

# **Metabolismo hepático de derivados de taninos y su bioactividad en inflamación**

**David Enrique Ramos Cevallos**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano  
Honduras**

Noviembre, 2018

ZAMORANO  
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

# **Metabolismo hepático de derivados de taninos y su bioactividad en inflamación**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria en el Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

**David Enrique Ramos Cevallos**

**Zamorano, Honduras**

Noviembre, 2018

## **Metabolismo hepático de derivados de taninos y su bioactividad en inflamación**

**David Enrique Ramos Cevallos**

**Resumen.** Los polifenoles de frutas y vegetales se encuentran vinculados con la reducción en el riesgo de enfermedades degenerativas beneficiando a la salud humana. Estos compuestos son pobremente absorbidos en el proceso metabólico del cuerpo humano desconociendo la biodisponibilidad y efecto bioactivo de sus conjugados. Se plantearon como objetivos promover la conjugación mediante el uso de enzimas S9, evaluar el efecto bioactivo de ácido gálico y pirogalol en células hepáticas cancerígenas humanas (HepG2) e identificar los metabolitos mediante LC-ESI-MS. Se usó un Diseño Completamente al Azar (DCA) para proliferación celular (cuatro concentraciones y seis tratamientos) usando el kit de resazurina. El ácido gálico y pirogalol (metabolito de ácido gálico) inhibió el crecimiento celular a partir de 25 µg/ml. La combinación (ácido gálico + pirogalol) redujo la proliferación en 41% a concentraciones de 25 µg/ml por cada compuesto. Los tratamientos con enzimas S9 mostraron una reducción significativa con una relación indirecta de proliferación en HepG2 por la interacción de los mismos. Metil-pirogalol-O-sulfato fue el único metabolito tentativamente identificado. Ácido gálico y pirogalol ejercieron una correlación indirecta en HepG2. Se recomienda el uso de cofactores para una mayor conjugación y realizar factores de dilución para detectar estos metabolitos en LC-ESI-MS.

**Palabras clave:** Polifenoles, conjugación, proliferación celular, metabolitos, citotoxicidad.

**Abstract.** Fruits and vegetables polyphenols are linked with the reduction in the risk of degenerative diseases that benefits the human health. These compounds are poorly absorbed in human body metabolic process unknowing the bioavailability and bioactivity effect of their conjugates. The objectives of this study were to promote the conjugation through the use of S9 enzymes, evaluate the bioactivity effect of gