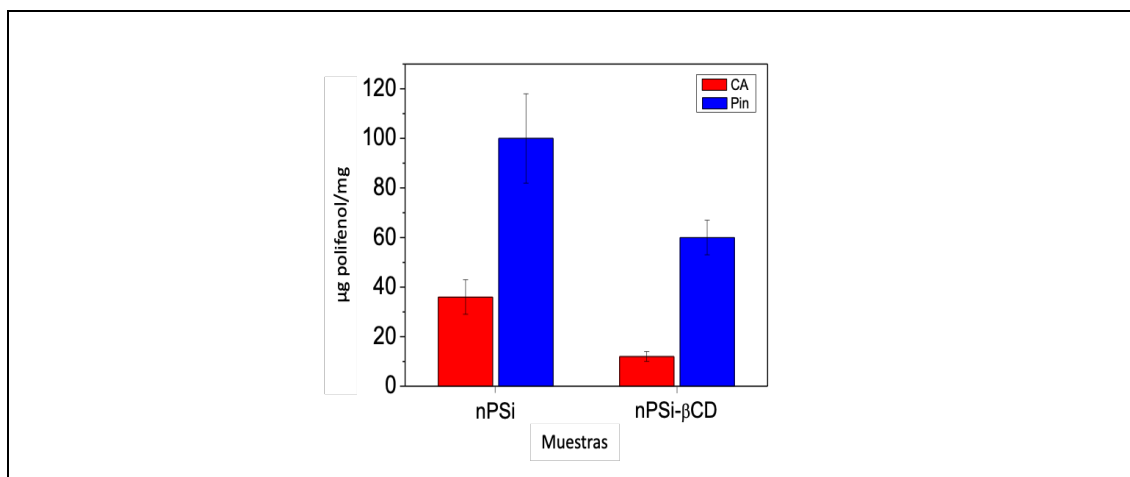


Figura 20. Capacidad de carga de polifenoles de micropartículas de composito nPSi- β CD.

7.4.2. Perfiles de liberación

Para evaluar la funcionalidad de la liberación controlada de polifenoles, las micropartículas de nPSi y nPSi-βCD cargadas, se sumergieron en lotes de PBS a 37°C bajo agitación. Los perfiles de liberación de polifenoles se muestran en la **figura 21A1**, **A2** para AC, y **figura 21B1**, **B2** para Pin. Después de 24 horas de liberación, todas las muestras presentaron valores más altos de % de liberación acumulativa. Las muestras de nPSi mostraron 97.6 ± 17.6 y 94.2 ± 17.0 para AC y Pin, respectivamente. En el caso de nPSi-βCD, las micropartículas exhibieron 93.8 ± 11.2 para AC y 92.3 ± 11.0 para Pin. Los perfiles presentaron un claro comportamiento contrastante entre el control (nPSi) y la micropartícula de compuesto (nPSi-βCD). Los resultados mostraron claramente que nPSi-βCD funcionó mucho mejor que nPSi, ya que ambos polifenoles retenidos en nPSi mostraron un perfil de liberación rápida durante los primeros minutos, en contraste con nPSi-βCD, que mostró una liberación controlada durante más de 5 horas.

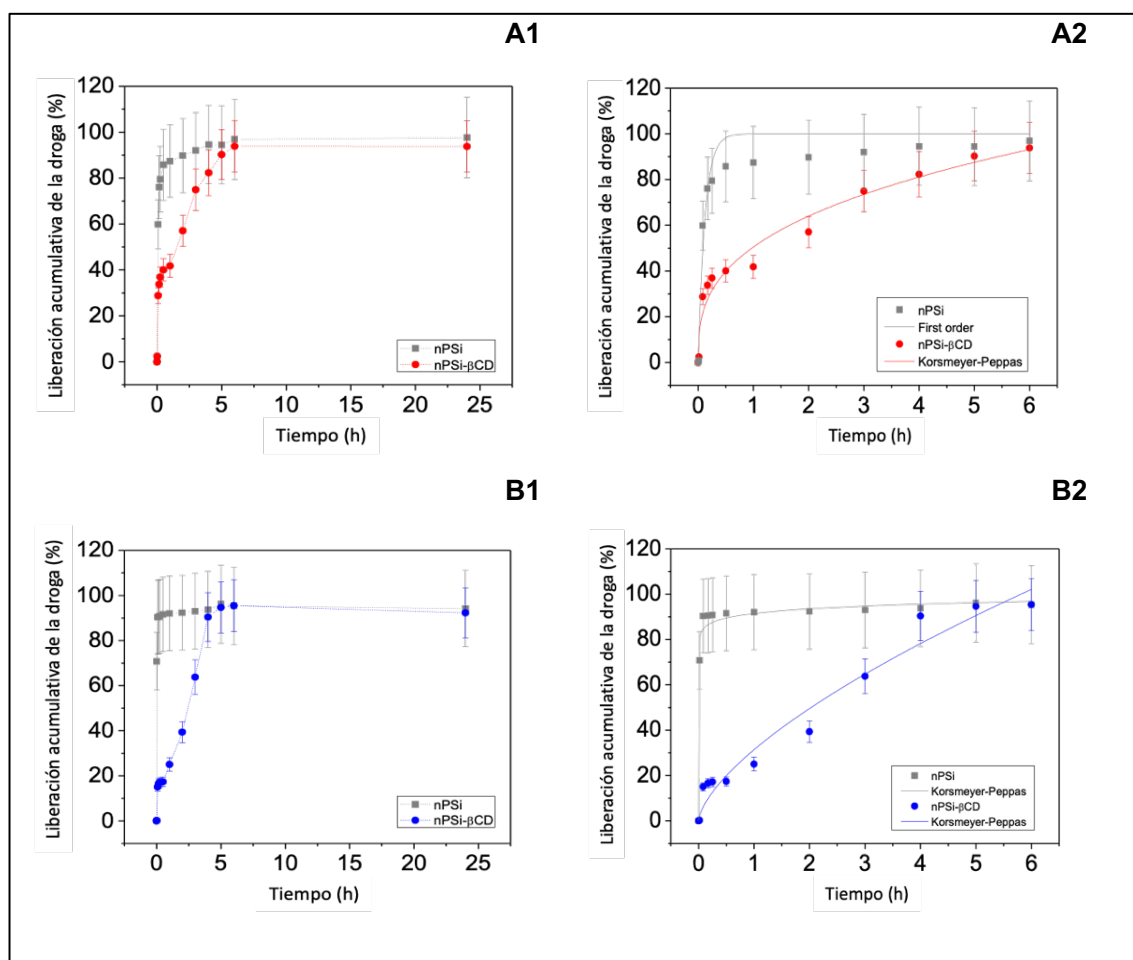


Figura 21. Perfil 1 de liberación de polifenoles en PBS a 37°C. A1-A2 para ácido cafeico y B1-B2 para pinocembrina.

De acuerdo a los resultados obtenidos de citotoxicidad de la micropartícula de composito (nPSi- β CD), se ajustó la carga de los polifenoles para reducir la cantidad de μg de composito a utilizar en los diferentes tratamientos, realizando nuevos perfiles de liberación. La carga de los polifenoles fue realizada de la siguiente manera: para experimentos con AC 50 μM , las muestras se cargaron con 45 μg AC/mg composito y para las concentraciones de AC 150 y 350 μM , se utilizó 460 μg AC/mg composito. Por su parte, para experimentos con Pinocembrina 10 y 20 μM , las muestras se cargaron con 44 μg Pin/mg composito y para 65 μM , con 66 μg Pin/mg composito. Posteriormente se evaluó la funcionalidad de liberación controlada de polifenoles, las micropartículas de nPSi y nPSi- β CD cargadas, se sumergieron en lotes de PBS a 37°C bajo agitación. Los perfiles de liberación de polifenoles muestran el mismo comportamiento que los perfiles realizados previamente. Ya que, después de 24 horas de liberación, todas las muestras presentaron valores más altos de % de liberación acumulativa **figura 22A1, A2** para AC, y **figura 22B1, B2** para Pin. Por lo anterior, las micropartículas de composito obtenidas, con la nueva carga fueron utilizadas en los ensayos posteriores.

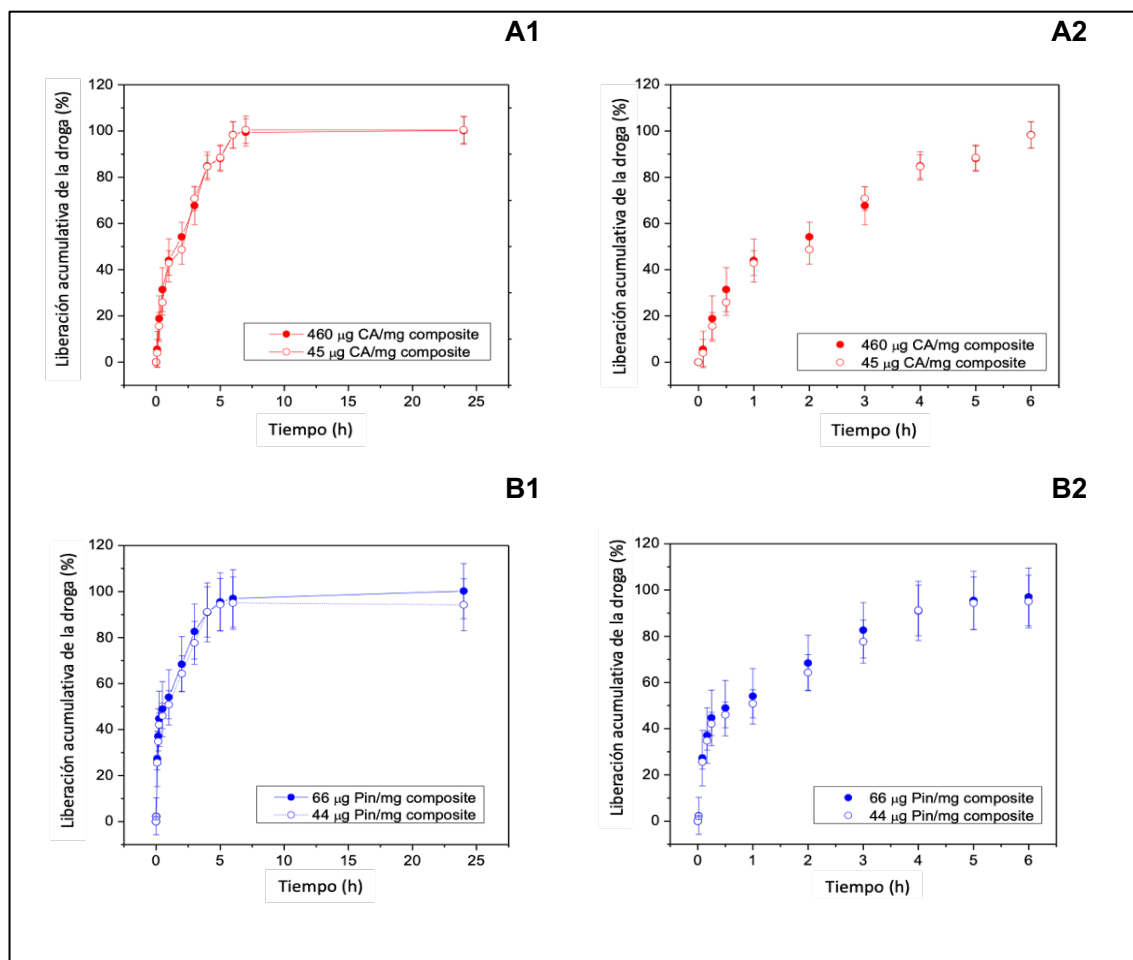


Figura 22. Perfil 2 de liberación de polifenoles en PBS a 37°C. A1-A2 para ácido cafeico y B1-B2 para pinocembrina.

7.4.3 Modelos cinéticos de liberación

Para comprender con mayor profundidad de los mecanismos que rigen la liberación de polifenoles de las muestras, se ajustaron tres modelos de liberación a los datos experimentales: I) primer orden, II) Higuchi y III) Modelos Korsmeyer-Peppas (**Tabla 8**). En el caso de la liberación de AC, de acuerdo con los valores obtenidos de r^2 para nPSi, presentó un mejor ajuste con el modelo de primer orden, donde la dosis de liberación inmediata fue dispersada de una sola vez. Sin embargo, para el liberación de AC usando nPSi- β CD, la cinética se describió con mayor precisión por el modelo Korsmeyer-Peppas. Esto significa que el factor que gobierna la liberación de AC no fue la disolución de las muestras, sino un proceso de difusión Fickiana. Además, en este sentido, debido a que el exponente de liberación n del modelo Korsmeyer-Peppas fue <0.5 , se puede sugerir una liberación difusiva. Por lo tanto, el proceso de erosión podría ser insignificante. Para el caso de Pin, ambos perfiles de liberación de micropartículas

nPSi y nPSi-βCD, se ajustaron mejor al modelo Korsmeyer-Peppas. Sin embargo, nPSi presentó un valor n cerrado a cero. En cuanto a nPSi-βCD, mostró un $n > 0.5$, lo que sugiere que, además de la difusión de Fickian, el proceso de erosión también podría estar contribuyendo en la liberación de Pin.

Tabla 8. Cinética de liberación in-vitro de ácido cafeico y pinocembrina en PBS a 37°C.

Polifenol	Muestras	First order		Higuchi		Korsmeyer-Peppas		
		$\ln M_t - \ln M_0 = k_1 t$		$M_t = k_H t^{\frac{1}{2}}$		$\frac{M_t}{M_\infty} = k_{KP} t^n$		
		$k_1 (\%h^{-1})$	r_{adj}^2	$k_H (\%h^{-\frac{1}{2}})$	r_{adj}^2	$k_{KP} (h^{-n})$	n	r_{adj}^2
Ácido cafeico	nPSi	8.1047	0.9355	52.7074	-0.004	79.7830	0.197	0.7832
	nPSi-βCD	0.5694	0.7982	41.6744	0.9074	50.4833	0.3419	0.9649
Pinocembrina	nPSi	76.3252	0.9271	54.5954	-2.144	91.4797	0.0317	0.9774
	nPSi-βCD	0.3892	0.9433	38.5733	0.9451	31.3890	0.6584	0.9654

7.5 Evaluación de viabilidad y citotoxicidad

7.5.1 Concentración efectiva de polifenoles

Para evaluar el efecto citotóxico de AC y Pin, se cultivaron células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC), las cuales fueron tratadas con diferentes concentraciones de los polifenoles. Primero se obtuvo la concentración efectiva, cuyo resultado arrojó una curva dosis-respuesta que sigue patrón sigmoideo (**Figura 23A**), a partir de la cual utilizando un modelo matemático de regresión no lineal se obtuvieron los valores de concentración efectiva (EC) 5, 10 y 20. Los resultados mostraron que la viabilidad disminuyó gradualmente, dando cuenta que el tratamiento genera un efecto citotóxico en la célula dependiente de la dosis, observándose este comportamiento para ambos polifenoles. En el caso de AC, la viabilidad celular se redujo ligeramente del 100 al 80% para concentraciones de 2 hasta 200 μM ($p > 0,05$), mientras que la sobrevida fue $\leq 70\%$ para concentraciones ≥ 500 μM ($p < 0,01$) (**Figura 23B**).

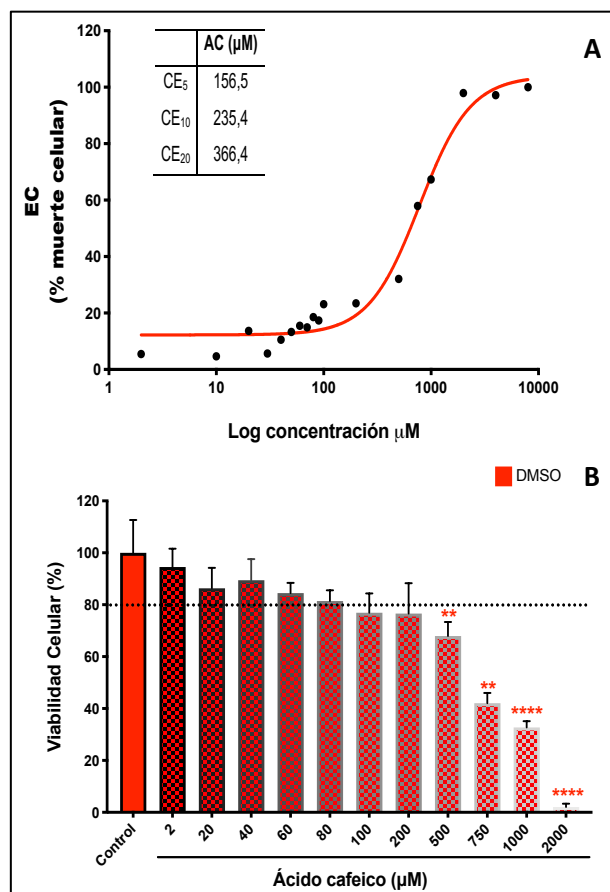


Figura 23. Viabilidad de HUVECs tratadas con ácido cafeico. Las células se expusieron a diferentes concentraciones del polifenol durante 24 horas para luego la viabilidad celular mediante el ensayo MTS. Se utilizó como control células no tratadas. Todos los resultados se presentan como la media $\pm$ desviación estándar (DE) de los resultados obtenidos en experimentos independientes. Se indican diferencias estadísticamente significativas en comparación con los controles (** = $p < 0,01$; **** = $p < 0,0001$; $n=6$).

Con respecto al efecto de Pin (**Figura 24**), se observó que la viabilidad fue superior al 80% para concentraciones de 2 hasta 100 μM , pero disminuyó al 50% al incrementar a 200 μM ($p > 0,05$). Asimismo, la viabilidad celular se redujo a menos del 20% a concentraciones ≥ 500 μM ($p < 0,01$) (**Figura 24B**). De acuerdo con estos resultados, las concentraciones de hasta 200 y 100 μM para AC y Pin, respectivamente, mantuvieron la viabilidad celular $\geq 80\%$, es decir, no generaron citotoxicidad celular.

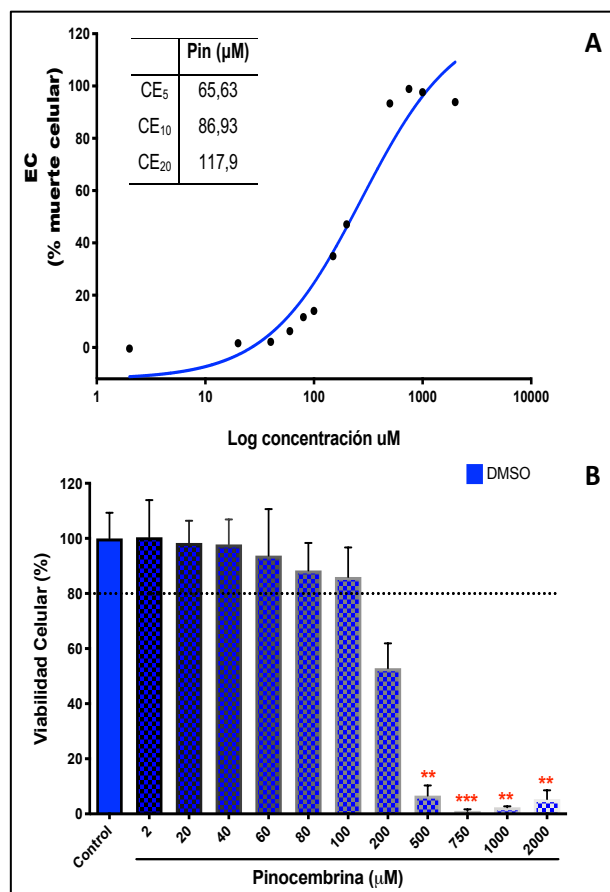


Figura 24. Viabilidad de HUVECs tratadas con pinocembrina. Las células se expusieron a diferentes concentraciones del polifenol durante 24 horas para luego la viabilidad celular mediante el ensayo MTS. Se utilizó como control células no tratadas. La línea discontinua indica la viabilidad celular del 80%. Todos los resultados se presentan como la media $\pm$ desviación estándar (DE) de los resultados obtenidos en experimentos independientes. Se indican diferencias estadísticamente significativas en comparación con los controles (** = $p < 0,01$; **** = $p < 0,0001$; $n=6$).

7.5.2 Citotoxicidad de la micropartícula de compuesto nPSi- β CD

El efecto las micropartículas de nPSi- β CD sobre la viabilidad de HUVEC fue estudiado a través del ensayo de viabilidad celular (CellTiter-Fluor) y la observación microscópica de los cambios morfológicos que se pudieran generar en la célula. Para esto, se cultivaron células en presencia de micropartículas de compuesto a concentraciones de 0.25, 0.50, 1.25 y 2.5 mg/mL durante 6 y 24 horas. Como resultado de la observación microscópica (**Figura 25**), las HUVEC expuestas a las concentraciones más bajas (0.25 y 0.50 mg/mL) exhibieron una morfología normal, es

decir, alargada, aplanada, con núcleo prominente y largas filopodias, lo que sugiere que las micropartículas fueron bien toleradas por las células. En cambio, las concentraciones más altas (1.25 y 2.5 mg/mL), generaron una gran cantidad de células redondeadas y suspendidas en el medio de cultivo. Lo anterior indica que las concentraciones de micropartículas de nPSi- β CD superiores a 0.50 mg/mL no fueron bien toleradas por HUVECs, afectando su capacidad de adhesión celular, una característica esencial de supervivencia de este tipo celular.

En cuanto al porcentaje de viabilidad de HUVECs expuestas a diferentes concentraciones de micropartículas de nPSi- β CD (**Figura 26A1-5**), los resultados mostraron que la viabilidad celular a 0.25 mg/mL de composito fue superior al 80%, sin embargo, comenzó a disminuir a concentraciones iguales o superiores a 0.50 mg/mL (63%; $p < 0,01$) (**Figura 26B**). Específicamente, a concentraciones de 1.25 y 2.50 mg/mL, la viabilidad celular decayó dramáticamente, alcanzando valores tan bajos como 20%. Por lo tanto, a partir de estos resultados se utilizó una dosis máxima de 0,25 mg/mL de composito, ya que no altera la morfología ni la sobrevivencia de la célula HUVEC.

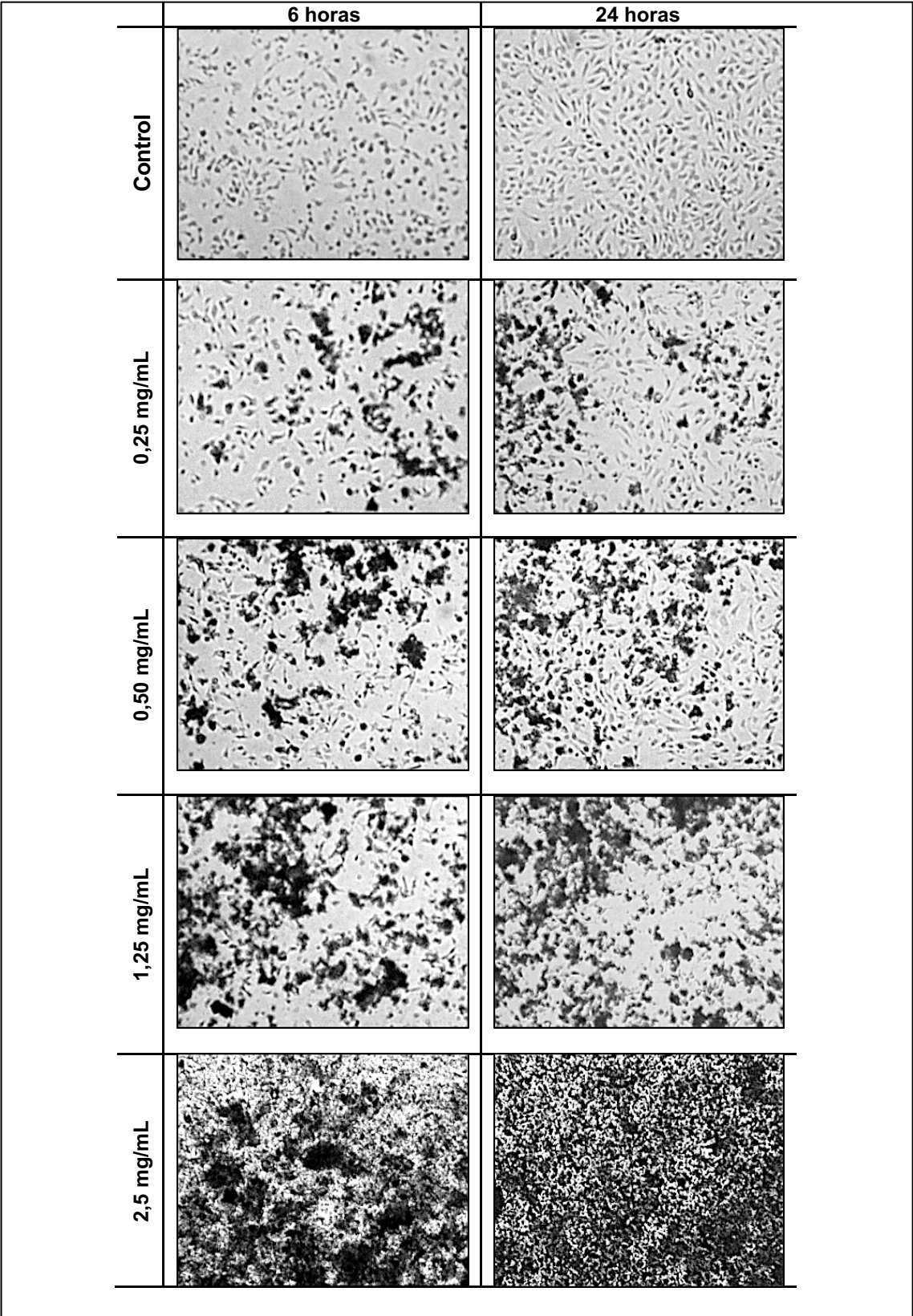


Figura 25. Efecto de la exposición de micropartículas de nPSi-βCD sobre HUVECs cultivadas, durante 6 y 24 horas. Las imágenes son representativas de cada tratamiento y fueron tomadas con un microscopio invertido, con un aumento de 8X. Barras de escala: 1 mm.

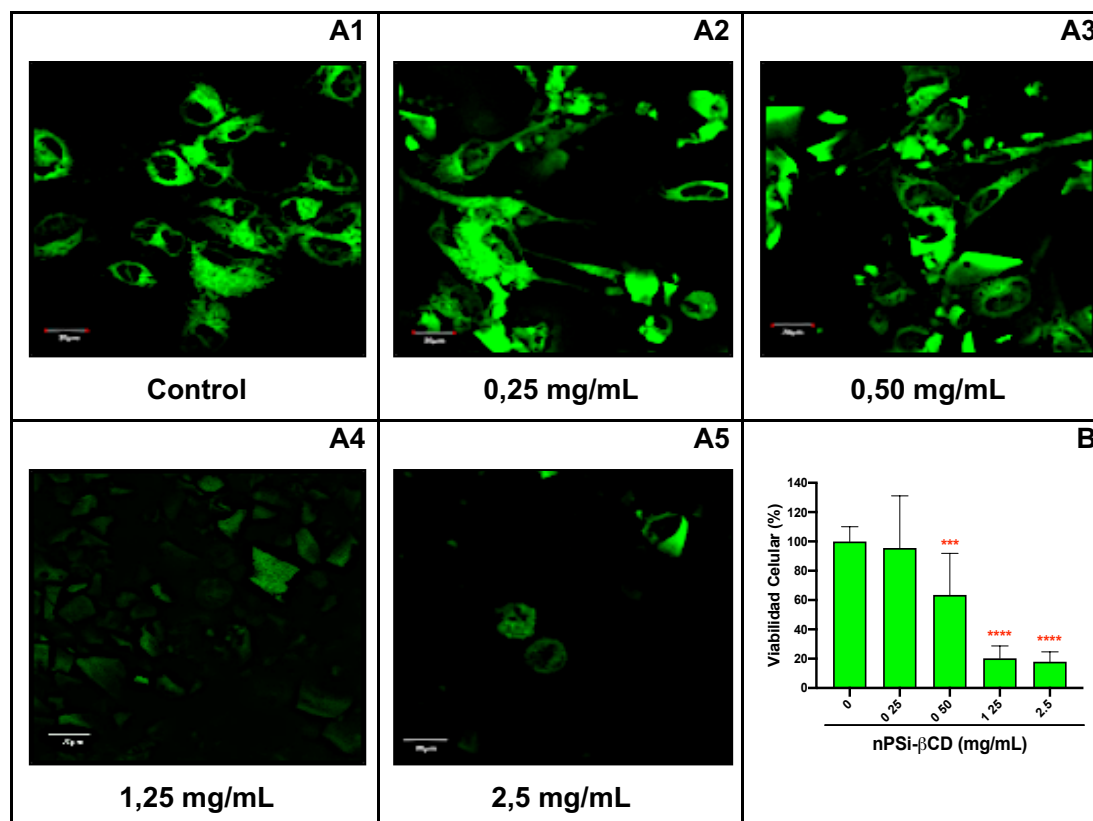


Figura 26. Viabilidad de HUVECs expuestas a micropartículas de nPSi-βCD. Las células fueron expuestas durante 8 horas, posteriormente se evaluó la viabilidad celular con el ensayo CellTiter-Fluor™. (A) HUVECs expuestas a concentraciones crecientes de micropartículas de compuesto nPSi-βCD. Escala de barra: 20 μm. (B) Porcentaje de viabilidad de células expuestas a micropartículas de compuesto (nPSi-βCD). Se utilizaron como control células que no fueron expuestas a las micropartículas de compuesto (nPSi-βCD). Todos los resultados se presentan como media ± desviación estándar (DE) de los resultados obtenidos en experimentos independientes. Se indican diferencias estadísticamente significativas en comparación con los controles (***) = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$; $n=3$).

7.6 Inducción de estrés oxidativo con H₂O₂

7.6.1 Citotoxicidad de H₂O₂

Para evaluar el efecto del H₂O₂ sobre la viabilidad de HUVECs, se cultivaron células las cuales fueron tratadas con concentraciones de H₂O₂ entre 0,2 y 50 mM durante 12 horas. Los resultados muestran que la viabilidad celular en las concentraciones de 0,2-0,8 mM varía entre 120-78%, sin embargo, esta variación observada no afecta a la célula ($p > 0,05$). Mientras que desde 1,6 hasta 50 mM se observa una disminución gradual y significativa de la viabilidad por debajo del 80% ($p < 0,001$) (**Figura 27**). A partir de estos resultados se decide utilizar una concentración de 0,4 mM de H₂O₂, para inducir estrés oxidativo en células HUVEC, ya que no afecta la viabilidad celular.

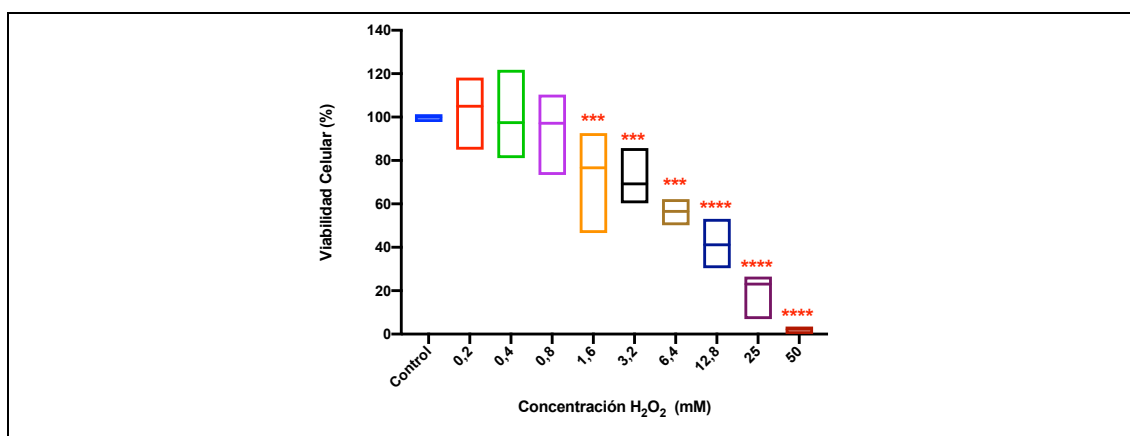


Figura 27. Viabilidad de HUVECs tratadas con H₂O₂. Las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de H₂O₂ durante 12 horas, luego se midió la viabilidad celular mediante el ensayo MTS. Los datos se presentan como la media $\pm$ desviación estándar de los resultados obtenidos en experimentos independientes. Se indican diferencias estadísticamente significativas en comparación con los controles (***) = $p < 0,001$; **** = $p < 0.0001$; $n=3$).

7.6.2 Inducción de estrés oxidativo

Para verificar si la concentración de H_2O_2 seleccionada induce estrés oxidativo se utilizó la sonda CM- H_2DCFDA . Para lo cual se cultivaron células las cuales fueron tratadas con concentraciones de H_2O_2 entre 0,2 y 3,2 mM durante 4 horas. Los resultados obtenidos muestran que concentraciones de H_2O_2 entre 3,2 y 0,4 mM, inducen significativamente estrés oxidativo, de manera dosis depende ($p < 0,0001$). Es decir, a mayor concentración mayor inducción de estrés oxidativo, mientras que a 0,2 mM de H_2O_2 no se observan diferencias respecto del control ($p > 0,05$) (**Figura 28**). Estos resultados permiten demostrar que 0,4 mM de H_2O_2 es una buena concentración para ser utilizada en la inducción de estrés oxidativo en células HUVECs.

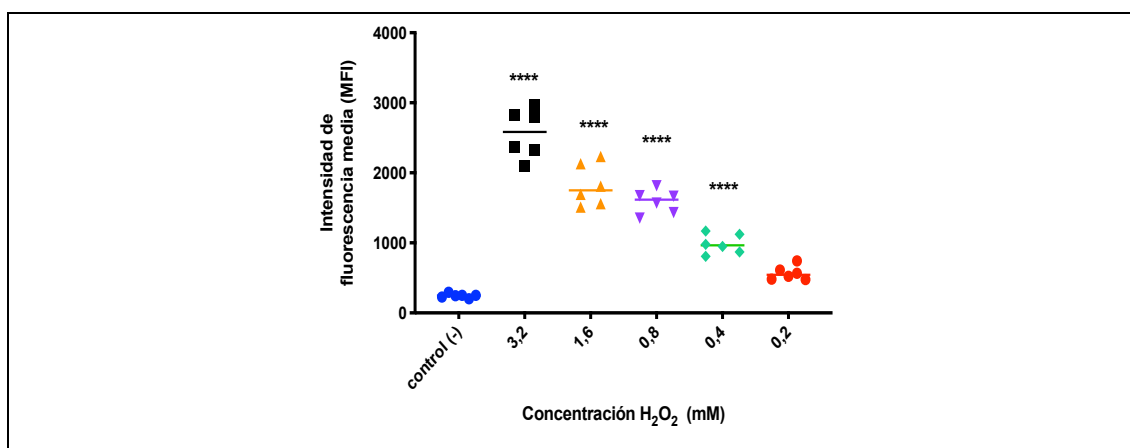


Figura 28. Evaluación de estrés oxidativo en HUVECs tratadas con H_2O_2 . Las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de H_2O_2 durante 4 horas, luego se midió la cantidad de fluorescencia emitida utilizando el ensayo con sonda CM- H_2DCFDA . Los datos se presentan como la media $\pm$ desviación estándar de los resultados obtenidos en experimentos independientes. Se indican diferencias estadísticamente significativas en comparación con los controles (**** = $p < 0,0001$; $n=3$).

7.7 Evaluación de la actividad antiangiogénica de ácido cafeico y pinocembrina

7.7.1 Efecto antiangiogénico del tratamiento con ácido cafeico y pinocembrina en solución sobre la formación de vasos en la membrana acantocoriónica de huevos de pollo embrionados

Para evaluar la actividad antiangiogénica de los polifenoles AC y Pin, se realizó un modelo in vivo de angiogénesis en membrana acantocoriónica de pollo (CAM). Para lo cual se utilizaron huevos embrionados expuestos a diferentes concentraciones de AC y Pin de 50, 150, 350 μM y 10, 20, 65 μM , respectivamente. Cuando se comparó la densidad microvascular en los distintos grupos experimentales (control v/s tratados), se observó una disminución significativa del número de vasos sanguíneos en el grupo tratado con AC como Pin ($p < 0,0001$). Para el grupo tratado con AC el conteo fue $11 \pm 2,6$ vasos sanguíneos/campo (**Figura 29A1-3**) y para el grupo tratado con Pin $10 \pm 2,9$ vasos sanguíneos/campo (**Figura 29B1-3**), en tanto que para el grupo control fue de $16 \pm 3,8$ vasos sanguíneos/campo (**Figura 290A y B**). Por otra parte, al comparar las diferentes concentraciones testeadas dentro del mismo grupo experimental AC o Pin, no se observaron diferencias. Tampoco se encontró diferencia significativa entre el grupo tratado con AC v/s Pin ($p > 0,05$) (**Figura 30**).

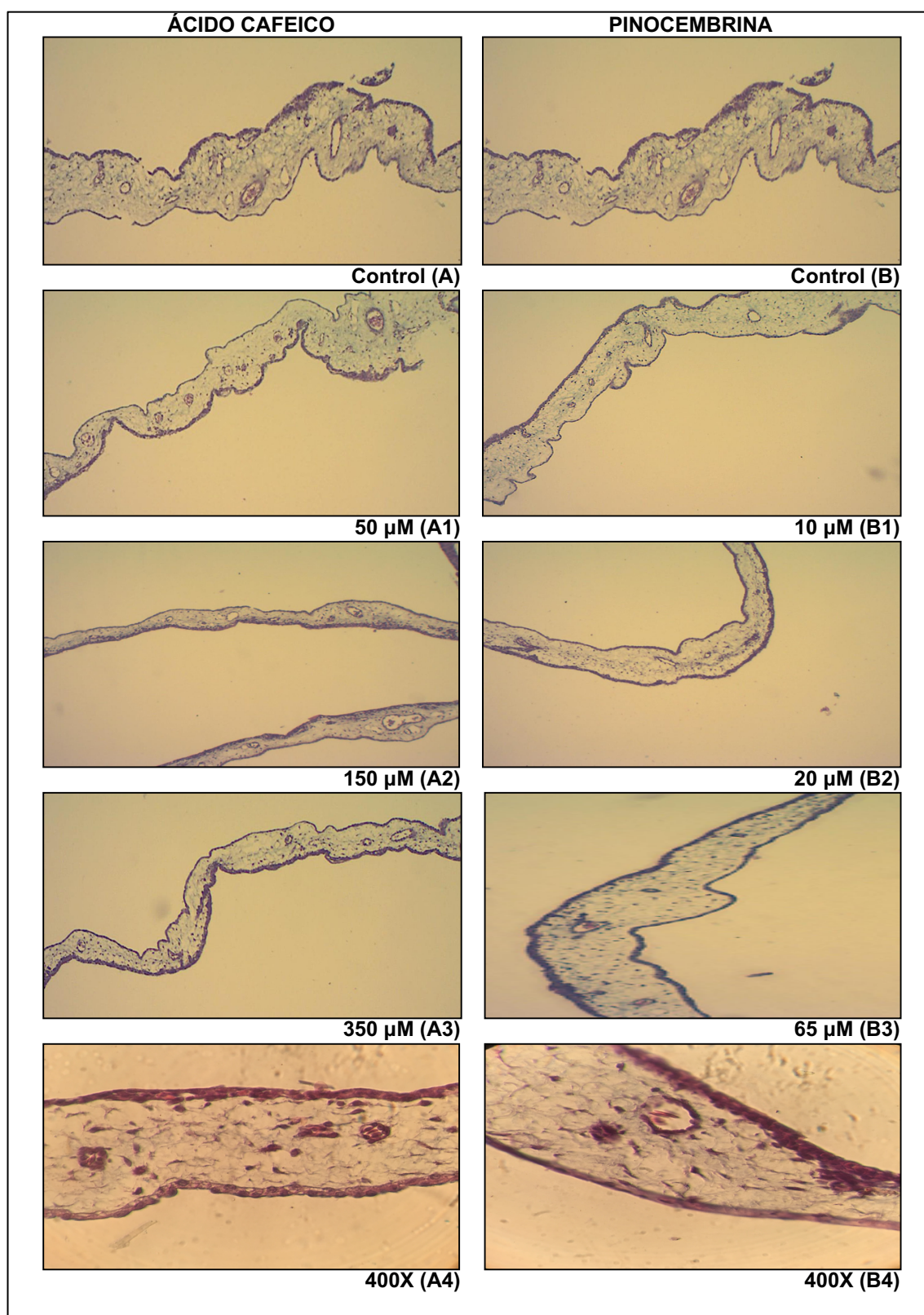


Figura 29. Efecto antiangiogénico del tratamiento con ácido cafeico y pinocembrina sobre la formación de vasos en la membrana acantocoriónica de huevos de pollo embrionados. (A y B) Imágenes representativas de los tratamientos con ácido cafeico y pinocembrina, respectivamente.

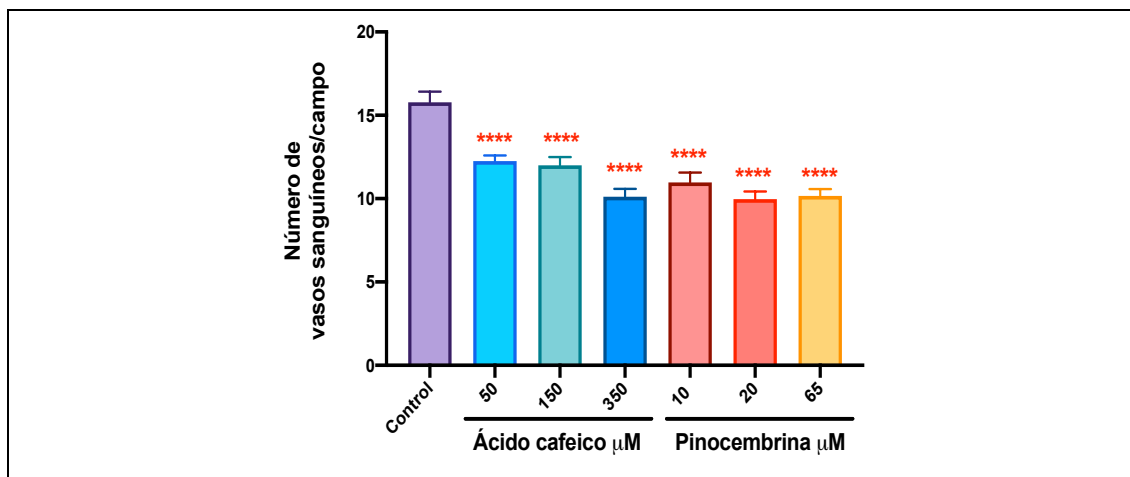


Figura 30. Efecto antiangiogénico del tratamiento con ácido cafeico y pinocembrina sobre la formación de vasos en la membrana acantocoriónica de huevos de pollo embrionados. Se analizaron tres secciones por huevo, se fotografiaron y contaron los vasos sanguíneos por mm² de campo óptico. Los datos numéricos muestran las medias $\pm$ desviación estándar de los resultados obtenidos en experimentos independientes. Se indican diferencias estadísticamente significativas en comparación con los controles (**** = $p < 0,0001$; $n=3$).

7.7.2 Efecto del tratamiento con ácido cafeico y pinocembrina en solución y cargado en la micropartícula de compuesto nPSi- β CD sobre la capacidad de HUVECs para formar estructuras tubulares en matrigel.

Para evaluar la actividad antiangiogénica in vitro de los polifenoles AC y Pino, se realizó el ensayo de formación de estructuras tubulares en matrigel (**Figura 31**). Para lo cual se sembraron células HUVEC + 0,4 mM de H₂O₂ sobre el matrigel. Después de 4 horas se agregaron los diferentes tratamientos con los polifenoles tanto en solución como microencapsulados. Para cuantificar la formación de estructuras tubulares en la matriz, se obtuvo el número de prolongaciones celulares libres, prolongaciones celulares que contactan con otras células y el polígonos cerrados que se formaron entre las prolongaciones. En la **figura 31** se observa que el tratamiento con 150 μ M de AC en solución redujo de forma significativa el número de uniones, segmentos y polígonos formados ($p < 0,05$) (**Figura 32A, B y C**). En tanto que para las otras concentraciones de AC 50 y 350 μ M, no se observaron cambios significativos en comparación al control (vehículo). Cuando se utilizó el polifenol cargado en la micropartícula de compuesto nPSi- β CD (**Figura 32**) se observó que la formación de estructuras parecidas a vasos

sanguíneos disminuyó significativamente en las 3 concentraciones testeadas, no obstante, se observó una mayor reducción en nPSi- β CD+150 μ M AC (**Figura 32A`, B` y C`**) en comparación las otras concentraciones de nPSi- β CD+AC 50 y 350 μ M AC. Finalmente al comparar los tratamientos entre AC en solución y microencapsulado, los resultados muestran una mayor actividad antiangiogénica del polifenol cuando se encuentra cargado en la micropartícula ($p < 0,001$).

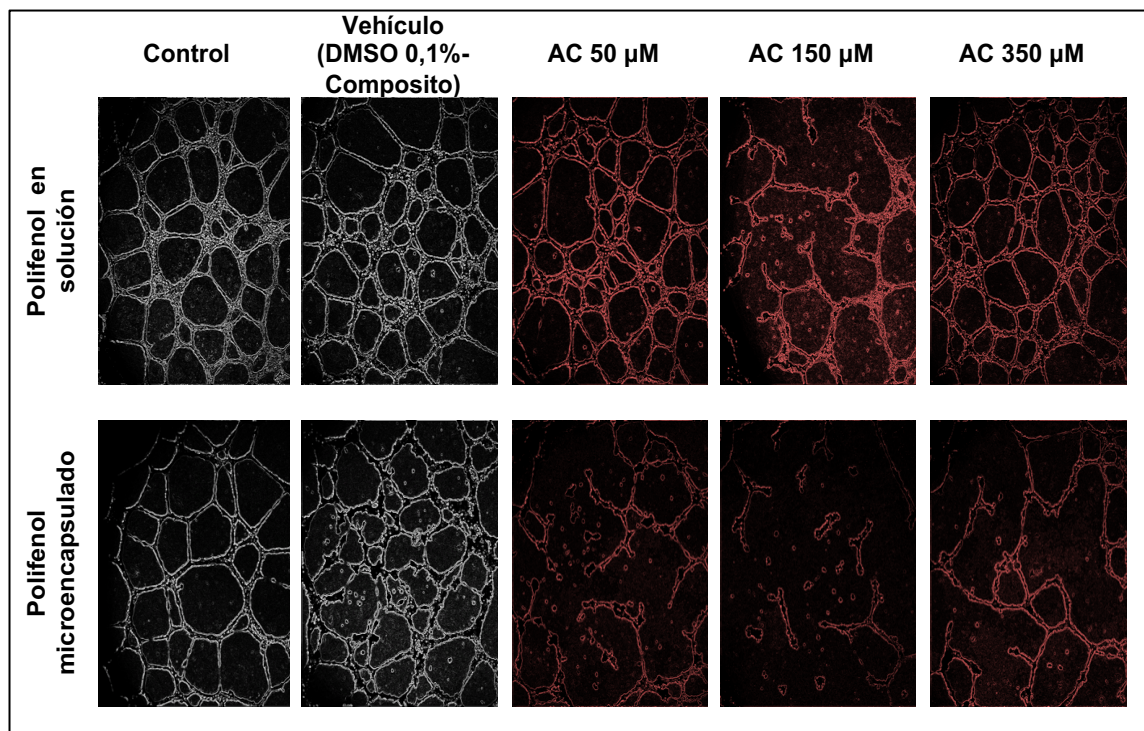


Figura 31. Efecto del tratamiento con ácido cafeico en solución y cargado en la micropartícula de composito nPSi- β CD sobre la capacidad de HUVECs para formar estructuras tubulares en matrigel. Las imágenes fueron tomadas a las 8 horas y son representativas para cada grupo de tratamiento.

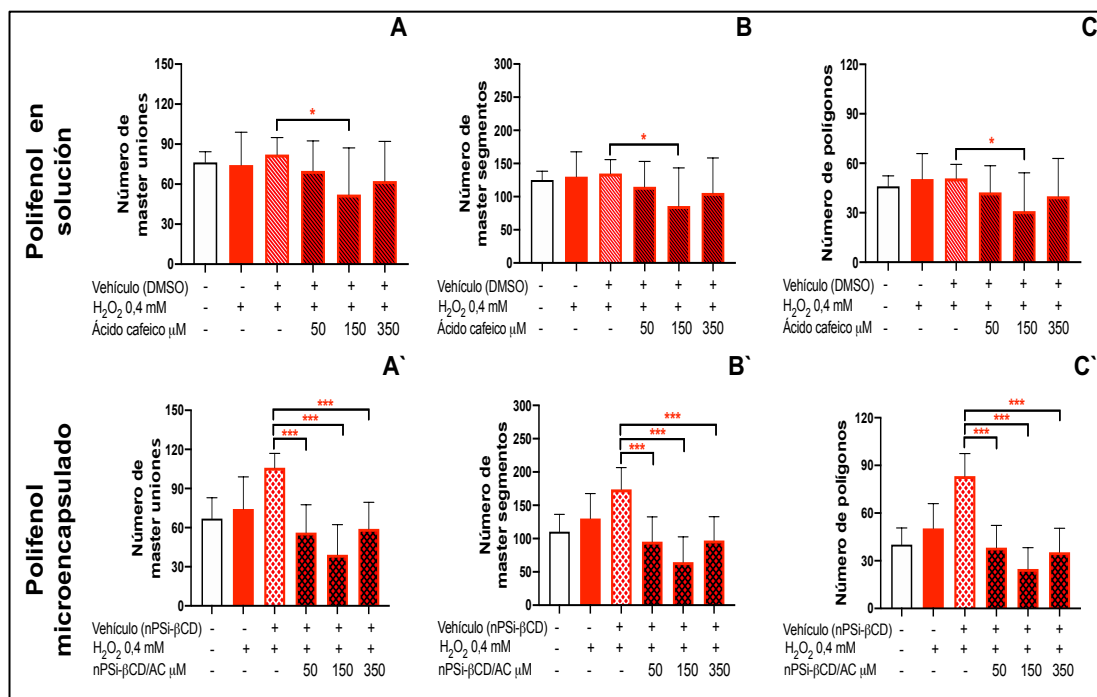


Figura 32. Efecto del tratamiento con ácido cafeico en solución y cargado en la micropartícula de compuesto nPSi-βCD sobre la capacidad de HUVECs para formar estructuras tubulares en matrigel. (A-A') número de master uniones, (B-B') número de master segmentos y (C-C') número de polígonos formados. Las letras A, B y C corresponden al polifenol en solución mientras que A', B' y C' al polifenol microencapsulado. Se indican diferencias estadísticamente significativas en comparación con el tratamiento control (vehículo) (* = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$; $n=3$).

Por otro lado, para el caso de Pin (**Figura 33**) en solución los resultados obtenidos muestran una reducción significativa en el número de master uniones en los grupos tratados con 20 y 65 μM de Pin ($p < 0,05$) (**Figura 34A**), mientras que en el número de segmentos y polígonos formados, no se observan diferencias respecto del control en ninguna de las concentraciones utilizadas ($p > 0,05$) (**Figura 34B y C**). Sin embargo, al evaluar la capacidad de formación de estructuras tubulares de la Pin cargada en la micropartícula de compuesto nPSi-βCD, se observa una disminución significativa de estructuras poligonales, segmentos y master uniones formadas en las concentraciones de nPSi-βCD+Pin 10 y 20 μM ($p < 0,05$) (**Figura 34**). La **figura 34 (A', B' y C')** muestra que en el grupo tratado con nPSi-βCD+Pin 65 μM no mostró diferencias respecto al control (vehículo). Por lo tanto, al comparar los grupos tratados con Pin en solución y microencapsulada, se evidencia una mejora de la actividad antiangiogénica, principalmente en las concentraciones más bajas utilizadas.

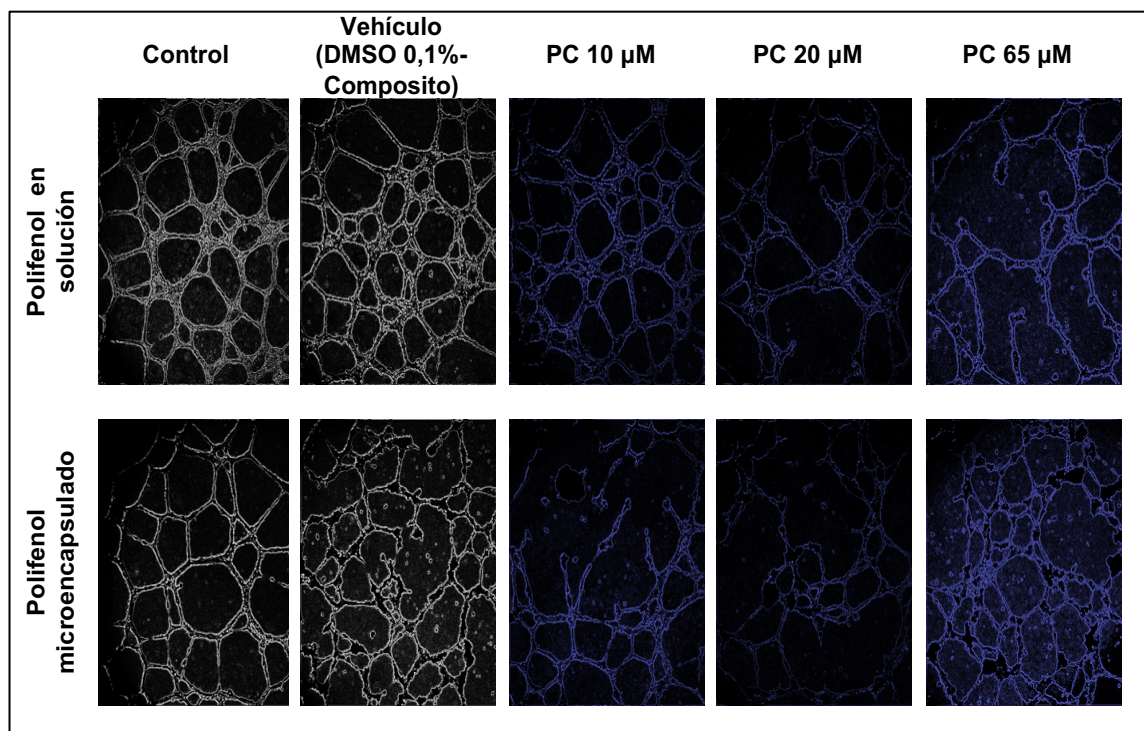


Figura 33. Efecto del tratamiento con pinocembrina en solución y cargada en la micropartícula de composito nPSi- β CD sobre la capacidad de HUVECs para formar estructuras tubulares en matrigel. Las imágenes fueron tomadas a las 8 horas y son representativas para cada grupo de tratamiento.

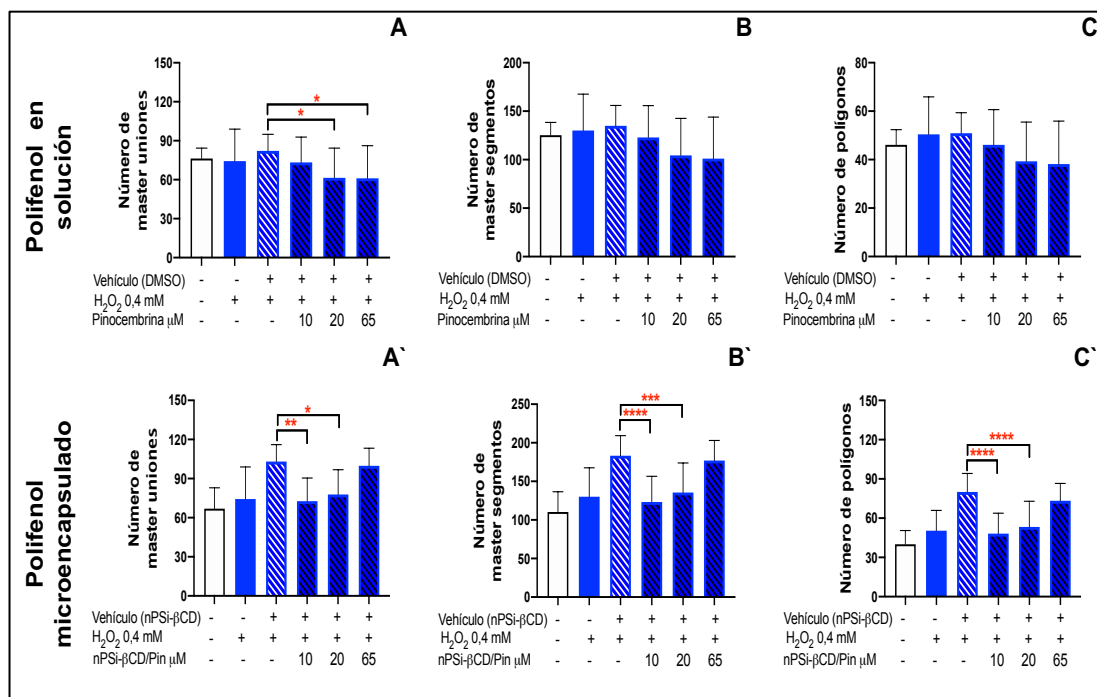


Figura 34. Efecto del tratamiento con pinocembrina en solución y cargada en la micropartícula de compuesto nPSi- β CD sobre la capacidad de HUVECs para formar estructuras tubulares en matrigel. (A-A') número de master uniones, (B-B') número de master segmentos y (C-C') número de polígonos formados. Las letras A, B y C corresponden al polifenol en solución (desnudo) mientras que A', B' y C' al polifenol microencapsulado. Se indican diferencias estadísticamente significativas en comparación con el tratamiento control (vehículo) (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, **** = $p < 0.0001$, $n=3$).

7.8 Capacidad antioxidante: remoción del radical libre ABTS

7.8.1 Capacidad antioxidante de polifenoles en solución

La capacidad de AC y Pin de remover el radical libre ABTS fue realizado para los polifenoles en solución (desnudos) y cargados dentro de la micropartícula de liberación controlada nPSi- β CD. En la **tabla 9** se muestran los resultados ambos los polifenoles en solución. En este contexto, para AC se encontró que hay inhibición la absorbancia de ABTS en todas las concentraciones testeadas y que el % de inhibición es directamente proporcional a la concentración del polifenol. Así, al comparar entre las tres concentraciones de AC utilizadas se estableció diferencias significativas ($p < 0,05$) (**Figura 35A**). Siendo la concentración de 50 μ M quien tuvo el menor % inhibición de

absorbancia de ABTS con $10,7 \pm 1,7$; mientras que 150 μM arrojó $24 \pm 2,7$ y 350 μM $51,8 \pm 5,3$ %, este último con el mayor porcentaje de inhibición. Ahora bien, para el caso de Pin también se observó inhibición de la absorbancia, sin embargo no hay diferencias entre las concentraciones más bajas utilizadas 10 y 20 μM con porcentajes de inhibición de $3,4 \pm 0,6$ y $3,4 \pm 0,9$, respectivamente ($p > 0,05$) (**Figura 35B**). En tanto que para 65 μM se observó un leve aumento del porcentaje de inhibición con valores de $4,8 \pm 1,3$. Por lo tanto, al comparar la capacidad antioxidante entre ambos polifenoles en solución se observa claramente que ácido cafeico tiene mucho más actividad scavenger que pinocembrina.

Tabla 9. Capacidad antioxidante de ácido cafeico y pinocembrina en solución. Los datos fueron expresados como porcentaje de inhibición de la absorbancia a 734 nm de longitud de onda del radical libre ABTS• y equivalentes de Trolox (mg/L) (media $\pm$ desviación estándar). Las letras minúsculas al lado de los valores de media y error estándar indican los resultados del análisis estadístico ($p < 0,05$, $n=9$).

<i>Polifenol en solución</i>	<i>Concentración (μM)</i>	<i>% inhibición de absorbancia ABTS</i>	<i>Equivalentes de Trolox (mg/L)</i>
Ácido cafeico	50	$10,7 \pm 1,7$ _a	$1,6 \pm 0,3$
	150	$24 \pm 2,7$ _b	$3,6 \pm 0,4$
	350	$51,8 \pm 5,3$ _c	$7,8 \pm 0,8$
Pinocembrina	10	$3,4 \pm 0,6$ _a	$0,5 \pm 0,1$
	20	$3,4 \pm 0,9$ _a	$0,5 \pm 0,1$
	65	$4,8 \pm 1,3$ _b	$0,7 \pm 0,2$

Por otra parte, al realizar la conversión a equivalentes de Trolox en mg/L, se observó que para AC la capacidad antioxidante va de media a alta y para Pin es muy baja en comparación al gold estándar (Trolox) (**Tabla 9**). En este sentido, AC a 350 μM , concentración más alta utilizada, alcanzó $7,8 \pm 0,8$ mg/L, lo que indica más de la mitad de la actividad descrita para Trolox. Sin embargo, en la mayor concentración utilizada para Pin (65 μM), los valores obtenidos no superó a 1 mg/L de Trolox.

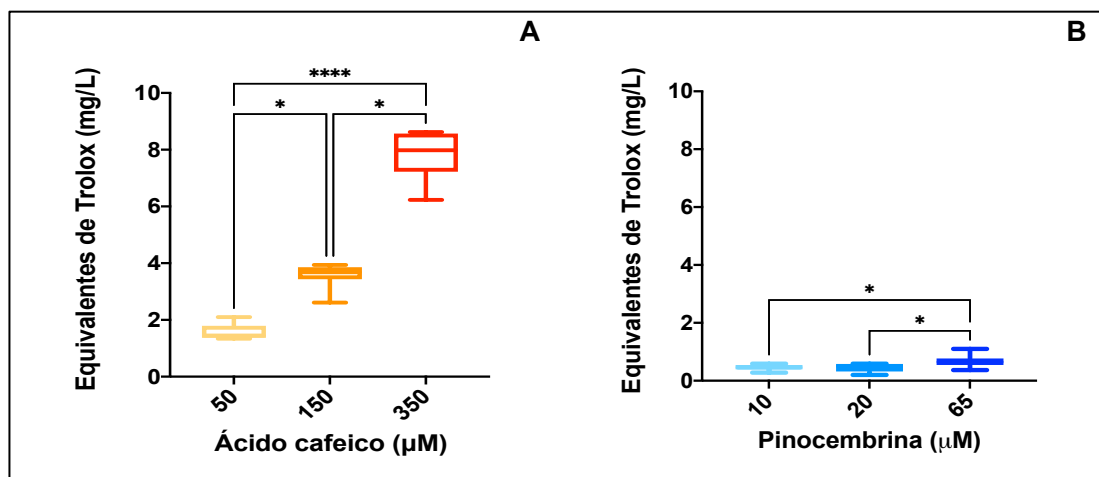


Figura 35. Capacidad antioxidante de ácido cafeico y pinocembrina en solución, expresada en equivalentes de Trolox (mg/L). La cantidad de asteriscos reflejan diferencias entre las concentraciones de los polifenoles testeadas. (* = $p < 0,05$; **** = $p < 0,0001$; $n=5$).

7.8.2 Cinética de capacidad antioxidante de polifenoles cargados en la micropartícula de compuesto nPSi-βCD

Cuando se evaluó la capacidad antioxidante de ambos polifenoles, ahora incorporados dentro de la micropartícula de liberación controlada nPSi-βCD, se observaron cambios en el % de inhibición de la absorbancia de ABTS principalmente para AC, en los diferentes tiempos evaluados (**Figura 36**). Lo anterior, indica la liberación paulatina del polifenol a través del tiempo lo que se ve reflejado en el aumento de la actividad antioxidante, encontrando las mayores diferencias entre las 4 y 8 horas en las concentraciones de 150 ($17,1 \pm 4,6 / 24,0 \pm 8,7$) y 350 µM ($23,6 \pm 5,7$ y $48,9 \pm 4,5$) ($p < 0,05$). No obstante, para las mismas concentraciones no se observó diferencias en los tiempos 0,5/4 hrs. y 4/24 hrs. En el caso de AC 50 µM se observan diferencias significativas en el % de inhibición obtenido entre 0,5/4 hrs. ($7,7 \pm 0,6 / 6,5 \pm 1,4$) y 4/24 hrs. ($6,5 \pm 1,4 / 9,0 \pm 3,5$) ($p < 0,05$), sin embargo, no hay cambios entre las 4/8 hrs. y 8/24 hrs.

Tabla 10. Cinética de la capacidad antioxidante de ácido cafeico y pinocembrina cargados en la micropartícula de composito nPSi-βCD. Los datos fueron expresados como porcentaje de inhibición de la absorbancia a 734 nm de longitud de onda del radical libre ABTS• (media ± desviación estándar) ($p < 0,05$; $n=9$).

<i>Polifenol microencapsulado</i>	<i>% inhibición absorbancia ABTS</i>				<i>Equivalentes Trolox (mg/L)</i>			
	0,5h	4h	8h	24h	0,5h	4h	8h	24h
AC 50	7,7 ± 0,6	6,5 ± 1,4	6,5 ± 0,6	9,0 ± 3,5	1,1 ± 0,1	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,1	1,3 ± 0,5
AC 150	17,8±4,6	17,1±4,6	24,0±8,7	24,7±8,9	2,6±0,7	2,5 ± 0,7	3,6± 1,3	3,7 ± 1,4
AC 350	24,3±5,7	23,6±5,7	48,9±4,5	47,0±4,3	3,6 ± 0,9	3,5 ± 0,9	7,4 ± 0,7	7,1 ± 0,7
Pin 10	6,7 ± 2,0	5,5 ± 0,6	3,2 ± 0,6	4,7 ± 0,5	0,1 ± 0,3	0,8 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,7 ± 0,1
Pin 20	6,0 ± 1,8	5,1 ± 0,3	3,9 ± 0,6	4,9 ± 0,3	0,9 ± 0,3	0,7 ± 0,0	0,5 ± 0,1	0,7 ± 0,1
Pin 65	6,4 ± 1,7	5,8 ± 0,4	3,9 ± 0,4	6,3 ± 1,6	0,9 ± 0,3	0,8 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,9 ± 0,2

Al realizar la conversión del % de inhibición de absorbancia de ABTS a equivalentes de Trolox en mg/L, se encontraron los mismos cambios descritos anteriormente en la actividad scavenger (**Tabla 10**). Además en la cinética realizada de la actividad antioxidante de los polifenoles dentro de la micropartícula nPSi-βCD se observó igual comportamiento que los polifenoles en solución. Es decir, nPSi-βCD/AC alcanza más de mitad de la actividad de Trolox, lo que se traduce en una mayor capacidad antioxidante que nPSi-βCD/Pin, la cual presenta una actividad muy reducida. Por lo tanto, no hay diferencias entre los polifenoles en solución y cargados en la micropartícula de composito nPSi-βCD.

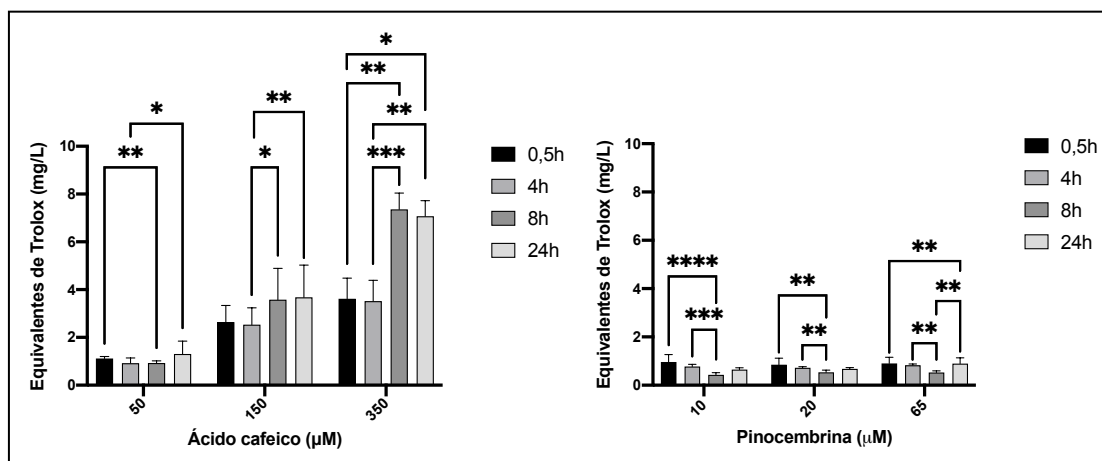


Figura 36. Cinética de la capacidad antioxidante de ácido cafeico y pinocembrina cargados en la micropartícula de composito nPSi-βCD, expresada en equivalentes de Trolox (mg/L). La cantidad de asteriscos reflejan diferencias entre las concentraciones de los polifenoles microencapsulados testeadas (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$; n=5).

7.9 Evaluación de la expresión génica de Nrf2, Keap1, Akt, Cat, Glut-P, Hmox1, Gclc y Gclm

7.9.1 Efecto del tratamiento con ácido cafeico y pinocembrina en solución sobre la expresión de genes Nrf2, Keap1, Akt, Cat, Glut-P, Hmox-1, Gclc y Gclm relacionados a la vía antioxidante

Para evaluar el efecto del tratamiento con ácido cafeico y pinocembrina en solución sobre la expresión de genes relacionados a la vía antioxidante, se obtuvieron las curvas estándar y eficiencias para cada partidor utilizado. Los resultados mostraron que las eficiencias varían en un rango entre 90-106% (**Ver anexo 10.4 y 10.5**). Por otro lado, a evaluar que gen(es) normalizador(es) utilizar, los resultados arrojaron que los mejores genes fueron GADPH y RPL30.

Al comparar cambios en la expresión de genes involucrados en la respuesta antioxidante entre el grupo control v/s tratados con ácido cafeico en solución a diferentes concentraciones, podemos observar diferencias en los Nrf2, Keap1, Akt, Hmox-1 y Gclc (**Figura 37**). Los resultados mostraron que el tratamiento con AC 50 µM aumentó significativamente la expresión del gen Nrf2 ($p < 0,05$), mientras que a mayores

concentraciones no hubo diferencias respecto del control (**Figura 37A**). Para el caso del gen Keap1 (**Figura 37B**) sólo se observó disminución de la expresión a una concentración de AC 150 μM ($p < 0,05$). Con respecto a la expresión del gen Akt (**Figura 37C**), se encontró que el tratamiento con AC incrementa su expresión de manera proporcional a la concentración, sin embargo sólo se observó diferencia significativa en el grupo tratado con AC 350 μM ($p < 0,001$). Finalmente, en la **figura 37F y G** se presentan los resultados para Hmox-1y Gclc, los cuales mostraron aumento del nivel de expresión de ambos genes a concentraciones de 50 y 350 μM , siendo para esta última significativa ($p < 0,05$). Por otro lado, para los genes Cat, Glut-P y Gclm no se observan cambios significativos en la expresión génica asociados a los tratamientos (**Figura 37D, E y H**).

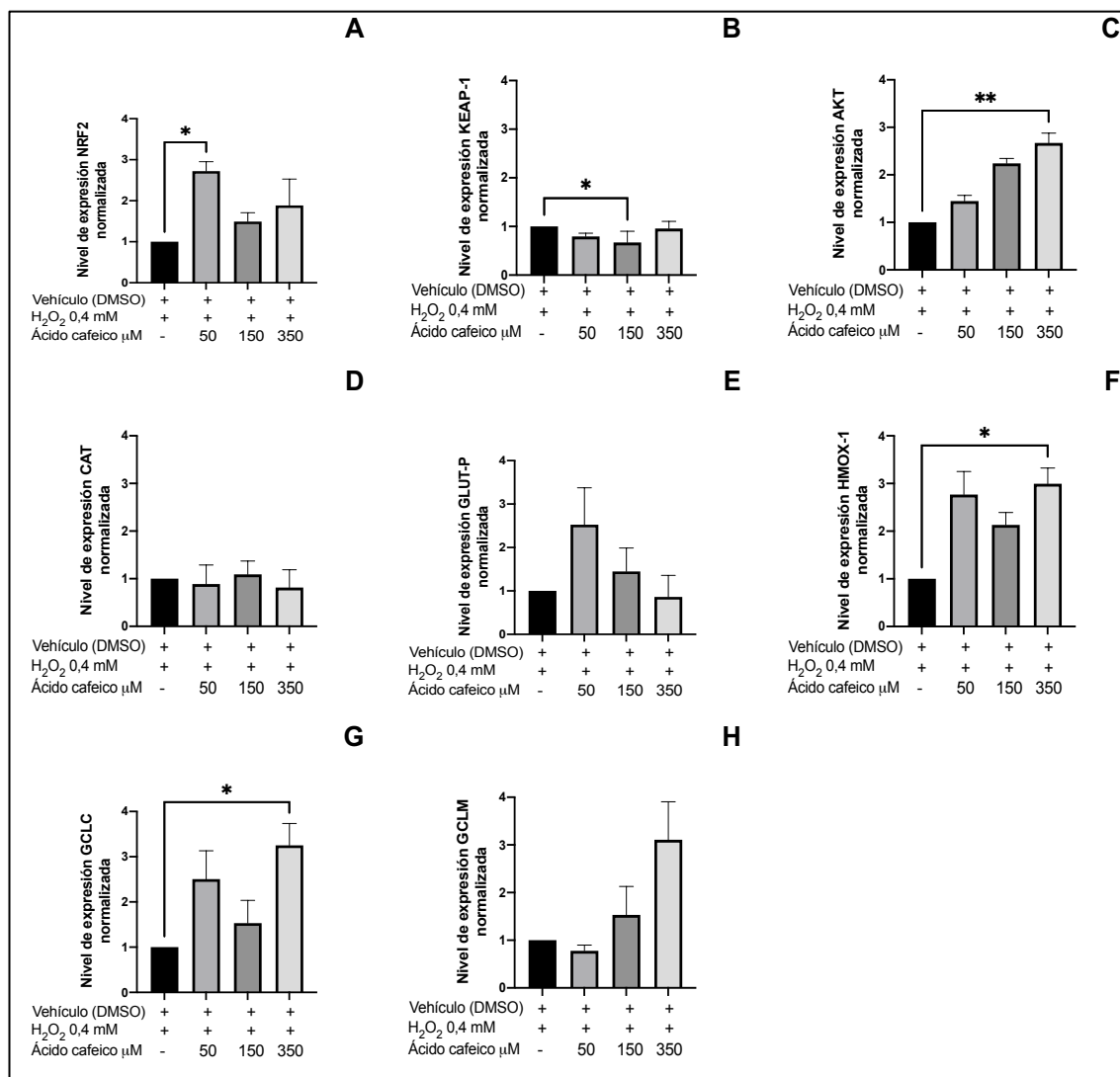


Figura 37. Efecto del tratamiento con ácido cafeico sobre en la expresión de genes relacionados a la vía antioxidante. HUVECs fueron estimuladas con 0,4 mM de H₂O₂ y tratadas con ácido cafeico a concentraciones de 50, 150 y 350 μM por 8 horas. (A) Nrf2, (B) Keap-1, (C) Akt, (D) Cat, (E) Glut-P, (F) Hmox-1 (G) Gclc y (H) Gclm. Los datos fueron normalizados respecto a RPL-30 y GAPDH. Las barras representan la expresión media para cada grupo ± desviación estándar. La cantidad de asteriscos reflejan diferencias entre control (vehículo) v/s tratamientos (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; $n=3$).

En contraste con lo encontrado para AC, el tratamiento con Pin en solución sólo generó cambios en la expresión de los genes Akt y Hmox-1 (**Figura 38**). En el primer caso se observó una disminución del nivel la expresión proporcional a la dosis de Pin utilizada, sin embargo, esta fue significativa a 65 μM ($p < 0,01$) (**Figura 38C**). Mientras que para Hmox-1 se encontró que el tratamiento con Pin 10 μM condujo al aumento de

la expresión de forma significativa ($p < 0,05$) (**Figura 38F**), en tanto que para 20 y 65 μM no se observaron cambios cuando fueron comparados contra el control (vehículo). Lo mismo fue observado para los genes Nrf2, Keap-1, Cat, Glut-P, Gclc y Gclm en donde no se encontraron cambios en los niveles de expresión (**Figura 38A, B, D, E, G y H**).

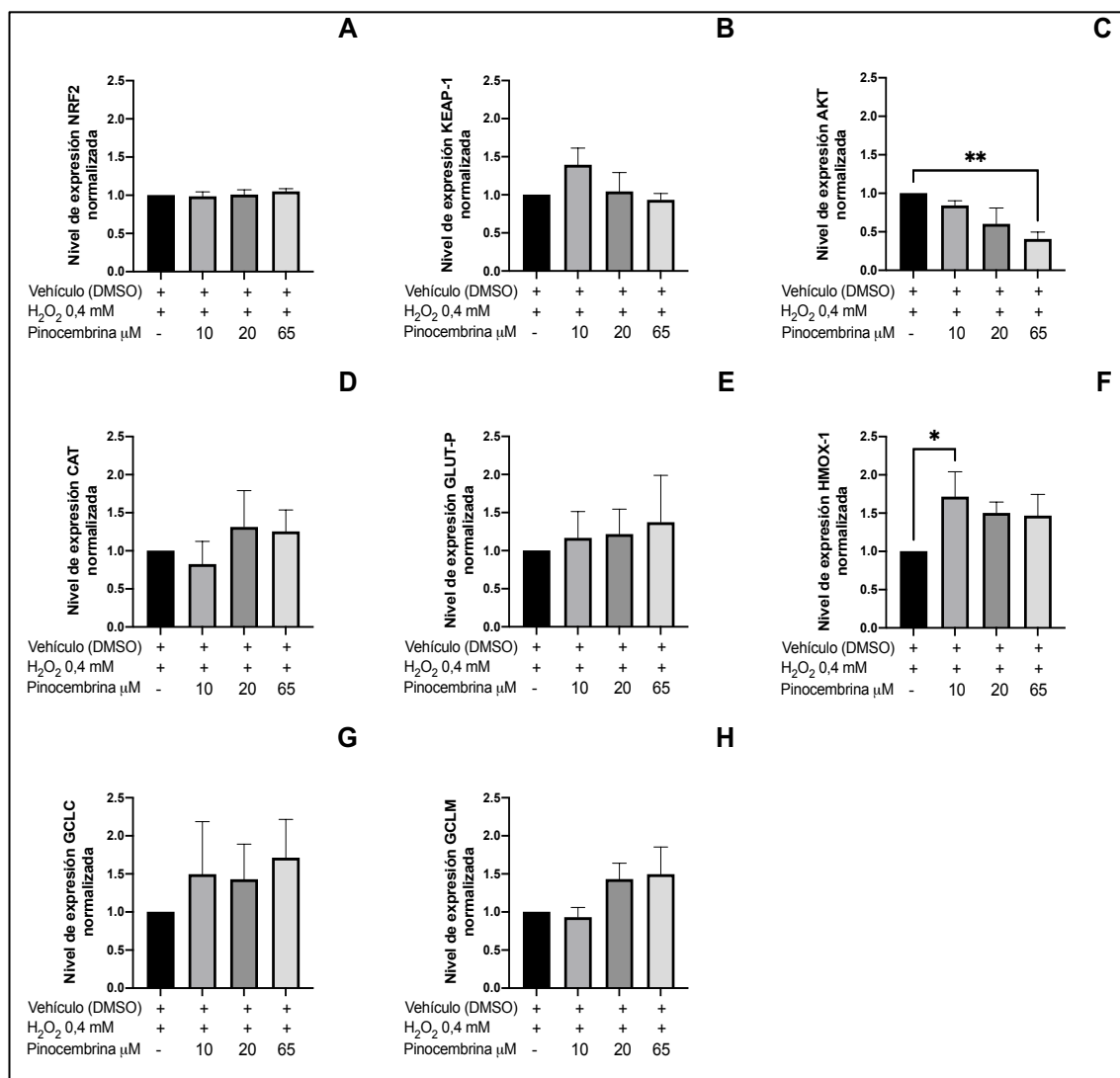


Figura 38. Efecto del tratamiento con pinocembrina sobre en la expresión de genes relacionados a la vía antioxidante. HUVECs fueron estimuladas con 0,4 mM de H₂O₂ y tratadas con pinocembrina a concentraciones de 10, 20 y 65 μM por 8 horas. (A) Nrf2, (B) Keap-1, (C) Akt, (D) Cat, (E) Glut-P, (F) Hmox-1 (G) Gclc y (H) Gclm. Los datos fueron normalizados respecto a RPL-30 y GAPDH. Las barras representan la expresión media para cada grupo $\pm$ desviación estándar. La cantidad de asteriscos reflejan diferencias entre vehículo v/d tratamientos (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; $n=3$).

7.9.2 Efecto del tratamiento con ácido cafeico y pinocembrina cargados en la micropartícula de compuesto nPSi-βCD sobre la expresión de genes Nrf2, Keap1, Akt, Cat, Glut-P, Hmox1, Gclc y Gclm relacionados a la vía antioxidante

Se evaluó el efecto de la microencapsulación de AC y Pin sobre cambios en la expresión génica de células HUVEC tratadas con la micropartícula nPSi-βCD+polifenol. Dentro de los resultados obtenidos para nPSi-βCD/AC (**Figura 39**) se observa una reducción de la expresión del gen Keap-1 en el grupo tratado con nPSi-βCD/AC 50 y 350 μM ($p < 0,05$) (**Figura 39B**), mientras que para nPSi-βCD/AC 150 μM también se observó una disminución, pero esta no fue significativa. Para el caso de Akt y Glut-P (**Figura 39C y E**) se encontró que en ambos genes hay una reducción en el nivel de expresión, principalmente en el grupo tratado con nPSi-βCD/AC 50 μM ($p < 0,05$), en contraste con los tratados con nPSi-βCD/AC 150 y 350 μM en donde se observó un incremento de la expresión, la cual no fue significativa. Por último, no se encontró diferencias en la expresión génica de Nrf2, Cat, Hmox-1, Gclc y Gclm (**Figura A, D, F, G y H**).

Por otra parte, para la micropartícula de compuesto nPSi-βCD/Pin los resultados mostraron que no hubo cambios significativos en la expresión de genes Nrf2, Keap-1, Cat y Gclm (**Figura 40A, B, D y H**). Mientras que para el gen Akt, se observó una disminución significativa de la expresión génica sólo en el grupo tratado con nPSi-βCD/Pin 10 μM (**Figura 40C**) ($p < 0,05$). Los mismos resultados fueron encontrados para el gen Gclc como se muestra en la **figura 40G** ($p < 0,05$), sin embargo, para nPSi-βCD/Pin 20 y 65 μM se observó el efecto opuesto, ya que la expresión tiende a ir aumentando sin que llegue a ser significativo. Con respecto al gen Glut-P el tratamiento con nPSi-βCD/Pin generó una disminución significativa de la expresión en el grupo tratado con nPSi-βCD/Pin 65 μM ($p < 0,01$), no obstante para las otras concentraciones utilizadas no hubo diferencias (**Figura 40E**). Finalmente, también se observó reducción de la expresión del gen Hmox-1 sólo para el grupo tratado con nPSi-βCD/Pin 20 μM (**Figura 40F**). Por lo tanto, estos resultados demuestran que no existen cambios en la expresión de genes relacionados a la vía antioxidante en células HUVECs tratadas con los polifenoles incorporados en la micropartícula de compuesto nPSi-βCD.

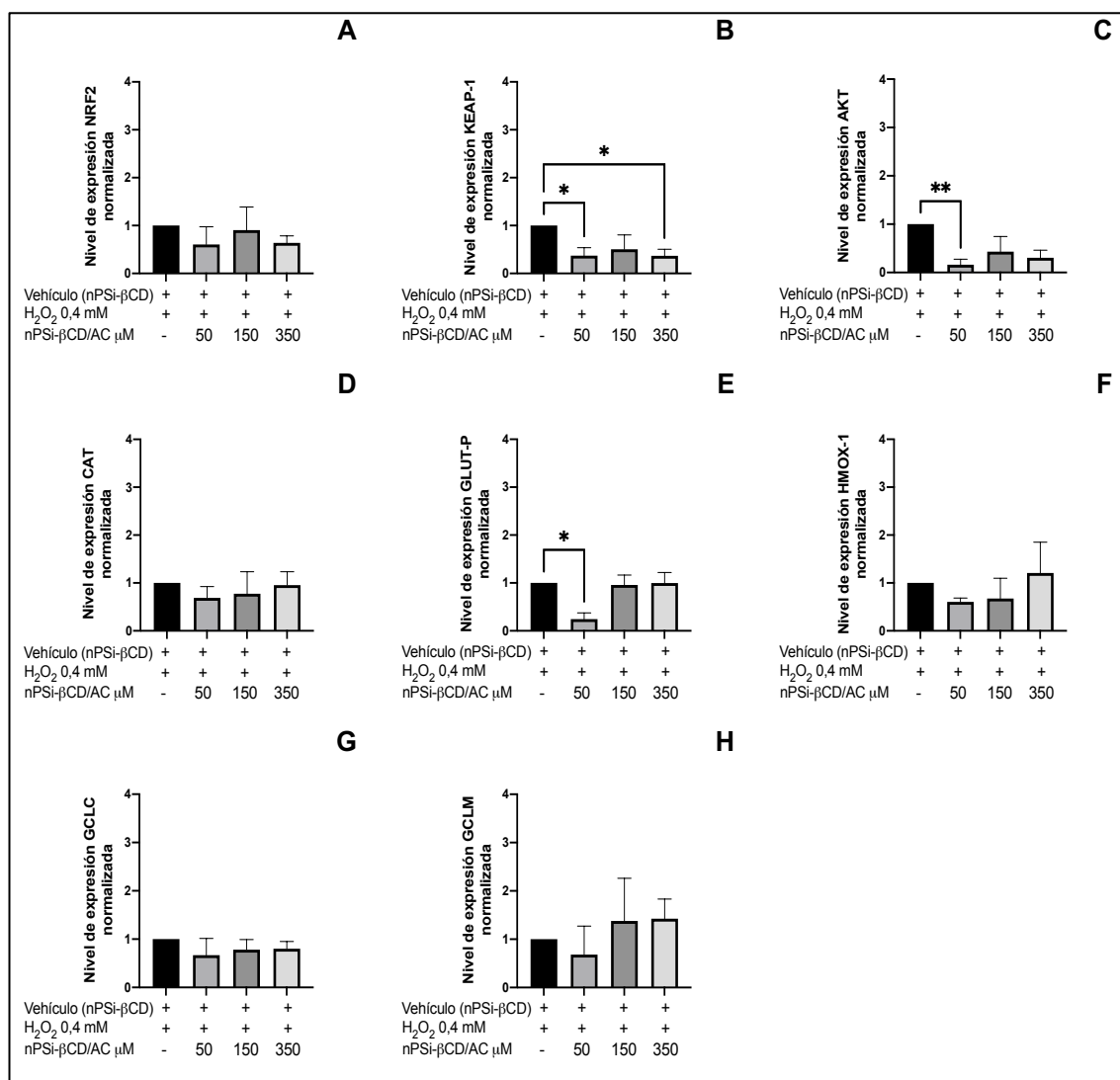


Figura 39. Efecto del tratamiento con ácido cafeico cargado en la micropartícula de composito nPSi-βCD sobre en la expresión de genes relacionados a la vía antioxidante. HUVECs fueron estimuladas con 0,4 mM de H_2O_2 y tratadas con la micropartícula nPSi-βCD/AC a concentraciones de 50, 150 y 350 μM por 8 horas. (A) Nrf2, (B) Keap-1, (C) Akt, (D) Cat, (E) Glut-P, (F) Hmox-1 (G) Gclc y (H) Gclm. Los datos fueron normalizados respecto a RPL-30 y GAPDH. Las barras representan la expresión media para cada grupo $\pm$ desviación estándar. La cantidad de asteriscos reflejan diferencias entre vehículo v/d tratamientos (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; $n=3$).

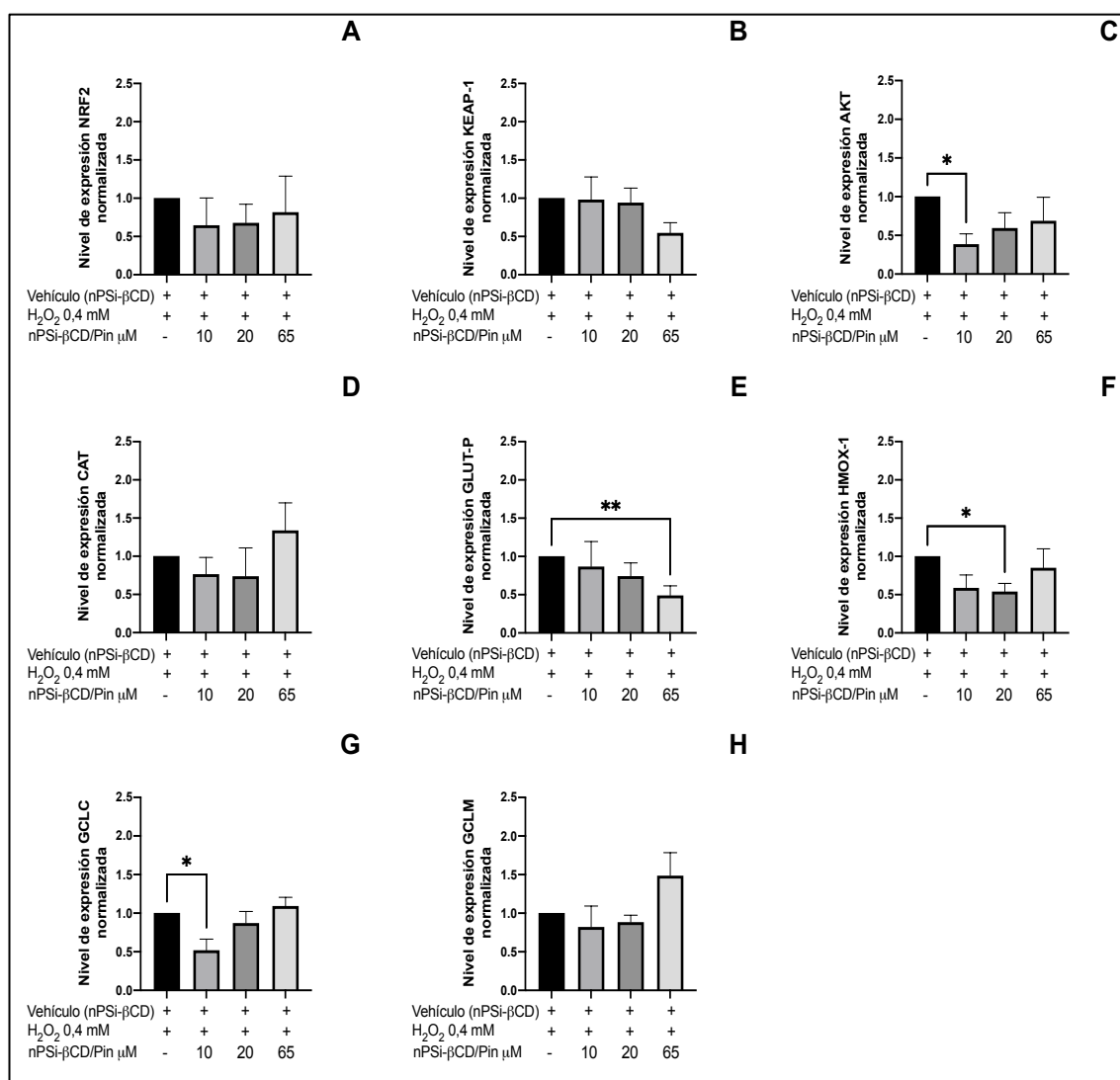


Figura 40. Efecto del tratamiento con pinocembrina cargada en la micropartícula de compuesto nPSi-βCD sobre en la expresión de genes relacionados a la vía antioxidante. HUVECs fueron estimuladas con 0,4 mM de H₂O₂ y tratadas con la micropartícula de compuesto nPSi-βCD/Pin a concentraciones de 10, 20 y 65 μM por 8 horas. (A) Nrf2, (B) Keap-1, (C) Akt, (D) Cat, (E) Glut-P, (F) Hmox-1 (G) Gclc y (H) Gclm. Los datos fueron normalizados respecto a RPL-30 y GAPDH. Las barras representan la expresión media para cada grupo ± desviación estándar. La cantidad de asteriscos reflejan diferencias entre vehículo v/s tratamientos (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; $n=3$).

7.10 Evaluación de la expresión proteica de Nrf2, Keap1 y Akt, Erk 1/2 total y fosforilada

7.10.1 Efecto del tratamiento con ácido cafeico y pinocembrina en solución y cargado en la micropartícula de compuesto nPSi-βCD sobre la expresión proteica de Nrf2, Keap1, Akt y Erk 1/2 fracción total y fosforilada.

Se evaluó el efecto del tratamiento con AC en solución e incorporado a la micropartícula de compuesto nPSi-βCD, sobre cambios en la expresión proteica de células HUVECs (**Figura 41**). Como resultado se obtuvo que en ambos tratamientos (AC solución v/s micropencapsulado) no se observó expresión de las proteínas Nrf2 y Keap-1 (**Figura 41A y B**), mientras que para las proteínas Akt y Erk 1/2 fracción total y fosforilada, tampoco se reportaron cambios significativos en el nivel de expresión (**Figura 41C-D y 42E-L**).

Por otro lado, para células HUVECs tratadas con Pin en solución y microencapsulada, los resultados muestran que no hubo cambios significativos en la expresión de las proteínas Nrf2 y Keap-1 (**Figura 43A y B**). Lo mismo se observó para el caso de las proteínas Akt y Erk 1/2 fracción total y fosforilada para el tratamiento con diferentes concentraciones de Pin en solución (**Figura 43C**). Mientras que para el tratamiento con la micropartícula de compuesto nPSi-βCD+Pin (**Figura 43D**), se observaron cambios significativos sólo en la fracción fosforilada de Akt y Erk 1/2 ($p < 0,05$) para las concentraciones de 10 y 65 μM, respectivamente (**Figura 44J y K**).

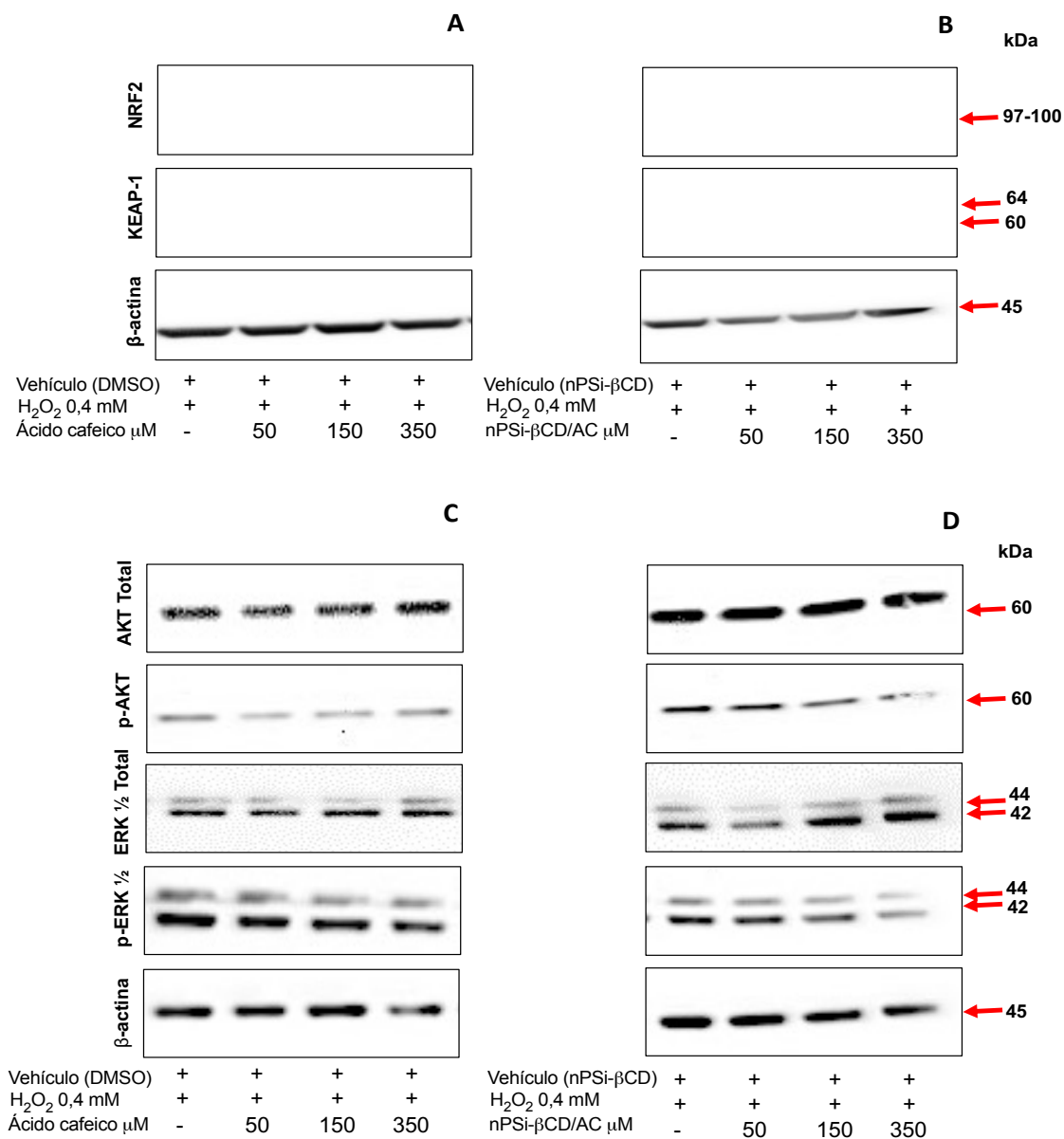


Figura 41. Efecto del tratamiento con ácido cafeico en solución y cargado en la micropartícula de compuesto nPSi- β CD, sobre en la expresión de proteínas relacionadas a la vía antioxidante y angiogénica. HUVECs fueron estimuladas con 0,4 mM de H_2O_2 y tratadas con la micropartícula de compuesto nPSi- β CD/AC a concentraciones de 50, 150 y 350 μ M por 8 horas. (A y C) Ácido cafeico en solución (B y D) Micropartícula de compuesto nPSi- β CD/AC. Los datos fueron normalizados respecto a RPL-30 y GAPDH. Las barras representan la expresión media para cada grupo $\pm$ desviación estándar. La cantidad de asteriscos reflejan diferencias entre vehículo v/s tratamientos (* = $p < 0,05$; $n=3$).

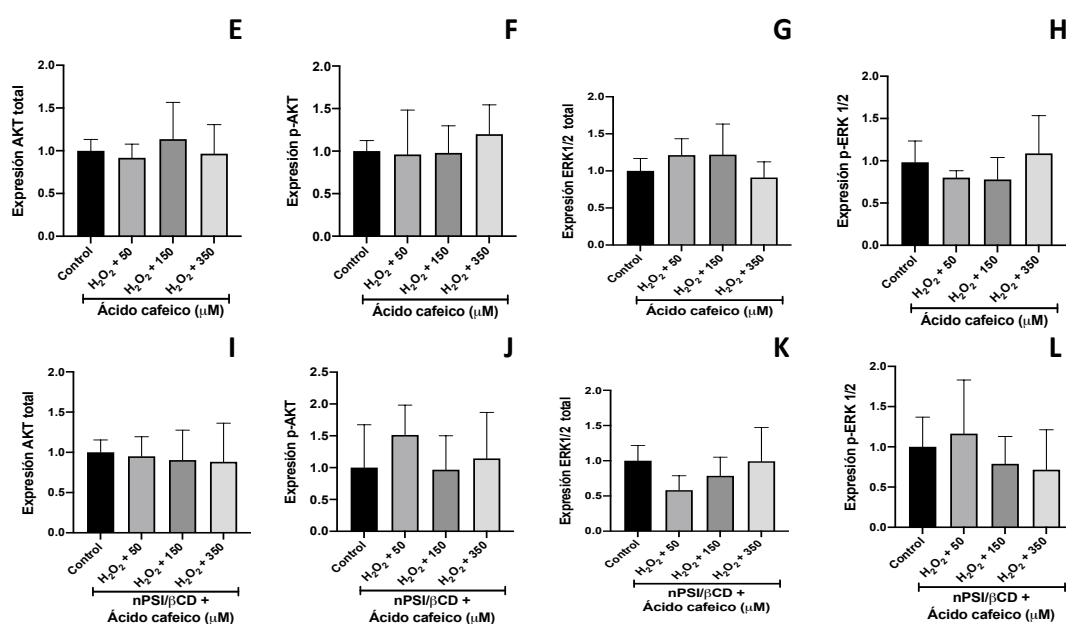


Figura 42. Representación gráfica del efecto del tratamiento con ácido cafeico en solución y cargado en la micropartícula de compuesto nPSi-βCD, sobre en la expresión de proteínas relacionadas a la vía angiogénica. HUVECs fueron estimuladas con 0,4 mM de H₂O₂ y tratadas con la micropartícula de compuesto nPSi-βCD/Ac a concentraciones de 50, 150 y 350 μM por 8 horas. (E y I) AKT total, (F y J) p-AKT, (G y K) ERK 1/2 total, (H y L) p-ERK 1/2. Los datos fueron normalizados respecto a RPL-30 y GAPDH. Las barras representan la expresión media para cada grupo ± desviación estándar. La cantidad de asteriscos reflejan diferencias entre vehículo v/s tratamientos (* = $p < 0,05$; $n=3$).

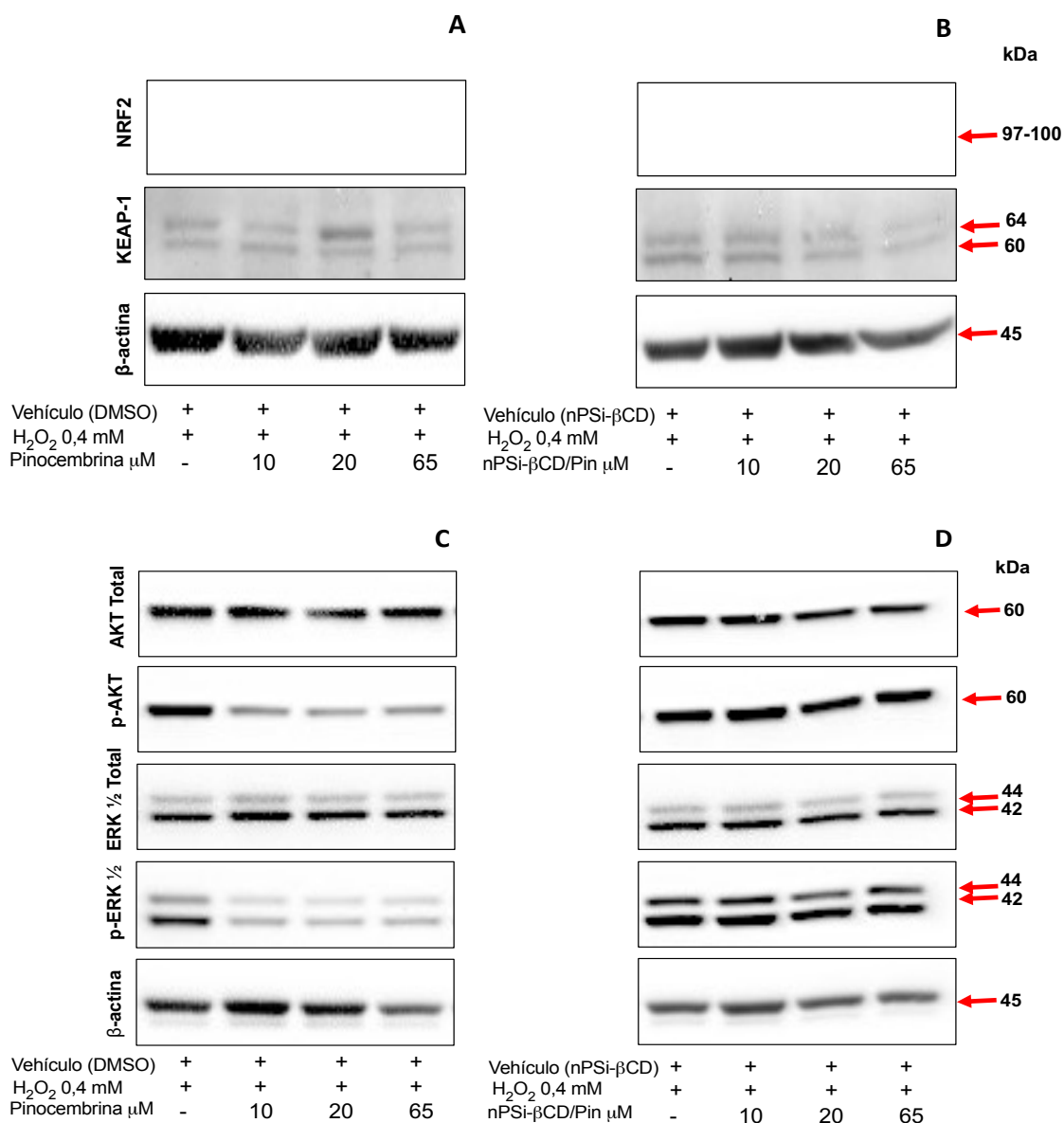


Figura 43. Efecto del tratamiento con pinocembrina en solución y cargada en la micropartícula de compuesto nPSi-βCD sobre en la expresión de proteínas relacionadas a la vía antioxidante y angiogénica. HUVECs fueron estimuladas con 0,4 mM de H₂O₂ y tratadas con la micropartícula de compuesto nPSi-βCD/Pin a concentraciones de 10, 20 y 65 μM por 8 horas. (A y C) Pinocembrina en solución (B y D) Micropartícula de compuesto nPSi-βCD/Pin. Los datos fueron normalizados respecto a RPL-30 y GAPDH. Las barras representan la expresión media para cada grupo ± desviación estándar. La cantidad de asteriscos reflejan diferencias entre vehículo v/s tratamientos (* = $p < 0,05$; $n=3$).

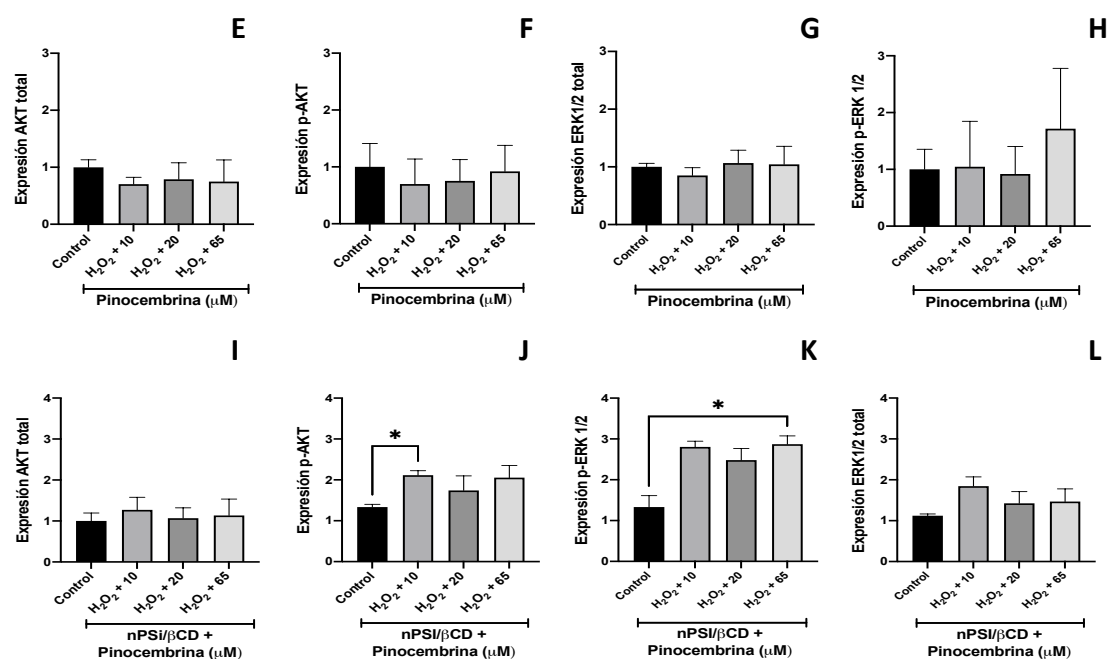


Figura 44. Representación gráfica del efecto del tratamiento con pinocembrina en solución y cargada en la micropartícula de compuesto nPSi-βCD sobre en la expresión de proteínas relacionadas a la vía angiogénica. HUVECs fueron estimuladas con 0,4 mM de H₂O₂ y tratadas con la micropartícula de compuesto nPSi-βCD/Pin a concentraciones de 10, 20 y 65 μM por 8 horas. (E y I) AKT total, (F y J) p-AKT, (G y K) ERK 1/2 total, (H y L) p-ARK 1/2. Los datos fueron normalizados respecto a RPL-30 y GAPDH. Las barras representan la expresión media para cada grupo ± desviación estándar. La cantidad de asteriscos reflejan diferencias entre vehículo v/s tratamientos (* = $p < 0,05$; $n=3$).

8. DISCUSIÓN

La aterosclerosis es una enfermedad silenciosa y multifactorial, cuyo progreso desencadena en la aparición de patologías cardiovasculares agudas y severas que generan altos índices de discapacidad y mortalidad a nivel mundial. Los principales factores de riesgo asociados al inicio y progresión son hipercolesterolemia e hipertensión arterial, patologías que conducen a generar cambios y alteraciones en la pared arterial de grandes vasos. El progreso de la ATE conlleva al estrechamiento u obstrucción del lumen vascular causado por el engrosamiento de la capa intermedia de las arterias debido a la acumulación de lípidos (Li et al., 2014), migración y proliferación de diferentes tipos celulares formando lo que se conoce como placa de ateroma. La angiogénesis constituye un proceso relevante en la progresión de la lesión aterosclerótica y representa una diana farmacológica contra enfermedades que se caracterizan por una mayor proliferación de nuevos vasos sanguíneos. Este proceso se ve estimulado principalmente como consecuencia de la reducción de la disponibilidad de oxígeno causado por un aumento en la demanda metabólica al interior de la placa, generando nuevos vasos débiles y muy susceptibles a romperse.

Diversos autores han aislado y estudiado diferentes polifenoles para los cuales se han descrito un gran número de propiedades farmacológicas, entre ellas antiangiogénica (Pandey & Rizvi, 2009). Sin embargo, el principal problema asociado a su utilización es que presentan muy baja absorción a nivel gastrointestinal, lo que a su vez se traduce en que estos no alcanzan una concentración efectiva en sangre para ejercer una acción biológica a nivel celular. Frente a esta problemática surge la alternativa de incorporar estas moléculas dentro de materiales compatibles, favoreciendo su metabolización y transporte en el cuerpo llegando de esta forma al sitio de acción deseado. Estos materiales pueden ser clasificados en distintas categorías de acuerdo a su forma, propiedades fisicoquímicas y a los compuestos utilizados para su síntesis, siendo ejemplo de esto liposomas, dendrímeros, nanotubos, miscelas, biopolímeros, nanocápsulas y microcápsulas, entre otros.

Así, a partir de la evidencia disponible el objetivo general de este estudio fue obtener micropartículas de nPSi- β CD cargadas con ácido cafeico y pinocembrina, principales constituyentes bioactivos de propóleos chileno, y evaluar in vitro el efecto de la microencapsulación sobre la actividad antiangiogénica de los polifenoles.

Caracterización fisicoquímica de las micropartículas nPSi, nPSi/Qui y nPSi-βCD

El silicio es un material versátil que puede ser sometido a diversos procesos químicos como por ejemplo oxidación con la finalidad de obtener funcionalidad, además de permitir la incorporación de otros compuestos como polímeros, para mejorar tanto la carga como la liberación controlada de fármacos (Maniya *et al.*, 2016).

En este sentido, la síntesis de las micropartículas nPSi, nPSi/Qui y de composito nPSi-βCD se llevó a cabo a través de atracción electrostática de cargas opuestas, proceso el cual fue monitorizado fisicoquímicamente con el fin de evaluar la correcta obtención y funcionalidad del biomaterial utilizado. Los resultados muestran que el nPSi arrojó un valor potencial zeta negativo (-29.06 ± 0.06 mV), lo que se correlaciona con la presencia de grupos silanol cargados negativamente los cuales se producen por la oxidación química con H_2O_2 (Wu & Lin, 2013). En una segunda etapa, la oxidación del nPSi permitió incorporar Qui, la cual mostró valores positivos (16.5 ± 0.6 mV), esto se debe a que el injerto con quitosana generaría una rica superficie rica en aminas (Meraz *et al.*, 2016). Finalmente la obtención de la micropartícula se composito nPSi-βCD ocurrió producto de la polimerización de nPSi/Qui con β-ciclodextrina, la cual corresponde a un polímero biocompatible flexible y blando ampliamente utilizado para la administración de fármacos (Lian *et al.*, 2016). Para este caso se observó un potencial zeta marcadamente negativo (-39.8 ± 1.73 mV), lo que concuerda con el valor obtenido por la presencia de la molécula polimérica βCD ($-28,2 \pm 9$ mV), la cual presenta una cavidad cuya superficie exterior es hidrófila debido a la presencia de grupos C-OH.

Por su parte, el análisis químico a través de ATR-FTIR mostró un pico agudo de transmitancia para nPSi que corresponde al modo de estiramiento Si-O-Si (Hernandez-Montelongo *et al.*, 2014) y algunas bandas débiles relacionadas con -OySi-Hx y SiOH, una banda de estiramiento O-H de SiOH (Hernandez-Montelongo *et al.*, 2014), además de una banda de absorbancia de H_2O (McIntosh *et al.*, 2017). Todos estos grupos funcionales detectados están de acuerdo con la oxidación química de nPSi a través de H_2O_2 y reportados previamente en la literatura lo que es indicativo de una buena síntesis. El espectro de nPSi/Qui presentó dos bandas débiles de N-H y amida III detectado a 1408 and 1320–1346 cm^{-1} , respectivamente (**figura 13C**), y los mismos grupos funcionales descritos previamente para el nPSi (Si-O-Si, -OySi-Hx y SiOH) (49-51). Las bandas detectadas se encuentran relacionadas con las cadenas de poliamino-sacáridos presentes en la Qui, la cual fue usada como puente entre el polímero de quitosana y las micropartículas nPSi. Finalmente, para la micropartícula de nPSi-βCD,

bandas correspondientes al espectro de β CD nativa fueron observadas: estiramiento del enlace C–OH (1021 cm^{-1}) (Hernandez-Montelongo *et al.*, 2014), C–O–C (1150 cm^{-1}), H_2O (1630 cm^{-1}), estiramiento asimétrico de CH_2 (2930 cm^{-1}) y de O–H de grupos hidroxilo. Adicionalmente mostró una banda extra (1721 cm^{-1}) que corresponden a grupos C=O, generados durante la polimerización lograda entre β -ciclodextrina y ácido cítrico (Hernandez-Montelongo *et al.*, 2014).

En cuanto al análisis morfológico, tamaño y composición elemental de los diferentes biomateriales incorporados en la síntesis, imágenes SEM fueron producidas. En este contexto, nPSi y nPSi-Qui presentaron un tamaño promedio de $2.0\text{--}2.5\text{ }\mu\text{m}$, con formas irregulares y una superficie rugosa y muy porosa ($75 \pm 5\%$) debido a la presencia de poros columnares (**figura 14A1-A4**). Para las micropartículas de composito nPSi- β CD también se observó una forma irregular, pero con una apariencia más suave y con un leve aumento de tamaño ($14\text{ }\mu\text{m}$), además de pliegues producidos por la polimerización con β CD/ácido cítrico (**figura 14A5 y 6**). El aumento en el tamaño de micropartícula podría explicarse debido a que las partículas pequeñas se aglomeraron durante la polimerización formando partículas más altas. Esto concuerda con el trabajo de Salonen *et al.*, (2005) el que reportó una distribución de tamaño similar para este tipo de partículas utilizadas como sistema de administración de fármacos por vía oral. Con respecto a la composición elemental de nPSi, se encontró Si y O debido a la oxidación realizada por H_2O_2 además de C la cual fue considerablemente alta, lo que pudiera ser indicativo de contaminación muy probablemente durante la síntesis. Para nPSi-Qui no se detectó nitrógeno, aún cuando se esperaba encontrar debido a la presencia de grupos aminos de la Qui. Este resultado podría explicarse porque la quitosana incorporada probablemente era una capa superficial y la señal N no fue lo suficientemente fuerte como para ser detectada por la técnica EDX. Sin embargo, la relación C/Si aumentó al doble (0.76 ± 0.2 v/s 1.5 ± 0.3) debido al incorporación del polímero (Perruchot *et al.*, 2001). Con respecto a la micropartícula de nPSi- β CD se observó un aumento importante de la señal C (C/Si= 17.4 ± 8) debido a la polimerización in situ con β -ciclodextrina y ácido cítrico. También se detectaron trazas de los catalizadores Sodio (Na) y Fósforo (P).

Por otra parte también se caracterizó a las micropartículas de composito nPSi- β CD cargadas con los polifenoles. En primer lugar, los resultados muestran que el potencial zeta de nPSi- β CD fue reducido después de la adición de polifenoles; nPSi- β CD/CA y nPSi- β CD/Pin presentaron potencial zeta más bajo que nPSi- β CD, ($5,5$ y $10,4$ mV, respectivamente). En el análisis de ATR-FTIR, el espectro de nPSi- β CD/CA y nPSi-

β CD/Pin muestran los mismos grupos funcionales que nPSi- β CD. No obstante, tanto nPSi- β CD/CA como nPSi- β CD/Pin mostraron dos **bandas adicionales que están asociadas a la incorporación de ambos polifenoles**: β (CH) y γ (CH) a 1187 y 940 cm^{-1} , respectivamente.

Respecto de la morfología, los resultados muestran que tanto nPSi- β CD/CA como nPSi- β CD/Pin no presentan cambios significativos en comparación con nPSi- β CD. La superficie de ambas micropartículas cargadas exhiben una apariencia más suave y los mismos pliegues producidos por la polimerización. Sin embargo, el tamaño de las micropartículas cargadas fue mayor en nPSi- β CD: ~ 19 y ~ 22 μm , respectivamente. Este hallazgo podría explicarse debido a que los polifenoles están formados por uno o más anillos fenólicos, los cuales son altamente hidrofóbicos, lo que podría tender a aglomerar partículas más pequeñas. En el caso de Pin esta presenta 3 anillos fenólicos lo que lo hace más hidrofóbico que AC el cual posee sólo uno (Heleno *et al.*, 2015), esto podría generar más agregación y, por tanto, diferencias en el tamaño entre las micropartículas. Por otro lado, de acuerdo al análisis químico realizado (EDX), nPSi- β CD/CA and nPSi- β CD/Pin no presentan más trazas de los catalizadores Sodio y Fósforo, y en cuanto a la razón C/Si, esta incrementó considerablemente (nPSi- β CD/CA: 88.75 ± 22.2 , nPSi- β CD/Pin: 105.7 ± 30.5) respecto a nPSi- β CD (17.4 ± 8).

Para determinar el grado de funcionalización del polímero Qui y β CD integrado en nPSi, se realizaron análisis por TGA. Los resultados muestran que nPSi prácticamente no presentó degradación, en tanto que nPSi-Who mostró una leve descomposición cercana al 3%. Este hallazgo es concordante con resultados de la caracterización realizada previamente, que sugiere que el injerto de Qui fue solo superficialmente. La descomposición de β CD fue claramente apreciable. En la primera etapa correspondió al nivel de agua absorbida ($\sim 10,5\%$), mientras que la segunda etapa, que comienza a 310°C y concluye a 350°C , se encuentra relacionada con la fusión, descomposición y conversión en carbón de las unidades de glucosa de las moléculas de β CD (Skiba & Lahiani-Skiba, 2013). Ahora bien, en la micropartícula de nPSi- β CD el fenómeno fue gradual, debido a que la estructura 3D del polímero β CD es más fuerte. Además se pudo establecer que el componente que estaba en mayor cantidad en la micropartícula de composito correspondía al polímero de β CD (62%), lo que refleja que además de las interacciones electrostáticas mostradas por potencial zeta, la porosidad de las muestras también permitió que fuese como un anclaje para la película polimérica.

Carga, liberación de polifenoles y modelos matemáticos involucrados

Una de las ventajas que presenta este tipo de micropartículas es que posee una buena capacidad de carga debido a la gran superficie que presenta y además permite una liberación controlada de la molécula/fármaco cargado. En este sentido la eficiencia y capacidad de carga de polifenoles AC y Pin fue determinada a través de espectroscopia UV-Vis a 310 y 322 nm AC y Pin respectivamente y fue ajustada en concordancia con las pruebas de citotoxicidad de la micropartícula de composito nPSi- β CD. A pesar de que el nPSi (control) no presenta una superficie química compatible con polifenoles, la carga fue exitosa, dado que las muestras presentan elevados de % PEE ($50 \pm 2,0$ y $97.5 \pm 2,0$ para AC y Pin, respectivamente), lo que podría deberse a la gran área superficial que poseen sus nanoporos donde quedaría retenido el polifenol. En el caso de la micropartícula nPSi- β CD con el polifenol (AC o Pin) incorporado, se observó un % PEE de $16,6 \pm 1,0$ (AC) y $58.5 \pm 1,5$ (Pin). En este sentido nPSi presentó una capacidad de carga de los polifenoles (AC: $3,6 \pm 0,7\%$ y Pin: $10,0 \pm 1,8\%$) mayor que nPSi- β CD (AC: $1,2 \pm 0,2\%$ y Pin: $6,0 \pm 0,7\%$). Este hallazgo podría ser explicado según los resultados que mostró la caracterización previamente realizada, ya es muy probable que los polifenoles se hayan absorbido principalmente en la gran corona de polímero β CD alrededor de las pequeñas micropartículas de nPSi, estos últimos corresponden al sustrato utilizado para la obtención de la micropartícula de composito nPSi- β CD.

Para evaluar la funcionalidad de la liberación controlada por polifenol (AC o Pin), se obtuvo el perfil de liberación de las micropartículas nPSi y nPSi- β CD cargadas, las cuales fueron sumergidas en PBS a 37°C bajo condiciones de agitación. Los resultados mostraron que después de las 24 horas todas las micropartículas presentaron más altos valores de porcentaje de liberación acumulada (nPSi+AC: $97,6 \pm 17,6$; nPSi+Pin: $94,2 \pm 17,0$; nPSi- β CD+AC: $93,8 \pm 11,2$; nPSi- β CD+Pin: $92,3 \pm 11,0$). Los perfiles presentan un claro contraste entre el control (nPSi) y composito (nPSi- β CD), debido a que se observó que la micropartícula nPSi- β CD es más eficiente en la liberación del fármaco que nPSi. Es decir, nPSi retiene a ambos polifenoles, no obstante, la liberación ocurre a los pocos minutos, mientras que nPSi- β CD mostró una liberación controlada por más de 5 horas.

Con el objetivo de establecer el o los mecanismos que participan en la liberación controlada de los polifenoles AC y Pin, se utilizaron tres modelos matemáticos (primer orden, Higuchi y Korsmeyer-Peppas) para los cuales se obtuvo el valor de r^2 . En el caso

de la liberación de AC-nPSi y de acuerdo al valor de r^2 calculado, presentó un mejor ajuste con el modelo de primer orden ($r^2 = 0.9355$), donde la dosis de liberación inmediata fue dispersada de una sola vez. Sin embargo, la cinética se describió con mayor precisión usando la micropartícula de nPSi- β CD+AC fue el modelo Korsmeyer-Peppas ($r^2 = 0.9649$). Esto significa que el factor que gobierna la liberación de AC no fue la disolución de las muestras, sino un proceso de difusión Fickiana (Hernandez-Montelongo *et al.*, 2018). Esto concuerda con el valor obtenido del exponente de liberación n del modelo ($<0,5$), el cual sugiere una liberación difusiva. En cuanto a Pin, ambos perfiles de liberación de micropartículas nPSi y nPSi- β CD, se ajustaron mejor al modelo Korsmeyer-Peppas (0.9774 y 0.9654, respectivamente). El valor n para nPSi fue ($n = 0.03$) y para nPSi- β CD ($n = 0.65$), este último sugiere que además de la difusión de Fickian el proceso de erosión también podría estar contribuyendo en el liberación de Pin.

Citotoxicidad de polifenoles y micropartícula nPSi- β CD

El estudio y evaluación de la actividad biológica de gran variedad de compuestos fitoquímicos se puede realizar en primera instancia a través del uso de líneas celulares en cultivo. De este modo, para evaluar el efecto citotóxico de AC y Pin se utilizó una línea celular endotelial de vena umbilical humana (HUVEC). Este modelo es utilizado para evaluar función endotelial así como angiogénesis, permitiendo realizar estudios de los mecanismos y vías de señalización involucradas y moduladas en el proceso de angiogénesis, asimismo probar la actividad farmacológica de moléculas que puedan inhibir dicho proceso.

Para estudiar el impacto de AC y Pin sobre la viabilidad de HUVECs se realizó un ensayo de MTS. Los resultados muestran que la viabilidad disminuye gradualmente a partir de concentraciones igual a mayores de 500 μ M y 200 μ M para AC y Pin, respectivamente. Por lo tanto, concentraciones de hasta 200 μ M no afectan la viabilidad de células HUVEC tratadas con AC. Este hallazgo es concordante con lo reportado por un estudio el cual determinó que la viabilidad celular disminuye de manera significativa a partir de una concentración de AC 380 μ M ($p < 0,05$) (Búfalo *et al.*, 2015). También Oliveira *et al.*, (2016) reportaron que para células monocíticas humanas tratadas con AC sólo y en combinación a una concentración de ~ 320 μ M no se afecta la viabilidad. Por otra parte para Pin la viabilidad se mantiene por sobre el 80% hasta concentraciones de 100 μ M, lo que es concordante con lo reportado previamente por Cuevas *et al.*, (2015) quienes describieron que células HUVEC expuestas a pinocembrina son viables hasta

concentraciones de 100 μM . En contraste, la viabilidad disminuye al 50% a concentraciones de 200 μM y a menos de 20% a concentraciones $\geq 500 \mu\text{M}$. En resumen, los resultados muestran que la viabilidad se mantiene sobre el 80% a concentraciones de hasta 200 μM (AC) y 100 μM (Pin) y por tanto, no genera citotoxicidad celular.

En cuanto al efecto de las micropartículas de nPSi- β CD sobre la viabilidad de HUVECs, células fueron cultivadas en presencia de micropartículas de composito a cuatro concentraciones entre 0,25 y 2,5 mg/mL por 6 y 24 horas. Los resultados de microscopía muestran que células HUVECs expuestas a menores concentraciones (0,25 y 0,5 mg/mL) presentan una morfología normal (alargada y plana), lo que sugiere que las micropartículas fueron bien toleradas por la célula. En contraste, concentraciones superiores (1,25 y 2,5 mg/mL) generaron cambios morfológicos en las células, observándose gran cantidad de estas con una forma redondeada y resuspendidas en el medio de cultivo, lo que da cuenta de una pérdida de la capacidad de adhesión celular y de un efecto citotóxico. Este hallazgo es concordante con los resultados observados en el estudio de viabilidad, donde se muestra que la viabilidad se mantiene por sobre el 80% a la concentración de baja de composito utilizado (0,25 mg/mL). Sin embargo, a partir de concentraciones más altas ($\geq 0,50$ mg/mL) se observa una disminución significativa de la viabilidad cercana al 60% llegando incluso a valor $< 20\%$. Este incremento en la mortalidad celular puede deberse a que células HUVECs expuestas a concentraciones de composito superiores a 0,25 mg/mL alteran las funciones celulares supervivencia celular, como por ejemplo la capacidad de adherencia, comunicación celular, diferenciación y migración (Chovatiya & Medzhitov, 2014).

Citotoxicidad de H_2O_2 e inducción de estrés oxidativo

En la primera etapa de la placa de ateroma avanzada, la angiogénesis se produce como un mecanismo de respuesta al aumento progresivo del tamaño de la placa, hipoxia y también a causa aumento de la inflamación y estrés oxidativo intraplaca, incrementando de esta forma el estímulo para la formación de nuevos vasos. En este contexto, se indujo estrés oxidativo en células HUVECs a través de H_2O_2 , el cual es una molécula que funciona como regulador y señalizador del estado redox de la célula. A partir de esto se evaluó: i) Citotoxicidad de concentraciones crecientes de H_2O_2 de hasta 50 mM; ii) Dosis mínima necesaria para inducir estrés oxidativo. Respecto de la evaluación de citotoxicidad a distintas concentraciones de H_2O_2 , los resultados muestran

que concentraciones menores a 0,8 mM. no afectan la viabilidad de las células HUVECs. Por su parte, respecto de establecer la dosis mínima necesaria para inducir estrés oxidativo, los resultados del estudio muestran que una concentración óptima correspondería a 0,4 mM de H_2O_2 , lo que se sustenta en las diferencias observadas respecto del control en la inducción de estrés oxidativo. Similarmente, un estudio determinó que concentraciones de hasta 0,1 mM H_2O_2 mantienen la viabilidad sobre el 80% de las células osteoblásticas de cultivo primario de rata tratadas durante 24 horas (Mada *et al.*, 2017). Estas concentraciones son mayores a lo reportado en otros estudios que establecen concentraciones de H_2O_2 para inducir el efecto deseado. En este sentido Bhatia *et al.*, (2017), establecieron que después del tratamiento con $\sim 60 \mu M$ H_2O_2 , la viabilidad de células de neuroblastoma (IMR32) se mantenía sobre el 80%. Las discrepancias observadas entre los estudios podría deberse a factores propios de los ensayos como: el tipo de células utilizada (línea celular o cultivo primario), condiciones de cultivo celular específicamente respecto al tiempo al que fueron expuestas las células al tratamiento con H_2O_2 y también el tipo de ensayo utilizado para determinar la viabilidad celular. A pesar de las diferencias encontradas en las dosis viables para H_2O_2 es importante destacar, la dosis seleccionada (0,4 mM) en este estudio se sustentó en los resultados obtenidos a partir dos métodos distintos citotoxicidad y evaluación de estrés oxidativo a través de la sonda CM- H_2DCFDA . Por otro lado, la estrategia para evaluar la inducción de estrés oxidativo también podría estar contribuyendo en las diferencias encontradas debido a que ésta mide la producción general de ROS, por lo tanto para mejorar este aspecto sería muy beneficioso incorporar la medición específica de los subproductos formados a partir de la descomposición del H_2O_2 o la actividad de enzimas antioxidantes (catalasa o glutatión peroxidasa) en el sobrenadante del cultivo celular. En resumen, las diferencias encontradas podrían deberse sólo a las condiciones estandarizadas y al modelo celular utilizado, por lo tanto 0,4 mM H_2O_2 es la concentración óptima para poder estudiarlo.

Actividad antiangiogénica de ácido cafeico y pinocembrina

Ensayo de membrana corioalantoidea de pollo (CAM)

Para evaluar el efecto antiangiogénico del tratamiento con AC y Pin en solución se utilizó un modelo *ex vivo* de angiogénesis mediante el ensayo de membrana corioalantoidea de pollo (ensayo Chick-CAM). Durante el desarrollo del embrión de pollo la CAM es una estructura extraembrionaria altamente vascularizada que se expande rápidamente y proporciona una interfaz para el intercambio de gases y desechos, esto

permite su utilización como modelo experimental para el estudio de moléculas y/o fármacos por ejemplo con actividad angiogénica o antiangiogénica (Ribatti, 2017). Así, al exponer huevos embrionados a tres concentraciones crecientes tanto de AC (50, 150 y 350 μM) y Pin (10, 20 y 65 μM), se observó que todos los tratamientos realizados disminuyeron el número de vasos sanguíneos formados en los ensayos CAM (figura 29 y 30), demostrando por tanto la capacidad antiangiogénica de los polifenoles analizados.

Si bien se demostró que AC y Pin presentan actividad antiangiogénica, este ensayo evaluó específicamente la actividad antiangiogénica de estos polifenoles en solución, sin embargo, resultaría interesante continuar este estudio evaluando el efecto antiangiogénico de estos tratamiento en polifenoles cargados en la micropartícula de composito nPSi- βCD , dado que la evidencia muestra la utilidad del ensayo CAM en el estudio y evaluaciones de las propiedades in vivo de biomateriales antes de pasar al modelo animal (Buschmann *et al.*, 2012; Díaz-Gómez *et al.*, 2014). En este contexto, se evaluó la actividad antiangiogénica de estradiol dentro de poliuretano (PU), el ensayo CAM reveló un potencial angiogénico significativamente mayor cuando 17- β -estradiol fue incorporado dentro del biomaterial para su uso en la reparación del piso pélvico (Shafaat *et al.*, 2018). Además han testeado diversos materiales biocompatible y sus propiedades angiogénicas obteniendo muy buenos resultados y evidenciando la gran aplicabilidad de este ensayo (Ribatti *et al.*, 2020).

Formación de estructuras tubulares en matrigel

Por otra parte, se evaluó la actividad antiangiogénica de 3 concentraciones de AC (50, 150 y 350 μM) y Pin (10, 20 y 65 μM) en solución y cargado en la micropartícula de composito nPSi- βCD sobre la capacidad de HUVECs para formar estructuras parecidas a vasos sanguíneos en matrigel. El matrigel corresponde a una matriz extracelular que simula una membrana basal, rica en proteínas y factores de crecimiento, la cual es utilizada para evaluación la migración y organización de células tal como ocurre en el proceso de neoangiogénesis, por lo tanto, se utiliza para evaluar por ejemplo la capacidad antiangiogénica in vitro de diferentes moléculas como los polifenoles.

Los resultados obtenidos en el ensayo con matrigel mostraron que AC (150 μM) posee actividad antiangiogénica al reducir de forma significativa el número de uniones (control: 80 v/s AC150: 50), segmentos (control: 130 v/s AC150: 85) y polígonos (control: 50 v/s AC150: 30) formados. Estos resultados concuerdan con lo descrito por Paeng *et*

al., (2015) quienes evaluaron la actividad antiangiogénica del ácido cafeico fenil ester (CAPE). Dentro de sus resultados destacan que (CAPE) inhibió fuertemente la formación de estructuras tubulares de células epiteliales del pigmento retinal humano, bajo condiciones de hipoxia. Del mismo modo, otro estudio realizado utilizando un modelo de células HUVECs demostró que ácido ferúlico (ácido fenólico) inhibe la proliferación celular, migración y formación de estructuras tubulares en respuesta al factor de crecimiento fibroblástico-1, lo que demuestra la actividad antiangiogénica de este polifenol (Yang *et al.*, 2015).

Por otro lado, cuando se evaluó la actividad antiangiogénica pero ahora con el polifenol (AC) cargado en la micropartícula nPSi-βCD, se observó que hubo reducción significativa de la formación de túbulos en las 3 concentraciones testeadas (50, 150 y 350 μM, figura 32 A`, B y C`) a diferencia de lo encontrado en el polifenol en solución, donde si bien se demostró de AC posee actividad antiangiogénica, esta fue significativa sólo a una concentración de 150 μM, mientras que a concentraciones de AC 50 y 350 μM en solución no se observaron diferencias con respecto a la condición control, siendo la concentración de nPSi-βCD+AC 150 μM quien presentó el mayor efecto. Es decir, la encapsulación de AC logró mejorar el efecto biológico de este polifenol.

En cuanto a la capacidad antiangiogénica de Pin (10, 20 y 65 μM) en solución, los resultados indican que Pin posee actividad antiangiogénica, sin embargo, sólo se observó una reducción significativa en el número de uniones en los grupos tratados con Pin a 20 y 65 μM (control: 83 v/s Pin 20 y 65: 61), mientras que en el número de segmentos y polígonos no se observaron diferencias respecto del control. Tampoco se demostró diferencia significativa en la concentración de Pin más baja utilizada (10 μM). Esto es concordante con lo observado en otros estudios donde evaluaron la capacidad antiangiogénica de otros polifenoles, por ejemplo de análogos de quercetina y luteolina. Los resultados arrojaron que quercetina, luteína y sus análogos inhiben significativamente la migración celular, proceso clave en la angiogénesis (Ravishankar *et al.*, 2015), que corresponden a la misma familia de flavonoides que pinocembrina. Si bien la evidencia descrita da cuenta del efecto antiangiogénico de otros polifenoles, este estudio se basó en la utilización de polifenoles que presentan elevadas concentraciones en el propóleo chileno de la región de La Araucanía. En este sentido, evidencia previa que caracterizó propóleos de la región, demostró que polifenoles como la pinocembrina y ácido cafeico son abundantes en el propóleo de la zona (Cuevas *et al.*, 2014). Posteriormente, basado en un modelo in vitro (HUVECs) e in vivo (ratón con aterosclerosis), se logró demostrar que los polifenoles presentes, entre ellos

pinocembrina, presentan propiedades anti-aterogénica y antiangiogénica (Cuevas *et al.*, 2015). Interesantemente, los resultados de este estudio, que dan cuenta del efecto antiangiogénico de pinocembrina, son concordantes con la evidencia previa descrita en modelo in vivo en cuanto al efecto biológico observado.

Además, estudios realizados evaluando polifenoles de la misma familia de pinocembrina (flavonoides) muestran la misma actividad biológica. Así, en células pancreáticas tratadas con curcumina y sus análogos (EF31 y UBS109) se observó un deterioro significativo de la capacidad de HUVEC para formar estructuras tubulares, cuando se compararon con células sin tratamiento (Nagaraju *et al.*, 2015). Otro estudio realizado usando quercetina, revelaron que inhibe la capacidad de crecimiento de un tumor in vivo e inhibe significativamente la proliferación de células endoteliales de la retina coroides y la migración y formación de estructuras tubulares de células RA/6A (Chen *et al.*, 2008). Asimismo, genisteína inhibió el crecimiento de células HUVEC tras la estimulación con VEGF (Varinska *et al.*, 2015) y quercetina inhibió fuertemente la formación de estructuras tubulares, mientras que apigenina y pinocembrina tuvieron un menor efecto inhibitorio (Ahn *et al.*, 2009).

Ahora bien, al evaluar la capacidad antiangiogénica de Pin incorporada dentro de la micropartícula de composito nPSi-βCD en tres concentraciones crecientes, se observó una disminución significativa del número de estructuras poligonales, master uniones y segmentos formados específicamente en las concentraciones de nPSi-βCD+Pin 10 y 20 μM (**figura 33 y 34**). En contraste con lo encontrado a Pin 65 μM en solución, en la micropartícula nPSi-βCD+Pin 65 μM no se observaron cambios en los parámetros evaluados en el ensayo con matrigel para formación de túbulos, esto quiere decir que Pin cargada en la micropartícula de composito sólo presenta actividad antiangiogénica a las concentraciones más bajas utilizadas. Con respecto a esto, algunos autores evaluaron la correlación entre la actividad antioxidante y antiangiogénica de un grupo de polifenoles del propóleos, encontrando que mientras mas capacidad antioxidante presenta el polifenol mayor es la actividad antiangiogénica (Ahn *et al.*, 2009). En ese sentido, los polifenoles que pertenecen al grupo de los flavonoides (pinocembrina) poseen menor actividad antioxidante en comparación a los ácidos fenólicos (ácido cafeico), lo que explicaría en parte las diferencias encontradas entre AC y Pin tanto en solución como en micropartícula nPSi-βCD cargada. Finalmente, los resultados demostraron que la utilización de sistemas de liberación controlada de drogas como es el caso de la micropartícula de composito nPSi-βCD, mejoró la actividad antiangiogénica que presenta ácido cafeico y pinocembrina.

Capacidad antioxidante de polifenoles

Con el fin de establecer el mecanismo por el cual los polifenoles modulan las diferentes acciones biológicas ampliamente descritas, se evaluó la capacidad antioxidante tanto de AC y Pin en solución y cargados dentro de la micropartícula de liberación controlada nPSi- β CD, a través de la habilidad que estos tienen de remover el radical libre ABTS. En este contexto, los resultados muestran que AC (50, 150 y 350 μ M) en solución inhibió de manera significativa la absorbancia de ABTS en todas las concentraciones testeadas (AC 50 μ M: $10,7 \pm 1,7$; AC 150 μ M: $24 \pm 2,7$ y AC 350 μ M: $51,8 \pm 5,3\%$), además el porcentaje de inhibición es directamente proporcional a la concentración del polifenol utilizada.

Para el caso de Pin también se observó inhibición de la absorbancia, sin embargo, no se observaron diferencias entre las concentraciones más bajas utilizadas 10 y 20 μ M, mientras que para 65 μ M se observó un leve aumento del porcentaje de inhibición ($4,8 \pm 1,3$ a 65 μ M v/s $3,4 \pm 0,6$ a 10 μ M v/s $3,4 \pm 0,9$ a 20 μ M). Los resultados demuestran que ácido cafeico presenta mayor actividad *scavenger* que pinocembrina, resultados concordantes con lo reportado por Ahn et al., (2009). Estos hallazgos sugerirían que mientras mayor sea el poder antioxidante de la molécula mayor sería la actividad antiangiogénica.

Otros estudios vinculan la estructura química de los polifenoles con la capacidad antioxidante la cual establece que la cantidad de grupos hidroxilos y la posición de éstos en la estructura química otorga mayor o menor capacidad *scavenger* (Kongpichitchoke et al., 2015). Del mismo modo las flavononas tienen menor actividad antioxidante debido a que carecen de la estructura de anillo o-dihidroxi fenil como es el caso de Pin (Kima J-D et al., 2006). No así AC que al ser un ácido fenólico posee varios grupos hidroxilos en su estructura. Finalmente, algunos autores proponen que la correlación entre la actividad antioxidante y antiangiogénica puede deberse al rol que tiene el superóxido y H_2O_2 en la transducción de señal en respuesta a factores como la hipoxia, activando múltiples vías que conducen por ejemplo a la migración de células endoteliales (Ushio-Fukai et al., 2006). Por otra parte, al realizar la conversión a equivalentes de Trolox en mg/L, se observó que para AC la capacidad antioxidante va de media a alta y para Pin es muy baja en comparación al *gold* estándar (Trolox). En este sentido, ácido cafeico en la concentración más alta utilizada, alcanzó más de la mitad de la actividad descrita para Trolox. En contraste, en la mayor concentración utilizada para Pin los valores obtenidos no superaron a 1 mg/L de Trolox.

Dado que previamente se realizaron ensayos para evaluar la liberación controlada de polifenoles cargados dentro de la micropartícula de compuesto nPSi-βCD, adicionalmente se evaluó la cinética de la capacidad antioxidante de estos polifenoles cargados en la micropartícula, que permita entender si la capacidad antioxidante también ocurría de forma gradual. Los resultados muestran cambios en el porcentaje de inhibición de la absorbancia de ABTS principalmente para AC, en los diferentes tiempos evaluados. Lo anterior, indica una liberación controlada del polifenol a través del tiempo lo que se ve reflejado en el aumento de la actividad antioxidante, encontrando diferencias significativas entre las 4 y 8 horas en las concentraciones de nPSi-βCD+AC 150 y 350 μM (**figura 36**). En el caso de nPSi-βCD+AC 50 μM se observan diferencias significativas en el porcentaje de inhibición obtenido entre 0,5/4 hrs. y 4/24 hrs. Además cuando se realizó la conversión de los valores obtenidos en la cinética de la actividad antioxidante de los polifenoles dentro de la micropartícula nPSi-βCD+AC a equivalentes de Trolox, se observó igual comportamiento descrito anteriormente en los polifenoles en solución. En contraste con lo descrito para nPSi-βCD+AC, para nPSi-βCD+Pin se observó una cinética en la cual no hay variación de la actividad antioxidante, por lo tanto, para pinocembrina no existen diferencias entre los polifenoles en solución y cargados en la micropartícula de compuesto nPSi-βCD+Pin. En este sentido, no existen estudios previos respecto que evalúen cinética de la capacidad antioxidante en polifenoles cargados en micropartículas, por lo que los resultados descritos en este estudio constituyen una primera evidencia en esta línea.

Expresión génica de Nrf2, Keap1, Akt, Cat, Glut-P, Hmox1, Gclc y Gclm

El estrés oxidativo juega un rol importante en la patogenia de muchas enfermedades como por ejemplo las cardiovasculares (6). Éstas, cursan con elevados niveles de especies ROS lo que provoca daño al tejido y activación de vías de señalización asociadas a procesos inflamatorios (7). En este contexto, en este estudio se evaluó la expresión de genes involucrados en la respuesta antioxidante.

Para los polifenoles en solución, se analizaron potenciales cambios en genes de la vía antes señalada (Nrf2, Keap1, Akt, Cat, Glut-P, Hmox1, Gclc y Gclm), en células HUVECs tratadas con AC y Pin a diferentes concentraciones (AC 50, 150, 350 μM; Pin 10, 20, 65 μM). De modo general, los resultados muestran diferencias en la expresión de los genes Nrf2, Keap1, Akt, Hmox-1 y Gclc (**figura 37**). En el caso del gen Nrf2, el tratamiento con AC 50 μM incrementó significativamente la expresión del gen, mientras que a mayores concentraciones no se observaron diferencias respecto del control. Para

el gen Keap-1 sólo se observó disminución de la expresión a una concentración de AC 150 μ M ($p < 0,05$), mientras que para el gen Akt, sólo se observaron diferencias significativas en el grupo tratado con AC 350 μ M ($p < 0,001$). Similar hallazgo se observó para los genes Hmox-1 y Gclc, que incrementaron su expresión (~ 2 veces respecto del control) a la concentración de AC 350 μ M. Por su parte, el tratamiento con Pin en solución sólo generó cambios en la expresión de los genes Akt y Hmox-1 (**figura 38**). Para Akt se observó una disminución de la expresión génica en células tratadas con 65 μ M, mientras que para Hmox-1 se encontró que sólo el tratamiento con Pin 10 μ M condujo al aumento de la expresión de forma significativa.

En células expuestas a estrés oxidativo, sería esperable observar un incremento en la expresión de Nrf2, mientras que Keap1 debería encontrarse disminuido, lo que debería corresponder en estos ensayos a la condición control. Así, Zhou *et al.*, (2014), proponen que en células bajo condiciones de estrés oxidativo, se activa el sistema Nrf2 dependiente de Keap-1, generando una degradación de Keap-1 y la translocación de Nrf2 al núcleo y la activación transcripcional de genes asociados a enzimas antioxidantes y detoxificantes. Adicionalmente, estos genes promueven mecanismos de citoprotección como proliferación celular y angiogénesis. Por tanto, entendiendo el efecto antiangiogénico demostrado por AC y Pin en este y otros estudios, el tratamiento con estos polifenoles debería evidenciar cambios en la expresión de estos genes. Sin embargo, los resultados observados no dan cuenta de este efecto. Este hallazgo podría estar relacionado con la pérdida de la actividad antioxidante de los polifenoles en solución, lo que enfatiza la potencial utilidad de cargarlos en micropartículas.

Por otro lado, se evaluó el efecto de la microencapsulación de AC y Pin sobre cambios en la expresión génica de células HUVEC tratadas con la micropartícula nPSi- β CD+polifenol. En este sentido, dada la baja disponibilidad que muestran los polifenoles se propuso su encapsulación en micropartículas, lo que contribuiría a mejorar esta falencia, por lo que resulta relevante evaluar la expresión de estos genes en esta condición. En el caso de nPSi- β CD/AC se observó una disminución de la expresión génica de Keap-1 en el grupo tratado con nPSi- β CD/AC a 50 y 350 μ M. Por su parte, para Akt y Glut-P se observó una disminución de la expresión del gen en células tratadas con nPSi- β CD/AC 50 μ M. Por último, no se encontró diferencias en la expresión génica de Nrf2, Cat, Hmox-1, Gclc y Gclm. Para la micropartícula de composito nPSi- β CD/Pin no se observaron cambios significativos en la expresión de genes Nrf2, Keap-1, Cat y Gclm. Para el gen Akt, se observó una disminución significativa de la expresión génica sólo en el grupo tratado con nPSi- β CD/Pin 10 μ M, observando resultados similares para

el gen Gclc. Con respecto al gen Glut-P el tratamiento con nPSi-βCD/Pin generó una disminución significativa de la expresión en el grupo tratado con nPSi-βCD/Pin 65 μM. Finalmente, también se observó reducción de la expresión del gen Hmox-1 sólo para el grupo tratado con nPSi-βCD/Pin 20 μM. Estos resultados demuestran que no existen cambios en la expresión de genes relacionados a la vía antioxidante en células HUVECs tratadas con los polifenoles incorporados en la micropartícula de composito nPSi-βCD. Los resultados de este estudio demuestran que la actividad antiangiogénica de Ácido cafeico, evaluada por matrigel y CAM, es mayor que la observada en Pinocembrina. En este contexto, los mayores cambios en la expresión génica se observan en células tratadas con nPSi-βCD/AC 50 μM. Entendiendo la actividad biológica de tipo antiangiogénica de AC, es esperable observar que el tratamiento genere una disminución de Keap-1, Akt y Glut-P.

Expresión proteica de Nrf2, Keap1, Akt y Erk 1/2

En células HUVEC fueron evaluados los cambios en la expresión proteica en tratamiento con polifenoles (AC y Pin) en solución e incorporados a la micropartícula de composito nPSi-βCD. Los resultados muestran que para ácido cafeico en ambos tratamientos (en solución y cargado en micropartículas), no se observó expresión de las proteínas Nrf2 y Keap-1 (**figura 41A y B**). Por su parte, para Akt y Erk 1/2 fracción total y fosforilada no se observaron diferencias significativas en la expresión de proteínas. En el caso de Keap-1, este hallazgo sería concordante con la disminución significativa de la expresión génica observada a 50 μM del polifenol (AC) en la micropartícula.

Para células HUVECs tratadas con Pin en solución, no se observa expresión de Nrf2. Por su parte, no se observaron cambios en la expresión proteica de Keap-1, Akt, Erk 1/2 fracción total y fosforilada (**figura 43A-D**). Al evaluar la expresión proteica en células tratadas con la micropartícula de composito nPSi-βCD+Pin, igualmente no se observa expresión de Nrf2. Además, no se observan cambios en la expresión proteica de Akt y Erk 1/2 fracción total. En contraste, para la fracción fosforilada de Erk 1/2 y Akt se observa un incremento significativo de la expresión proteica en células tratadas con nPSi-βCD+Pin 65 μM y 10 μM, respectivamente.

9. CONCLUSIONES

1. A partir de la caracterización físico-química se establece que la micropartícula de nPSi- β CD es apropiada para ser utilizada como transportador y sistema de liberación controlada de ácido cafeico y pinocembrina. El perfil de liberación indica que la micropartícula de composito nPSi- β CD presenta una mejor liberación controlada de los polifenoles en comparación con la micropartícula sin el polímero de β -ciclodextrina, presentando además citocompatibilidad hasta concentraciones de 0,25 mg/mL.
2. Los polifenoles evaluados, ácido cafeico y pinocembrina, presentan actividad antioxidante y antiangiogénica tanto en solución como microencapsulados. El efecto biológico es mayor para ácido cafeico respecto de pinocembrina, especialmente cuando está incorporado a la micropartícula de composito nPSi- β CD.
3. En células HUVEC tratadas con polifenoles encapsulados, tanto ácido cafeico y pinocembrina, se observan cambios en la expresión génica de Akt y Glut-P. Estos cambios no se observan en la expresión de las proteínas analizadas.

10. REFERENCIAS

WHO. Cardiovascular Diseases (actualizada mayo 2017) Disponible en:

[https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)).

Fecha última consulta: agosto 2021.

WHO. The top 10 causes of death (actualizada mayo 2018) Disponible en:

<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.

Fecha última consulta: agosto 2021.

INE. Defunciones en Chile (actualizada 2017) Disponible en:

<https://www.ine.cl/estadisticas/sociales/demografia-y-vitales/nacimientos-matrimonios-y-defunciones>. Fecha última consulta: agosto 2021.

Abed DA, Goldstein M, Albanyan H, Jin H, Hu L. Discovery of direct inhibitors of Keap1-Nrf2 protein-protein interaction as potential therapeutic and preventive agents. *Acta Pharm Sin B*. 2015;5(4):285-99. doi: 10.1016/j.apsb.2015.05.008.

Ahmadi A, Leipsic J, Blankstein R, Taylor C, Hecht H, Stone GW, Narula J. Do plaques rapidly progress prior to myocardial infarction? The interplay between plaque vulnerability and progression. *Circ Res*. 2015;117(1):99-104. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.305637.

Ahn MR, Kunimasa K, Kumazawa S, Nakayama T, Kaji K, Uto Y, Hori H, Nagasawa H, Ohta T. Correlation between antiangiogenic activity and antioxidant activity of various components from propolis. *Mol Nutr Food Res*. 2009;53(5):643-51. doi: 10.1002/mnfr.200800021.

Alam J, Stewart D, Touchard C, Boinapally S, Choi AM, Cook JL. Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene. *J Biol Chem*. 1999;274(37):26071-8. doi: 10.1074/jbc.274.37.26071.

Alexopoulos N, Raggi P. Calcification in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol*. 2009;6(11):681-8. doi: 10.1038/nrcardio.2009.165.

Alhosseini SN, Moztaarzadeh F, Mozafari M, Asgari S, Dodel M, Samadikuchaksaraei A, Kargozar S, Jalali N. Synthesis and characterization of electrospun polyvinyl alcohol nanofibrous scaffolds modified by blending with chitosan for neural tissue engineering. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:25-34. doi: 10.2147/IJN.S25376.

Allen EN, Potdar S, Tapias V, Parmar M, Mizuno CS, Rimando A, Cavanaugh JE. Resveratrol and pinostilbene confer neuroprotection against aging-related deficits through an ERK1/2-dependent mechanism. *J Nutr Biochem*. 2018;54:77-86. doi: 10.1016/j.jnutbio.2017.10.015.

Ambale-Venkatesh B, Yang X, Wu CO, Liu K, Hundley WG, McClelland R, Gomes AS, Folsom AR, Shea S, Guallar E, Bluemke DA, Lima JAC. Cardiovascular Event Prediction by Machine Learning: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Circ Res*. 2017 Oct 13;121(9):1092-1101. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311312.

Angeloni C, Motori E, Fabbri D, Malaguti M, Leoncini E, Lorenzini A, Hrelia S. H₂O₂ preconditioning modulates phase II enzymes through p38 MAPK and PI3K/Akt activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;300(6):H2196-205. doi: 10.1152/ajpheart.00934.2010.

Anglin EJ, Cheng L, Freeman WR, Sailor MJ. Porous silicon in drug delivery devices and materials. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008;60(11):1266-77. doi: 10.1016/j.addr.2008.03.017.

Anjum SI, Ullah A, Khan KA, Attaullah M, Khan H, Ali H, Bashir MA, Tahir M, Ansari MJ, Ghramh HA, Adgaba N, Dash CK. Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. *Saudi J Biol Sci*. 2019;26(7):1695-1703. doi: 10.1016/j.sjbs.2018.08.013.

Araldi E, Chamorro-Jorganes A, van Solingen C, Fernandez-Hernando C, Suarez Y. Therapeutic Potential of Modulating microRNAs in Atherosclerotic Vascular Disease. *Curr Vasc Pharmacol*. 2015;13(3):291-304.

Arias C, Saavedra N, Saavedra K, Alvear M, Cuevas A, Stuchi Maria-Engler S, Abdalla DSP, Salazar LA. Propolis Reduces the Expression of Autophagy-Related Proteins in Chondrocytes under Interleukin-1 β Stimulus. *Int J Mol Sci*. 2019;20(15):3768. doi: 10.3390/ijms20153768.

Badimon L, Vilahur G. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *J Intern Med*. 2014;276(6):618-32. doi: 10.1111/joim.12296.

Baird L, Dinkova-Kostova AT. The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Arch Toxicol*. 2011;85(4):241-72. doi: 10.1007/s00204-011-0674-5.

Baird L, Yamamoto M. The Molecular Mechanisms Regulating the KEAP1-NRF2 Pathway. *Mol Cell Biol*. 2020;40(13):e00099-20. doi: 10.1128/MCB.00099-20.

Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses, *Food Chemistry*. 2006; 1(99):191-203. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.07.042.

Balogun E, Hoque M, Gong P, Killeen E, Green CJ, Foresti R, Alam J, Motterlini R. Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. *Biochem J*. 2003;371(Pt 3):887-95. doi: 10.1042/BJ20021619.

Bankova V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J Ethnopharmacol*. 2005;100(1-2):114-7. doi: 10.1016/j.jep.2005.05.004.

Barrientos L, Herrera CL, Montenegro G, Ortega X, Veloz J, Alvear M, Cuevas A, Saavedra N, Salazar LA. Chemical and botanical characterization of Chilean propolis and biological activity on cariogenic bacteria *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Braz J Microbiol*. 2013;44(2):577-85. doi: 10.1590/S1517-83822013000200038.

Bennett MR, Sinha S, Owens GK. Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circ Res*. 2016;118(4):692-702. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306361.

Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R, Falk E. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res*. 2014;114(12):1852-66. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.302721.

Bernatoniene J, Kopustinskiene DM. The Role of Catechins in Cellular Responses to Oxidative Stress. *Molecules*. 2018;23(4):965. doi: 10.3390/molecules23040965.

- Bhatia G, Dhuna V, Dhuna K, Kaur M, Singh J. Bacopa monnieri extracts prevent hydrogen peroxide-induced oxidative damage in a cellular model of neuroblastoma IMR32 cells. *Chin J Nat Med*. 2017;15(11):834-846. doi: 10.1016/S1875-5364(18)30017-7.
- Bijak M, Ziewiecki R, Saluk J, Ponczek M, Pawlaczyk I, Krotkiewski H, Wachowicz B, Nowak P. Thrombin inhibitory activity of some polyphenolic compounds. *Med Chem Res*. 2014;23(5):2324-2337. doi: 10.1007/s00044-013-0829-4.
- Bisi O, Ossicini S, Pavesi L. Porous silicon: a quantum sponge structure for silicon based optoelectronics. *Surf Sci Rep* 2000;38(1-3):1-126. doi: 10.1016/S0167-5729(99)00012-6.
- Björnheden T, Levin M, Evaldsson M, Wiklund O. Evidence of hypoxic areas within the arterial wall in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19(4):870-6. doi: 10.1161/01.atv.19.4.870.
- Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem Toxicol*. 1998;36(4):347-63. doi: 10.1016/s0278-6915(97)00145-2.
- Cadet J, Wagner JR. DNA base damage by reactive oxygen species, oxidizing agents, and UV radiation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(2):a012559. doi: 10.1101/cshperspect.a012559.
- Canning P, Sorrell FJ, Bullock AN. Structural basis of Keap1 interactions with Nrf2. *Free Radic Biol Med*. 2015;88(Pt B):101-107. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.034. Epub 2015 Jun 7.
- Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000;407(6801):249-57. doi: 10.1038/35025220.
- Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*. 2003;9(6):653-60. doi: 10.1038/nm0603-653.
- Chatzizisis YS, Antoniadis AP, Wentzel JJ, Giannoglou GD. Vulnerable plaque: the biomechanics of matter. *Atherosclerosis*. 2014;236(2):351-2. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.07.032.

Chen C, Yu R, Owuor ED, Kong AN. Activation of antioxidant-response element (ARE), mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and caspases by major green tea polyphenol components during cell survival and death. *Arch Pharm Res.* 2000;23(6):605-12. doi: 10.1007/BF02975249.

Chen Y, Li XX, Xing NZ, Cao XG. Quercetin inhibits choroidal and retinal angiogenesis in vitro. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2008;246(3):373-8. doi: 10.1007/s00417-007-0728-9. Epub 2007 Dec 18.

Chiou, Y. S., J. C. Wu, Q. Huang, F. Shahidi, Y. J. Wang, C. T. Ho, and M. H. Pan. Metabolic and colonic microbiota transformation may enhance the bioactivities of dietary polyphenols. *Journal of Functional Foods.* 2014;1(7):3–25. doi: 10.1016/j.jff.2013.08.006.

Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Contribution of neovascularization and intraplaque haemorrhage to atherosclerotic plaque progression and instability. *Acta Physiol (Oxf).* 2015;213(3):539-53. doi: 10.1111/apha.12438.

Chovatiya R, Medzhitov R. Stress, inflammation, and defense of homeostasis. *Mol Cell.* 2014;54(2):281-8. doi: 10.1016/j.molcel.2014.03.030.

Chovatiya R, Medzhitov R. Stress, inflammation, and defense of homeostasis. *Mol Cell.* 2014;54(2):281-8. doi: 10.1016/j.molcel.2014.03.030.

Costa TJ, Barros PR, Arce C, Santos JD, da Silva-Neto J, Egea G, Dantas AP, Tostes RC, Jiménez-Altayó F. The homeostatic role of hydrogen peroxide, superoxide anion and nitric oxide in the vasculature. *Free Radic Biol Med.* 2021;162:615-635. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.11.021.

Cuevas A, Saavedra N, Cavalcante MF, Salazar LA, Abdalla DS. Identification of microRNAs involved in the modulation of pro-angiogenic factors in atherosclerosis by a polyphenol-rich extract from propolis. *Arch Biochem Biophys.* 2014;557:28-35. doi: 10.1016/j.abb.2014.04.009.

Cuevas A, Saavedra N, Rudnicki M, Abdalla DS, Salazar LA. ERK1/2 and HIF1 α Are Involved in Antiangiogenic Effect of Polyphenols-Enriched Fraction from Chilean Propolis. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015;2015:187575. doi: 10.1155/2015/187575.

Cullen AE, Centner AM, Deitado R, Salazar JFA. The Impact of Dietary Supplementation of Whole Foods and Polyphenols on Atherosclerosis. *Nutrients*. 2020;12(7):2069. doi: 10.3390/nu12072069.

Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science*. 1991;251(4995):788-91. doi: 10.1126/science.1990440.

D'Archivio M, Filesi C, Vari R, Scazzocchio B, Masella R. Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *Int J Mol Sci*. 2010;11(4):1321-42. doi: 10.3390/ijms11041321.

Dai G, Vaughn S, Zhang Y, Wang ET, Garcia-Cardena G, Gimbrone MA Jr. Biomechanical forces in atherosclerosis-resistant vascular regions regulate endothelial redox balance via phosphoinositol 3-kinase/Akt-dependent activation of Nrf2. *Circ Res*. 2007;101(7):723-33. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.152942.

Dai W, Wang H, Fang J, Zhu Y, Zhou J, Wang X, Zhou Y, Zhou M. Curcumin provides neuroprotection in model of traumatic brain injury via the Nrf2-ARE signaling pathway. *Brain Res Bull*. 2018;140:65-71. doi: 10.1016/j.brainresbull.2018.03.020.

Daleprane JB, Abdalla DS. Emerging roles of propolis: antioxidant, cardioprotective, and antiangiogenic actions. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:175135. doi: 10.1155/2013/175135.

Daleprane JB, Freitas Vda S, Pacheco A, Rudnicki M, Faine LA, Dörr FA, Ikegaki M, Salazar LA, Ong TP, Abdalla DS. Anti-atherogenic and anti-angiogenic activities of polyphenols from propolis. *J Nutr Biochem*. 2012;23(6):557-66. doi: 10.1016/j.jnutbio.2011.02.012.

Dan Dunn J, Alvarez LA, Zhang X, Soldati T. Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis. *Redox Biol*. 2015;6:472-485. doi: 10.1016/j.redox.2015.09.005.

Di Lorenzo C, Colombo F, Biella S, Stockley C, Restani P. Polyphenols and Human Health: The Role of Bioavailability. *Nutrients*. 2021;13(1):273. doi: 10.3390/nu13010273.

Diniz C, Suliburska J, Ferreira IMPLVO. New insights into the antiangiogenic and proangiogenic properties of dietary polyphenols. *Mol Nutr Food Res*. 2017;61(6). doi: 10.1002/mnfr.201600912.

Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Cole RN, Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Yamamoto M, Talalay P. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(18):11908-13. doi: 10.1073/pnas.172398899.

Dobrowolski JW, Vohora SB, Sharma K, Shah SA, Naqvi SA, Dandiya PC. Antibacterial, antifungal, antiamoebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *J Ethnopharmacol*. 1991;35(1):77-82. doi: 10.1016/0378-8741(91)90135-z.

Doyle B, Caplice N. Plaque neovascularization and antiangiogenic therapy for atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 2007; 49(21):2073-80. doi: 10.1016/j.jacc.2007.01.089.

Durazzo A, Lucarini M, Souto EB, Cicala C, Caiazza E, Izzo AA, Novellino E, Santini A. Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phytother Res*. 2019; 33(9):2221-2243. doi: 10.1002/ptr.6419.

Favier J, Corvol P. Angiogénèse physiologique [Physiological angiogenesis]. *Thérapie*. 2001;56(5):455-63.

Ference BA, Ginsberg HN, Graham I, Ray KK, Packard CJ, Bruckert E, Hegele RA, Krauss RM, Raal FJ, Schunkert H, Watts GF, Borén J, Fazio S, Horton JD, Masana L, Nicholls SJ, Nordestgaard BG, van de Sluis B, Taskinen MR, Tokgözoğlu L, Landmesser U, Laufs U, Wiklund O, Stock JK, Chapman MJ, Catapano AL. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J*. 2017;38(32):2459-2472. doi: 10.1093/eurheartj/ehx144.

Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(6):789-91. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.179663.

Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol*. 1996;16(9):4604-13. doi: 10.1128/MCB.16.9.4604.

Fraga CG, Croft KD, Kennedy DO, Tomás-Barberán FA. The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food Funct*. 2019;10(2):514-528. doi: 10.1039/c8fo01997e.

Fraga CG, Galleano M, Verstraeten SV, Oteiza PI. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Mol Aspects Med*. 2010;31(6):435-45. doi: 10.1016/j.mam.2010.09.006.

Francula-Zaninovic S, Nola IA. Management of Measurable Variable Cardiovascular Disease' Risk Factors. *Curr Cardiol Rev*. 2018;14(3):153-163. doi: 10.2174/1573403X14666180222102312.

Fukutomi T, Takagi K, Mizushima T, Ohuchi N, Yamamoto M. Kinetic, thermodynamic, and structural characterizations of the association between Nrf2-DLGex degron and Keap1. *Mol Cell Biol*. 2014;34(5):832-46. doi: 10.1128/MCB.01191-13.

Gao Y, Liu F, Fang L, Cai R, Zong C, Qi Y. Genkwanin inhibits proinflammatory mediators mainly through the regulation of miR-101/MKP-1/MAPK pathway in LPS-activated macrophages. *PLoS One*. 2014;9(5):e96741. doi: 10.1371/journal.pone.0096741.

Gibaldi M, Feldman S. Establishment of sink conditions in dissolution rate determinations. Theoretical considerations and application to nondisintegrating dosage forms. *J Pharm Sci*. 1967;56(10):1238-42. doi: 10.1002/jps.2600561005.

Gidwani B, Vyas A. A Comprehensive Review on Cyclodextrin-Based Carriers for Delivery of Chemotherapeutic Cytotoxic Anticancer Drugs. *Biomed Res Int*. 2015;2015:198268. doi: 10.1155/2015/198268.

Gimbrone MA Jr, García-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res*. 2016;118(4):620-36. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306301.

Golba B, Benetti EM, De Geest BG. Biomaterials applications of cyclic polymers. *Biomaterials*. 2021;267:120468. doi: 10.1016/j.biomaterials.2020.120468.

Goodwin CJ, Holt SJ, Downes S, Marshall NJ. Microculture tetrazolium assays: a comparison between two new tetrazolium salts, XTT and MTS. *J Immunol Methods*. 1995;179(1):95-103. doi: 10.1016/0022-1759(94)00277-4.

Gorinstein S, Leontowicz H, Leontowicz M, Jesion I, Namiesnik J, Drzewiecki J, Park YS, Ham KS, Giordani E, Trakhtenberg S. Influence of two cultivars of persimmon on atherosclerosis indices in rats fed cholesterol-containing diets: Investigation in vitro and in vivo. *Nutrition*. 2011;27(7-8):838-46. doi: 10.1016/j.nut.2010.08.015.

Gössl M, Versari D, Hildebrandt HA, Bajanowski T, Sangiorgi G, Erbel R, Ritman EL, Lerman LO, Lerman A. Segmental heterogeneity of vasa vasorum neovascularization in human coronary atherosclerosis. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2010;3(1):32-40. doi: 10.1016/j.jcmg.2009.10.009.

Gough PJ, Gomez IG, Wille PT, Raines EW. Macrophage expression of active MMP-9 induces acute plaque disruption in apoE-deficient mice. *J Clin Invest*. 2006;116(1):59-69. doi: 10.1172/JCI25074. Epub 2005 Dec 22.

Grange JM, Davey RW. Antibacterial properties of propolis (bee glue). *J R Soc Med*. 1990;83(3):159-60.

Granitzer P, Rumpf K. Porous Silicon—A Versatile Host Material. *Materials*. 2010;3(2):943-998. doi: 10.3390/ma3020943.

Gremmels H, de Jong OG, Hazenbrink DH, Fledderus JO, Verhaar MC. The Transcription Factor Nrf2 Protects Angiogenic Capacity of Endothelial Colony-Forming Cells in High-Oxygen Radical Stress Conditions. *Stem Cells Int*. 2017;2017:4680612. doi: 10.1155/2017/4680612.

Grunberger D, Banerjee R, Eisinger K, Oltz EM, Efros L, Caldwell M, Estevez V, Nakanishi K. Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia*. 1988;44(3):230-2. doi: 10.1007/BF01941717.

Gu HF, Mao XY, Du M. Prevention of breast cancer by dietary polyphenols-role of cancer stem cells. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2020;60(5):810-825. doi: 10.1080/10408398.2018.1551778.

Hansson GK, Libby P, Tabas I. Inflammation and plaque vulnerability. *J Intern Med.* 2015;278(5):483-93. doi: 10.1111/joim.12406.

Hartmann P, Schober A, Weber C. Chemokines and microRNAs in atherosclerosis. *Cell Mol Life Sci.* 2015;72(17):3253-66. doi: 10.1007/s00018-015-1925-z.

Heistad DD, Marcus ML, Larsen GE, Armstrong ML. Role of vasa vasorum in nourishment of the aortic wall. *Am J Physiol.* 1981;240(5):H781-7. doi: 10.1152/ajpheart.1981.240.5.H781.

Heleno SA, Martins A, Queiroz MJ, Ferreira IC. Bioactivity of phenolic acids: metabolites versus parent compounds: a review. *Food Chem.* 2015;173:501-13. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.10.057.

Herbert SP, Stainier DY. Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12(9):551-64. doi: 10.1038/nrm3176.

Hernandez-Montelongo J, Naveas N, Degoutin S, Tabary N, Chai F, Spampinato V, Ceccone G, Rossi F, Torres-Costa V, Manso-Silvan M, Martel B. Porous silicon-cyclodextrin based polymer composites for drug delivery applications. *Carbohydr Polym.* 2014;110:238-52. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.04.002.

Hernández-Montelongo J, Oria, L Cárdenas AB, Benito N, Romero-Sáez M, Recio-Sánchez G. Nanoporous Silicon Composite as Potential System for Sustained Delivery of Florfenicol Drug. *Phys. Status Solidi Basic Res.* 2018, 255.

Hernández-Montelongo, J.; Torres-Costa, V.; Martín-Palma, R.J.; Muñoz-Noval, Á.; Manso-Silván, M. Silicon-Based Nanoparticles for Biosensing and Biomedical Applications. In *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*; 2015.

Herrington W, Lacey B, Sherliker P, Armitage J, Lewington S. Epidemiology of Atherosclerosis and the Potential to Reduce the Global Burden of Atherothrombotic Disease. *Circ Res*. 2016;118(4):535-46. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.307611.

Higuchi T. Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *J Pharm Sci*. 1963;52:1145-9. doi: 10.1002/jps.2600521210.

Hirota K, Semenza GL. Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2006; 59(1):15-26. doi: 10.1016/j.critrevonc.2005.12.003.

Huang HC, Nguyen T, Pickett CB. Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. *J Biol Chem*. 2002;277(45):42769-74. doi: 10.1074/jbc.M206911200.

Hutter R, Speidl WS, Valdiviezo C, Sauter B, Corti R, Fuster V, Badimon JJ. Macrophages transmit potent proangiogenic effects of oxLDL in vitro and in vivo involving HIF-1 α activation: a novel aspect of angiogenesis in atherosclerosis. *J Cardiovasc Transl Res*. 2013;6(4):558-69. doi: 10.1007/s12265-013-9469-9.

Indo HP, Hawkins CL, Nakanishi I, Matsumoto KI, Matsui H, Suenaga S, Davies MJ, St Clair DK, Ozawa T, Majima HJ. Role of Mitochondrial Reactive Oxygen Species in the Activation of Cellular Signals, Molecules, and Function. *Handb Exp Pharmacol*. 2017;240:439-456. doi: 10.1007/164_2016_117.

Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, Oyake T, Hayashi N, Satoh K, Hatayama I, Yamamoto M, Nabeshima Y. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997; 236(2):313-22. doi: 10.1006/bbrc.1997.6943.

Jafary F, Panjehpour M, Varshosaz J, Yaghmaei P. Stability improvement of immobilized alkaline phosphatase using chitosan nanoparticles. *Brazilian J. Chem. Eng*. 2016;33 (2): 243-250. doi:10.1590/0104-6632.20160332s20140074.

Jakubczyk K, Dec K, Kałduńska J, Kawczuga D, Kochman J, Janda K. Reactive oxygen species - sources, functions, oxidative damage. *Pol Merkur Lekarski*. 2020;48(284):124-127.

Jiménez-Orsorio AS, Picazo A, González-Reyes S, Barrera-Oviedo D, Rodríguez-Arellano ME, Pedraza-Chaverri J. Nrf2 and redox status in prediabetic and diabetic patients. *Int J Mol Sci.* 2014;15(11):20290-305. doi: 10.3390/ijms151120290.

Kang ES, Woo IS, Kim HJ, Eun SY, Paek KS, Kim HJ, Chang KC, Lee JH, Lee HT, Kim JH, Nishinaka T, Yabe-Nishimura C, Seo HG. Up-regulation of aldose reductase expression mediated by phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and Nrf2 is involved in the protective effect of curcumin against oxidative damage. *Free Radic Biol Med.* 2007;43(4):535-45. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.05.006.

Kattoor AJ, Kanuri SH, Mehta JL. Role of Ox-LDL and LOX-1 in Atherogenesis. *Curr Med Chem.* 2019;26(9):1693-1700. doi: 10.2174/0929867325666180508100950.

Keum YS. Regulation of Nrf2-Mediated Phase II Detoxification and Anti-oxidant Genes. *Biomol Ther (Seoul).* 2012;20(2):144-51. doi: 10.4062/biomolther.2012.20.2.144.

Khatri JJ, Johnson C, Magid R, Lessner SM, Laude KM, Dikalov SI, Harrison DG, Sung HJ, Rong Y, Galis ZS. Vascular oxidant stress enhances progression and angiogenesis of experimental atheroma. *Circulation.* 2004;109(4):520-5. doi: 10.1161/01.CIR.0000109698.70638.2B.

Khor TO, Huang MT, Kwon KH, Chan JY, Reddy BS, Kong AN. Nrf2-deficient mice have an increased susceptibility to dextran sulfate sodium-induced colitis. *Cancer Res.* 2006;66(24):11580-4. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3562.

Kim JK, Jang HD. Nrf2-mediated HO-1 induction coupled with the ERK signaling pathway contributes to indirect antioxidant capacity of caffeic acid phenethyl ester in HepG2 cells. *Int J Mol Sci.* 2014;15(7):12149-65. doi: 10.3390/ijms150712149.

Kim YW, Byzova TV. Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. *Blood.* 2014;123(5):625-31. doi: 10.1182/blood-2013-09-512749.

Kobayashi A, Kang MI, Okawa H, Ohtsuji M, Zenke Y, Chiba T, Igarashi K, Yamamoto M. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol.* 2004;24(16):7130-9. doi: 10.1128/MCB.24.16.7130-7139.2004.

Korsmeyer, R.W.; Gurny, R.; Doelker, E.; Buri, P.; Peppas, N.A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *Int. J. Pharm.* 1983; 1(15):25–35. doi: 10.1016/0378-5173(83)90064-9

Krook MA, Hagerman AE. Stability of Polyphenols Epigallocatechin Gallate and Pentagalloyl Glucose in a Simulated Digestive System. *Food Res Int.* 2012;49(1):112-116. doi: 10.1016/j.foodres.2012.08.004.

Krupinski J, Kaluza J, Kumar P, Kumar S, Wang JM. Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke. *Stroke.* 1994;25(9):1794-8. doi: 10.1161/01.str.25.9.1794.

Kurzwaski M, Dziedziejko V, Urasińska E, Post M, Wójcicki M, Miętkiewski J, Drożdżik M. Nuclear factor erythroid 2-like 2 (Nrf2) expression in end-stage liver disease. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2012;34(1):87-95. doi: 10.1016/j.etap.2012.03.001.

Lall RK, Syed DN, Adhami VM, Khan MI, Mukhtar H. Dietary polyphenols in prevention and treatment of prostate cancer. *Int J Mol Sci.* 2015;16(2):3350-76. doi: 10.3390/ijms16023350.

Le Dall J, Ho-Tin-Noé B, Louedec L, Meilhac O, Roncal C, Carmeliet P, Germain S, Michel JB, Houard X. Immaturity of microvessels in haemorrhagic plaques is associated with proteolytic degradation of angiogenic factors. *Cardiovasc Res.* 2010;85(1):184-93. doi: 10.1093/cvr/cvp253.

Lechner K, von Schacky C, McKenzie AL, Worm N, Nixdorff U, Lechner B, Kränkel N, Halle M, Krauss RM, Scherr J. Lifestyle factors and high-risk atherosclerosis: Pathways and mechanisms beyond traditional risk factors. *Eur J Prev Cardiol.* 2020;27(4):394-406. doi: 10.1177/2047487319869400.

Lehmann V, Gösele U. Porous silicon formation: A quantum wire effect. *Appl. Phys. Lett.* 1991; 8(58): 856-58. doi: 10.1063/1.104512.

Lesser S, Cermak R, Wolfram S. Bioavailability of quercetin in pigs is influenced by the dietary fat content. *J Nutr.* 2004;134(6):1508-11. doi: 10.1093/jn/134.6.1508.

Li AN, Li S, Zhang YJ, Xu XR, Chen YM, Li HB. Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients.* 2014;6(12):6020-47. doi: 10.3390/nu6126020.

- Li J, Ichikawa T, Janicki JS, Cui T. Targeting the Nrf2 pathway against cardiovascular disease. *Expert Opin Ther Targets*. 2009;13(7):785-94. doi: 10.1517/14728220903025762.
- Li W, Thakor N, Xu EY, Huang Y, Chen C, Yu R, Holcik M, Kong AN. An internal ribosomal entry site mediates redox-sensitive translation of Nrf2. *Nucleic Acids Res*. 2010;38(3):778-88. doi: 10.1093/nar/gkp1048.
- Lian T, Peng M, Vermorken AJ, Jin Y, Luo Z, Van de Ven WJ, Wan Y, Hou P, Cui Y. Synthesis and Characterization of Curcumin-Functionalized HP- β -CD-Modified GoldMag Nanoparticles as Drug Delivery Agents. *J Nanosci Nanotechnol*. 2016;16(6):6258-64. doi: 10.1166/jnn.2016.11370.
- Libby P, Buring JE, Badimon L, Hansson GK, Deanfield J, Bittencourt MS, Tokgözoğlu L, Lewis EF. Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2019;5(1):56. doi: 10.1038/s41572-019-0106-z.
- Libby P, Pasterkamp G. Requiem for the 'vulnerable plaque'. *Eur Heart J*. 2015;36(43):2984-7. doi: 10.1093/eurheartj/ehv349.
- Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420(6917):868-74. doi: 10.1038/nature01323.
- Liu D, Zhang H, Herranz-Blanco B, Mäkilä E, Lehto VP, Salonen J, Hirvonen J, Santos HA. Microfluidic assembly of monodisperse multistage pH-responsive polymer/porous silicon composites for precisely controlled multi-drug delivery. *Small*. 2014;10(10):2029-38. doi: 10.1002/smll.201303740.
- Liu XQ, Mao Y, Wang B, Lu XT, Bai WW, Sun YY, Liu Y, Liu HM, Zhang L, Zhao YX, Zhang Y. Specific matrix metalloproteinases play different roles in intraplaque angiogenesis and plaque instability in rabbits. *PLoS One*. 2014;9(9):e107851. doi: 10.1371/journal.pone.0107851.
- Lu H, Daugherty A. Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015 Mar;35(3):485-91. doi: 10.1161/ATVBAHA.115.305380. Erratum in: *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016;36(4):e32.

Luca SV, Macovei I, Bujor A, Miron A, Skalicka-Woźniak K, Aprotosoae AC, Trifan A. Bioactivity of dietary polyphenols: The role of metabolites. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2020;60(4):626-659. doi: 10.1080/10408398.2018.1546669.

Ma Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2013;53:401-26. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320.

Mac Gabhann F, Popel AS. Systems biology of vascular endothelial growth factors. *Microcirculation*. 2008;15(8):715-38. doi: 10.1080/10739680802095964.

Mada SB, Reddi S, Kumar N, Kapila S, Kapila R. Protective effects of casein-derived peptide VLPVPQK against hydrogen peroxide-induced dysfunction and cellular oxidative damage in rat osteoblastic cells. *Hum Exp Toxicol*. 2017;36(9):967-980. doi: 10.1177/0960327116678293.

Magesh S, Chen Y, Hu L. Small molecule modulators of Keap1-Nrf2-ARE pathway as potential preventive and therapeutic agents. *Med Res Rev*. 2012;32(4):687-726. doi: 10.1002/med.21257.

Maicas N, Ferrándiz ML, Brines R, Ibáñez L, Cuadrado A, Koenders MI, van den Berg WB, Alcaraz MJ. Deficiency of Nrf2 accelerates the effector phase of arthritis and aggravates joint disease. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(4):889-901. doi: 10.1089/ars.2010.3835.

Manach C, Morand C, Gil-Izquierdo A, Bouteloup-Demange C, Rémésy C. Bioavailability in humans of the flavanones hesperidin and narirutin after the ingestion of two doses of orange juice. *Eur J Clin Nutr*. 2003;57(2):235-42. doi: 10.1038/sj.ejcn.1601547.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*. 2004;79(5):727-47. doi: 10.1093/ajcn/79.5.727.

Maniya, N.H.; Patel, S.R.; Murthy, Z.V.P. Drug delivery with porous silicon films, microparticles, and nanoparticles. *Rev. Adv. Mater. Sci*. 2016; 44:257-72.

Martín-Palma RJ, Hernández-Montelongo J, Torres-Costa V, Manso-Silván M, Muñoz-Noval Á. Nanostructured porous silicon-mediated drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*. 2014;11(8):1273-83. doi: 10.1517/17425247.2014.919254.

- Mauriello A, Servadei F, Zoccai GB, Giacobbi E, Anemona L, Bonanno E, Casella S. Coronary calcification identifies the vulnerable patient rather than the vulnerable Plaque. *Atherosclerosis*. 2013;229(1):124-9. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.03.010.
- McIntosh IM, Nichols ARL, Tani K, Llewellyn EW. Accounting for the species-dependence of the 3500 cm⁻¹ H₂O_i infrared molar absorptivity coefficient: Implications for hydrated volcanic glasses. *Am. Mineral*. 2017;8(102):1677-89. doi: 10.2138/am-2017-5952CCBY
- McMahon M, Lamont DJ, Beattie KA, Hayes JD. Keap1 perceives stress via three sensors for the endogenous signaling molecules nitric oxide, zinc, and alkenals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(44):18838-43. doi: 10.1073/pnas.1007387107.
- McMahon M, Thomas N, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD. Dimerization of substrate adaptors can facilitate cullin-mediated ubiquitylation of proteins by a "tethering" mechanism: a two-site interaction model for the Nrf2-Keap1 complex. *J Biol Chem*. 2006;281(34):24756-68. doi: 10.1074/jbc.M601119200.
- Mi Y, Zhang W, Tian H, Li R, Huang S, Li X, Qi G, Liu X. EGCG evokes Nrf2 nuclear translocation and dampens PTP1B expression to ameliorate metabolic misalignment under insulin resistance condition. *Food Funct*. 2018;9(3):1510-1523. doi: 10.1039/c7fo01554b.
- Milbury PE, Vita JA, Blumberg JB. Anthocyanins are bioavailable in humans following an acute dose of cranberry juice. *J Nutr*. 2010;140(6):1099-104. doi: 10.3945/jn.109.117168.
- Miller CJ, Gounder SS, Kannan S, Goutam K, Muthusamy VR, Firpo MA, Symons JD, Paine R 3rd, Hoidal JR, Rajasekaran NS. Disruption of Nrf2/ARE signaling impairs antioxidant mechanisms and promotes cell degradation pathways in aged skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1822(6):1038-50. doi: 10.1016/j.bbadis.2012.02.007.
- Ming Guo, MD, Jun-He Shi, Pei-Li Wang and Da-Zhuo Shi. Angiogenic Growth Factors for Coronary Artery Disease: Current Status and Prospects. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*. 2017; 1-12. doi: 10.1177/1074248417735399.

Mo L, Yang C, Gu M, Zheng D, Lin L, Wang X, Lan A, Hu F, Feng J. PI3K/Akt signaling pathway-induced heme oxygenase-1 upregulation mediates the adaptive cytoprotection of hydrogen peroxide preconditioning against oxidative injury in PC12 cells. *Int J Mol Med*. 2012;30(2):314-20. doi: 10.3892/ijmm.2012.1002.

Moi P, Chan K, Asunis I, Cao A, Kan YW. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(21):9926-30. doi: 10.1073/pnas.91.21.9926.

Moinova HR, Mulcahy RT. Up-regulation of the human gamma-glutamylcysteine synthetase regulatory subunit gene involves binding of Nrf-2 to an electrophile responsive element. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;261(3):661-8. doi: 10.1006/bbrc.1999.1109.

Moldogazieva NT, Lutsenko SV, Terentiev AA. Reactive Oxygen and Nitrogen Species-Induced Protein Modifications: Implication in Carcinogenesis and Anticancer Therapy. *Cancer Res*. 2018;78(21):6040-6047. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0980.

Moldogazieva NT, Mokhosoev IM, Feldman NB, Lutsenko SV. ROS and RNS signalling: adaptive redox switches through oxidative/nitrosative protein modifications. *Free Radic Res*. 2018;52(5):507-543. doi: 10.1080/10715762.2018.1457217.

Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell*. 2011;145(3):341-55. doi: 10.1016/j.cell.2011.04.005.

Moreno PR, Purushothaman KR, Fuster V, Echeverri D, Truszczyńska H, Sharma SK, Badimon JJ, O'Connor WN. Plaque neovascularization is increased in ruptured atherosclerotic lesions of human aorta: implications for plaque vulnerability. *Circulation*. 2004;110(14):2032-8. doi: 10.1161/01.

Moya-Ortega MD, Alvarez-Lorenzo C, Concheiro A, Loftsson T. Cyclodextrin-based nanogels for pharmaceutical and biomedical applications. *Int J Pharm*. 2012;428(1-2):152-63. doi: 10.1016/j.ijpharm.2012.02.038.

Murakami S, Motohashi H. Roles of Nrf2 in cell proliferation and differentiation. *Free Radic Biol Med*. 2015;88(Pt B):168-178. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.030.

Mury P, Chirico EN, Mura M, Millon A, Canet-Soulas E, Pialoux V. Oxidative Stress and Inflammation, Key Targets of Atherosclerotic Plaque Progression and Vulnerability: Potential Impact of Physical Activity. *Sports Med.* 2018;48(12):2725-2741. doi: 10.1007/s40279-018-0996-z.

Mushenkova NV, Summerhill VI, Zhang D, Romanenko EB, Grechko AV, Orekhov AN. Current Advances in the Diagnostic Imaging of Atherosclerosis: Insights into the Pathophysiology of Vulnerable Plaque. *Int J Mol Sci.* 2020;21(8):2992. doi: 10.3390/ijms21082992.

Nagaraju GP, Zhu S, Ko JE, Ashritha N, Kandimalla R, Snyder JP, Shoji M, El-Rayes BF. Antiangiogenic effects of a novel synthetic curcumin analogue in pancreatic cancer. *Cancer Lett.* 2015;357(2):557-65. doi: 10.1016/j.canlet.2014.12.007.

Nakagawa K, Shibata A, Saito T, Sookwong P, Kato S, Tsuduki T, Matsubara K, Miyazawa T. Phosphatidylcholine hydroperoxide promotes VEGF-induced angiogenesis in endothelial cells and rat aorta ring cultures. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1810(12):1205-11. doi: 10.1016/j.bbagen.2011.08.018.

Nguyen T, Sherratt PJ, Pickett CB. Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2003;43:233-60. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.140229.

Nioi P, McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD. Identification of a novel Nrf2-regulated antioxidant response element (ARE) in the mouse NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene: reassessment of the ARE consensus sequence. *Biochem J.* 2003;374(Pt 2):337-48. doi: 10.1042/BJ20030754.

Niture SK, Jain AK, Jaiswal AK. Antioxidant-induced modification of INrf2 cysteine 151 and PKC-delta-mediated phosphorylation of Nrf2 serine 40 are both required for stabilization and nuclear translocation of Nrf2 and increased drug resistance. *J Cell Sci.* 2009;122(Pt 24):4452-64. doi: 10.1242/jcs.058537.

Norata GD, Marchesi P, Passamonti S, Pirillo A, Violi F, Catapano AL. Anti-inflammatory and anti-atherogenic effects of catechin, caffeic acid and trans-resveratrol in apolipoprotein E deficient mice. *Atherosclerosis.* 2007;191(2):265-71. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2006.05.047.

Paeng SH, Jung WK, Park WS, Lee DS, Kim GY, Choi YH, Seo SK, Jang WH, Choi JS, Lee YM, Park S, Choi IW. Caffeic acid phenethyl ester reduces the secretion of vascular endothelial growth factor through the inhibition of the ROS, PI3K and HIF-1 α signaling pathways in human retinal pigment epithelial cells under hypoxic conditions. *Int J Mol Med*. 2015;35(5):1419-26. doi: 10.3892/ijmm.2015.2116.

Pandareesh MD, Mythri RB, Srinivas Bharath MM. Bioavailability of dietary polyphenols: Factors contributing to their clinical application in CNS diseases. *Neurochem Int*. 2015;89:198-208. doi: 10.1016/j.neuint.2015.07.003.

Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2009;2(5):270-8. doi: 10.4161/oxim.2.5.9498.

Parma L, Baganha F, Quax PHA, de Vries MR. Plaque angiogenesis and intraplaque hemorrhage in atherosclerosis. *Eur J Pharmacol*. 2017;816:107-115. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.04.028.

Perrie Y, Rades T. FASTtrack Pharmaceuticals: Drug Delivery and Targeting. *Eur. J. Pharm. Sci*. 2009.

Perrotta P, Emini Veseli B, Van der Veken B, Roth L, Martinet W, De Meyer GRY. Pharmacological strategies to inhibit intra-plaque angiogenesis in atherosclerosis. *Vascul Pharmacol*. 2019;112:72-78. doi: 10.1016/j.vph.2018.06.014.

Perruchot C, Khan MA, Kamitsi A, Armes SP, Von Werne T, Patten TE. Synthesis of well-defined, polymer-grafted silica particles by aqueous ATRP. *Langmuir* 2001; 17(15): 4479-81. doi: 10.1021/la0102758.

Petrova E, Bogoslovskaya K, Balagurov L, Kochoradze G. Room temperature oxidation of porous silicon in air. *Mat Sci Eng B*. 2000;69:152-156. doi: 10.1016/S0921-5107(99)00240-8.

Potì F, Santi D, Spaggiari G, Zimetti F, Zanotti I. Polyphenol Health Effects on Cardiovascular and Neurodegenerative Disorders: A Review and Meta-Analysis. *Int J Mol Sci*. 2019;20(2):351. doi: 10.3390/ijms20020351.

Raghunath A, Sundarraj K, Nagarajan R, Arfuso F, Bian J, Kumar AP, Sethi G, Perumal E. Antioxidant response elements: Discovery, classes, regulation and potential applications. *Redox Biol.* 2018;17:297-314. doi: 10.1016/j.redox.2018.05.002.

Ravishankar D, Watson KA, Boateng SY, Green RJ, Greco F, Osborn HM. Exploring quercetin and luteolin derivatives as antiangiogenic agents. *Eur J Med Chem.* 2015;97:259-74. doi: 10.1016/j.ejmech.2015.04.056.

Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal.* 2012;24(5):981-90. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.01.008.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999;26(9-10):1231-7. doi: 10.1016/s0891-5849(98)00315-3.

Reddy N, Reddy R, Jiang Q. Crosslinking biopolymers for biomedical applications. *Trends Biotechnol.* 2015;33(6):362-9. doi: 10.1016/j.tibtech.2015.03.008.

Reffitt DM, Jugdaohsingh R, Thompson RP, Powell JJ. Silicic acid: its gastrointestinal uptake and urinary excretion in man and effects on aluminium excretion. *J Inorg Biochem.* 1999;76(2):141-7. doi: 10.1016/s0162-0134(99)00126-9.

Rhee SG, Bae YS, Lee SR, Kwon J. Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. *Sci STKE.* 2000;2000(53):pe1. doi: 10.1126/stke.2000.53.pe1.

Rhee SG, Yang KS, Kang SW, Woo HA, Chang TS. Controlled elimination of intracellular H₂O₂: regulation of peroxiredoxin, catalase, and glutathione peroxidase via post-translational modification. *Antioxid Redox Signal.* 2005;7(5-6):619-26. doi: 10.1089/ars.2005.7.619.

Ribatti D, Annese T, Tamma R. The use of the chick embryo CAM assay in the study of angiogenic activity of biomaterials. *Microvasc Res.* 2020;131:104026. doi: 10.1016/j.mvr.2020.104026.

Ribatti D, Nico B, Crivellato E. The role of pericytes in angiogenesis. *Int J Dev Biol*. 2011;55(3):261-8. doi: 10.1387/ijdb.103167dr.

Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay. *Reprod Toxicol*. 2017;70:97-101. doi: 10.1016/j.reprotox.2016.11.004.

Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997;386(6626):671-4. doi: 10.1038/386671a0.

Rushmore TH, Morton MR, Pickett CB. The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J Biol Chem*. 1991;266(18):11632-9.

Salonen J, Laitinen L, Kaukonen AM, Tuura J, Björkqvist M, Heikkilä T, Vähä-Heikkilä K, Hirvonen J, Lehto VP. Mesoporous silicon microparticles for oral drug delivery: loading and release of five model drugs. *J Control Release*. 2005;108(2-3):362-74. doi: 10.1016/j.jconrel.2005.08.017.

Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol*. 2014;24(10):R453-62. doi: 10.1016/j.cub.2014.03.034.

Sedlak L, Wojnar W, Zych M, Wyględowska-Promieńska D, Mrukwa-Kominek E, Kaczmarczyk-Sedlak I. Effect of Resveratrol, a Dietary-Derived Polyphenol, on the Oxidative Stress and Polyol Pathway in the Lens of Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes. *Nutrients*. 2018;10(10):1423. doi: 10.3390/nu10101423.

Sforcin JM, Bankova V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *J Ethnopharmacol*. 2011;133(2):253-60. doi: 10.1016/j.jep.2010.10.032.

Shafaat S, Mangir N, Regureos SR, Chapple CR, MacNeil S. Demonstration of improved tissue integration and angiogenesis with an elastic, estradiol releasing polyurethane material designed for use in pelvic floor repair. *Neurourol Urodyn*. 2018;37(2):716-725. doi: 10.1002/nau.23510.

Sies H, Jones DP. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020;21(7):363-383. doi: 10.1038/s41580-020-0230-3.

Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol.* 2017;11:613-619. doi: 10.1016/j.redox.2016.12.035.

Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.* 2015;4:180-3. doi: 10.1016/j.redox.2015.01.002.

Silva-Carvalho R, Baltazar F, Almeida-Aguiar C. Propolis: A Complex Natural Product with a Plethora of Biological Activities That Can Be Explored for Drug Development. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015;2015:206439. doi: 10.1155/2015/206439.

Silva-Islas CA, Maldonado PD. Canonical and non-canonical mechanisms of Nrf2 activation. *Pharmacol Res.* 2018;134:92-99. doi: 10.1016/j.phrs.2018.06.013.

Silvestre-Roig C, de Winther MP, Weber C, Daemen MJ, Lutgens E, Soehnlein O. Atherosclerotic plaque destabilization: mechanisms, models, and therapeutic strategies. *Circ Res.* 2014;114(1):214-26. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.302355.

Simonetti P, Gardana C, Pietta P. Caffeic acid as biomarker of red wine intake. *Methods Enzymol.* 2001;335:122-30. doi: 10.1016/s0076-6879(01)35237-0.

Singh P, Chauhan K, Priya V, Singhal, RK. A greener approach for impressive removal of As(III)/As(V) from an ultra-low concentration using a highly efficient chitosan thiomers as a new adsorbent. *RSC Adv.* 2016;6:64946-61. doi: 10.1039/C6RA10595E.

Sirota R, Gibson D, Kohen R. The role of the catecholic and the electrophilic moieties of caffeic acid in Nrf2/Keap1 pathway activation in ovarian carcinoma cell lines. *Redox Biol.* 2015;4:48-59. doi: 10.1016/j.redox.2014.11.012.

Skiba M, Lahiani-Skiba M. Novel method for preparation of cyclodextrin polymers: Physico-chemical characterization and cytotoxicity. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem* 2013; 75(3-4):341-49. doi: 10.1007/s10847-012-0246-1.

Sluimer JC, Gasc JM, van Wanroij JL, Kisters N, Groeneweg M, Sollewijn Gelpke MD, Cleutjens JP, van den Akker LH, Corvol P, Wouters BG, Daemen MJ, Bijnens AP. Hypoxia, hypoxia-inducible transcription factor, and macrophages in human atherosclerotic plaques are correlated with intraplaque angiogenesis. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51(13):1258-65. doi: 10.1016/j.jacc.2007.12.025.

Sluimer JC, Kolodgie FD, Bijnens AP, Maxfield K, Pacheco E, Kutys B, Duimel H, Frederik PM, van Hinsbergh VW, Virmani R, Daemen MJ. Thin-walled microvessels in human coronary atherosclerotic plaques show incomplete endothelial junctions relevance of compromised structural integrity for intraplaque microvascular leakage. *J Am Coll Cardiol*. 2009;53(17):1517-27. doi: 10.1016/j.jacc.2008.12.056.

Suarez KA, Ponce SM, López J.T, Cornejo JM, Oropeza MT, López EA. Eco-friendly innovation for nejayote coagulation-flocculation process using chitosan: Evaluation through zeta potential measurements. *Chem. Eng. J*. 2016; 284, 536-42. doi: 10.1016/j.cej.2015.09.026

Sun Z, Huang Z, Zhang DD. Phosphorylation of Nrf2 at multiple sites by MAP kinases has a limited contribution in modulating the Nrf2-dependent antioxidant response. *PLoS One*. 2009;4(8):e6588. doi: 10.1371/journal.pone.0006588.

Sun Z. Atherosclerosis and atheroma plaque rupture: imaging modalities in the visualization of vasa vasorum and atherosclerotic plaques. *Sci. World J*. 2014;2014:312764. doi: 10.1155/2014/312764.

Suzuki T, Yamamoto M. Molecular basis of the Keap1-Nrf2 system. *Free Radic Biol Med*. 2015;88(Pt B):93-100. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.006.

Świsłocka R. Spectroscopic (FT-IR, FT-Raman, UV absorption, ¹H and ¹³C NMR) and theoretical (in B3LYP/6-311++G** level) studies on alkali metal salts of caffeic acid. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2013;100:21-30. doi: 10.1016/j.saa.2012.01.048.

Szliszka E, Sokół-Łętowska A, Kucharska AZ, Jaworska D, Czuba ZP, Król W. Ethanollic Extract of Polish Propolis: Chemical Composition and TRAIL-R2 Death Receptor Targeting Apoptotic Activity against Prostate Cancer Cells. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:757628. doi: 10.1155/2013/757628.

Taguchi K, Motohashi H, Yamamoto M. Molecular mechanisms of the Keap1–Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells*. 2011;16(2):123-40. doi: 10.1111/j.1365-2443.2010.01473.x.

Tan-No K, Nakajima T, Shoji T, Nakagawasai O, Nijima F, Ishikawa M, Endo Y, Sato T, Satoh S, Tadano T. Anti-inflammatory effect of propolis through inhibition of nitric oxide production on carrageenin-induced mouse paw edema. *Biol Pharm Bull*. 2006;29(1):96-9. doi: 10.1248/bpb.29.96.

Tanaka K, Nagata D, Hirata Y, Tabata Y, Nagai R, Sata M. Augmented angiogenesis in adventitia promotes growth of atherosclerotic plaque in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis*. 2011;215(2):366-73. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.01.016.

Tian J, Hou J, Xing L, Kim SJ, Yonetsu T, Kato K, Lee H, Zhang S, Yu B, Jang IK. Significance of intraplaque neovascularisation for vulnerability: optical coherence tomography study. *Heart*. 2012;98(20):1504-9. doi: 10.1136/heartjnl-2012-302445.

Tkachev VO, Menshchikova EB, Zenkov NK. Mechanism of the Nrf2/Keap1/ARE signaling system. *Biochemistry (Mosc)*. 2011;76(4):407-22. doi: 10.1134/s0006297911040031.

Turrini E, Ferruzzi L, Fimognari C. Potential Effects of Pomegranate Polyphenols in Cancer Prevention and Therapy. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:938475. doi: 10.1155/2015/938475.

Van der Veken B, De Meyer GR, Martinet W. Intraplaque neovascularization as a novel therapeutic target in advanced atherosclerosis. *Expert Opin Ther Targets*. 2016;20(10):1247-57. doi: 10.1080/14728222.2016.1186650.

Varinska L, Gal P, Mojzisova G, Mirossay L, Mojzis J. Soy and breast cancer: focus on angiogenesis. *Int J Mol Sci*. 2015;16(5):11728-49. doi: 10.3390/ijms160511728.

Venugopal R, Jaiswal AK. Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(25):14960-5. doi: 10.1073/pnas.93.25.14960.

Vermeris, W.; Nicholson, R. Phenolic compound biochemistry; 2006; ISBN 9781402051630.

Virmani R, Burke AP, Farb A, Kolodgie FD. Pathology of the vulnerable plaque. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47(8 Suppl):C13-8. doi: 10.1016/j.jacc.2005.10.065.

Virmani R, Joner M, Sakakura K. Recent highlights of ATVB: calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(7):1329-32. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304000.

Williams DF. On the nature of biomaterials. *Biomaterials*. 2009;30(30):5897-909. doi: 10.1016/j.

Woodman OL, Chan ECh. Vascular and anti-oxidant actions of flavonols and flavones. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2004;31(11):786-90. doi: 10.1111/j.1440-1681.2004.04072.x.

Wu SH, Mou CY, Lin HP. Synthesis of mesoporous silica nanoparticles. *Chem Soc Rev*. 2013;42(9):3862-75. doi: 10.1039/c3cs35405a.

Yamamoto T, Suzuki T, Kobayashi A, Wakabayashi J, Maher J, Motohashi H, Yamamoto M. Physiological significance of reactive cysteine residues of Keap1 in determining Nrf2 activity. *Mol Cell Biol*. 2008;28(8):2758-70. doi: 10.1128/MCB.01704-07.

Yang GW, Jiang JS, Lu WQ. Ferulic Acid Exerts Anti-Angiogenic and Anti-Tumor Activity by Targeting Fibroblast Growth Factor Receptor 1-Mediated Angiogenesis. *Int J Mol Sci*. 2015;16(10):24011-31. doi: 10.3390/ijms161024011.

Yang KY, Lin LC, Tseng TY, Wang SC, Tsai TH. Oral bioavailability of curcumin in rat and the herbal analysis from *Curcuma longa* by LC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007;853(1-2):183-9. doi: 10.1016/j.jchromb.2007.03.010.

Yao P, Nussler A, Liu L, Hao L, Song F, Schirmeier A, Nussler N. Quercetin protects human hepatocytes from ethanol-derived oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via the MAPK/Nrf2 pathways. *J Hepatol*. 2007;47(2):253-61. doi: 10.1016/j.jhep.2007.02.008.

Yu R, Lei W, Mandlekar S, Weber MJ, Der CJ, Wu J, Kong AN. Role of a mitogen-activated protein kinase pathway in the induction of phase II detoxifying enzymes by chemicals. *J Biol Chem*. 1999;274(39):27545-52. doi: 10.1074/jbc.274.39.27545.

Yurdagul A Jr, Doran AC, Cai B, Fredman G, Tabas IA. Mechanisms and Consequences of Defective Efferocytosis in Atherosclerosis. *Front Cardiovasc Med*. 2018;4:86. doi: 10.3389/fcvm.2017.00086.

Zhang DD, Hannink M. Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Mol Cell Biol*. 2003;23(22):8137-51. doi: 10.1128/MCB.23.22.8137-8151.2003.

Zhang Y, Zhu XB, Zhao JC, Gao XF, Zhang XN, Hou K. Neuroprotective effect of resveratrol against radiation after surgically induced brain injury by reducing oxidative stress, inflammation, and apoptosis through Nrf2/HO-1/NF- κ B signaling pathway. *J Biochem Mol Toxicol*. 2020;34(12):e22600. doi: 10.1002/jbt.22600.

Zhao Q, Li Z. Angiogenesis. *Biomed Res Int*. 2015;2015:135861. doi: 10.1155/2015/135861.

11. ANEXOS

11.1 Copia artículo publicado



pharmaceutics



Article

Use of nPSi-βCD Composite Microparticles for the Controlled Release of Caffeic Acid and Pinocembrin, Two Main Polyphenolic Compounds Found in a Chilean Propolis

Dina Guzmán-Oyarzo ¹, Tanya Plaza ², Gonzalo Recio-Sánchez ^{2,3}, Dulcinea S. P. Abdalla ⁴, Luis A. Salazar ^{1,*} and Jacobo Hernández-Montelongo ^{2,3,*}

¹ Center of Molecular Biology and Pharmacogenetics, Scientific and Technological Bioresource Nucleus (BIOREN), Universidad de La Frontera, Avenida Francisco Salazar 01145, Temuco 4811230, Chile; dina.guzman.o@gmail.com

² Bioproducts and Advanced Materials Research Center (BioMA), Faculty of Engineering, Universidad Católica de Temuco, Avenida Rudecindo Ortega 02950, Temuco 4813302, Chile; tplaza.neira@gmail.com (T.P.); grecio@uct.cl (G.R.-S.)

³ Department of Physical and Mathematical Sciences, Faculty of Engineering, Universidad Católica de Temuco, Temuco 4813302, Chile

⁴ Department of Clinical and Toxicological Analyses, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Universidade de São Paulo, Avenida Professor Lineu Prestes 580, CEP 05508-000 São Paulo, SP, Brazil; dspabdalla@gmail.com

* Correspondence: luis.salazar@ufrontera.cl (L.A.S.); jacob.hernandez@uct.cl (J.H.-M.); Tel.: +56-452-596724 (L.A.S.); +56-452-553947 (J.H.-M.)

Received: 13 May 2019; Accepted: 17 June 2019; Published: 19 June 2019



Abstract: Propolis is widely recognized for its various therapeutic properties. These are attributed to its rich composition in polyphenols, which exhibit multiple biological properties (e.g., antioxidant, anti-inflammatory, anti-angiogenic). Despite its multiple benefits, oral administration of polyphenols results in low bioavailability at the action site. An alternative to face this problem is the use of biomaterials at nano-micro scale due to its high versatility as carriers and delivery systems of various drugs and biomolecules. The aim of this work is to determine if nPSi-βCD microparticles are a suitable material for the load and controlled release of caffeic acid (CA) and pinocembrin (Pin), two of the main components of a Chilean propolis with anti-atherogenic and anti-angiogenic activity. Polyphenols and nPSi-βCD microparticles cytocompatibility studies were carried out with human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). Results from physicochemical characterization demonstrated nPSi-βCD microparticles successfully retained and controlled release CA and Pin. Furthermore, nPSi-βCD microparticles presented cytocompatibility with HUVECs culture at concentrations of 0.25 mg/mL. These results suggest that nPSi-βCD microparticles could safely be used as an alternate oral delivery system to improve controlled release and bioavailability of CA or Pin—and eventually other polyphenols—thus enhancing its therapeutic effect for the treatment of different diseases.

Keywords: controlled release; nanoporous silicon; βCD polymer; caffeic acid; pinocembrin; polyphenols; HUVECs

1. Introduction

Since ancient times, the use of natural compounds has been of great importance for medicine mainly in the prevention and treatment of different pathologies [1,2]. That is why they represent the main source of used compounds in the discovery and/or development of new drugs [3]. An example of natural compounds with bioactive potential is propolis, which is a resinous compound produced

11.2 Copia artículo publicado

Int. J. Morphol.,
38(1):135-139, 2020.

Efecto Antiangiogénico del Ácido Cafeico y Pinocembrina en el Proceso de Angiogénesis Fisiológica de Fetos de Pollo

Anti-Angiogenic Effect of Caffeic Acid and Pinocembrin in the Process of Physiological Angiogenesis of Chicken Fetuses

Patricia Olivares O.¹; María Paz Riquelme¹; Pedro Leiva A.^{1,2}; Luis A. Salazar³; Dina Guzmán-Oyarzo¹ & Carlos Rosas C.²

OLIVARES, O. P.; RIQUELME, M. P.; LEIVA, A. P.; SALAZAR, L. A.; GUZMÁN-OYARZO, D. & ROSAS, C. C. Efecto antiangiogénico del ácido cafeico y pinocembrina en el proceso de angiogénesis fisiológica de fetos de pollo. *Int. J. Morphol.*, 38(1):135-139, 2020.

RESUMEN: La angiogénesis es el proceso por el cual se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de otros ya existentes. Para que esto se lleve a cabo de forma correcta debe existir un balance entre los factores proangiogénicos y los factores antiangiogénicos dentro del microambiente tisular. Por otra parte, la existencia de productos químicos naturales como los polifenoles, que son capaces de adquirirse en la dieta, inducen a estos factores a intervenir en el proceso de angiogénesis. Se administraron los polifenoles en filtros de metilcelulosa sobre la membrana alantocoriónica de huevos White Leghorn, manteniendo el posterior desarrollo normal del feto. Se utilizaron 15 fetos de pollo fijados en formalina tamponada, a los cuales se extrajo el corazón. El procesamiento de las muestras de corazón se realizó a través de técnicas histológicas, histoquímicas e inmunohistoquímica. Finalmente se evaluó la presencia del VEGF y la capacidad de formar vasos sanguíneos bajo el tratamiento con los polifenoles. La inmunoreactividad fue cuantificada mediante Image J®. Los resultados indican que Ácido cafeico y Pinocembrina disminuyen la densidad microvascular y la expresión de VEGF en corazones de fetos de pollo tratados con estos polifenoles. Tanto el Ácido Cafeico como la Pinocembrina cumplen un rol inhibitorio en el proceso de angiogénesis fisiológica en corazón de pollo, pudiendo modular las vías de señalización mediadas por los VEGFR o modulando la disponibilidad de VEGF. Estos polifenoles podrían utilizarse para el estudio de otros tejidos asociados a angiogénesis patológica.

PALABRAS CLAVE: Angiogénesis; Polifenoles; Ácido Cafeico; Pinocembrina.

INTRODUCCIÓN

La angiogénesis es el proceso por el cual se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de otros ya existentes, esto gracias a la acción de las células endoteliales que recubren la superficie interna de los vasos para ayudar al crecimiento y la reparación del tejido, que migran y proliferan, organizándose hasta formar estructuras tubulares que eventualmente se unirán, para finalmente madurar en vasos sanguíneos estables (Fakhrejahani & Toi, 2012). La angiogénesis fisiológica ocurre durante el desarrollo embrionario y fetal y, en el adulto, durante el crecimiento esquelético, el ciclo menstrual y el embarazo (Chung & Ferrara, 2011). También se reactivará en respuesta a estímulos fisiológicos durante la cicatrización de heridas y la inflamación (Li *et al.*, 2003), y después de un injerto de tejido o isquemia (Chung *et al.*, 2010).

Un balance entre los mediadores químicos que la promueven (factores proangiogénicos) y los que la inhiben (factores antiangiogénicos) dentro del microambiente tisular es necesario para el correcto funcionamiento de la angiogénesis. El principal estímulo proangiogénico es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); el cual pertenece a una familia compuesta por cinco proteínas homodiméricas. La proteína más importante es VEGF-A que regula la angiogénesis y la permeabilidad vascular mediante la activación de dos receptores el VEGFR-1 y VEGFR-2. La vía de señalización de VEGF se ha establecido como el principal regulador de la angiogénesis, en donde las células endoteliales expresan el receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR-2), un receptor de tirosina quinasa que impulsa positivamente las

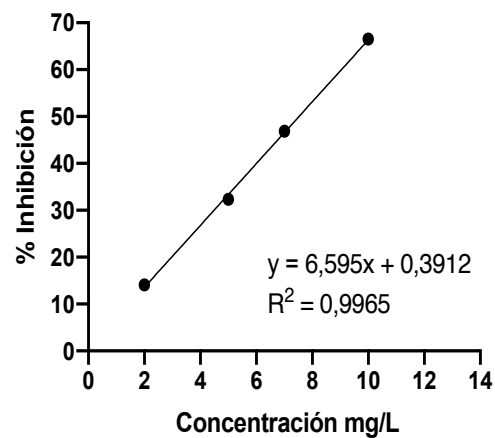
¹ Escuela de Tecnología Médica, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad San Sebastián, Santiago, Chile

² Departamento de Ciencias Morfológicas, Facultad de Medicina y Ciencia, Universidad San Sebastián, Santiago, Chile.

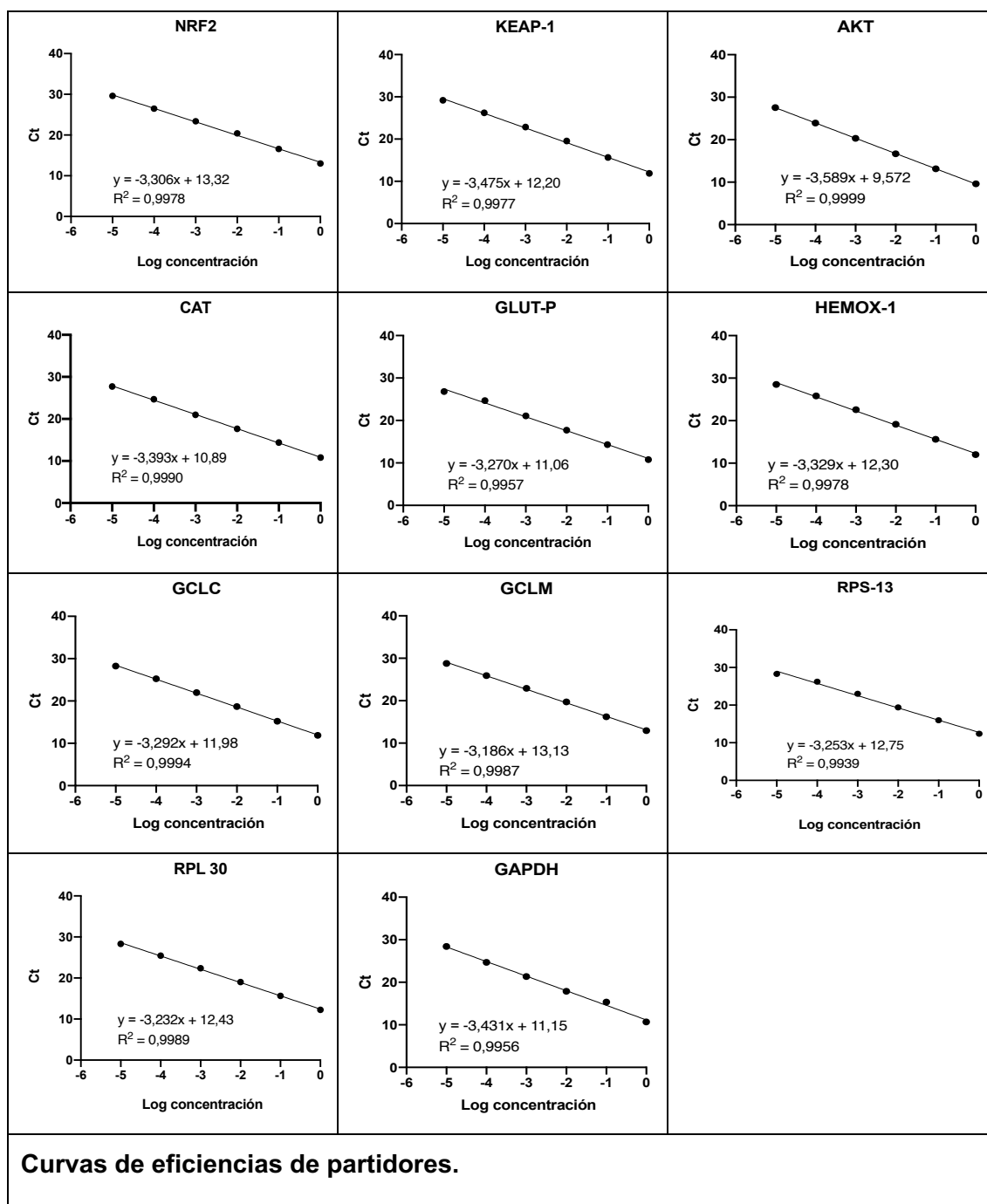
³ Centro de Farmacogenética y Biología Molecular, Núcleo de Biorrecursos Tecnológico y Científico (BIOREN), Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

11.3 Curva de calibración de Trolox para capacidad antioxidante.

Trolox (mg/L)	Abs	% Inhibición	% Inhibición promedio
2	0,601	13,90	14,1
	0,600	14,04	
	0,598	14,33	
	0,470	32,66	
5	0,473	32,23	32,4
	0,473	32,23	
	0,368	47,28	
	0,367	47,42	
7	0,367	47,42	46,8
	0,378	45,85	
	0,218	68,77	
	0,234	66,48	
10	0,234	66,48	66,5
	0,249	64,33	

**Curva de calibración de Trolox, para evaluar capacidad antioxidante**

11.4 Curva de eficiencia de partidores



11.5 Porcentaje de eficiencia obtenido para cada partidor.

Gen	Eficiencia	Eficiencia (%)
NRF2	2,006	100,7
KEAP-1	1,939	94,0
AKT	1,899	89,9
CAT	1,971	97,1
GLUT-P	2,022	102,2
HEMOX	1,997	99,7
GCLC	2,012	101,3
GCLM	2,060	106,0
RPS13	2,029	103,0
RPL30	2,038	103,9
GAPDH	1,956	95,6
Porcentaje de eficiencia obtenido para cada partidor.		

11.6 Curva de calibración para cuantificación de proteínas por método BCA.

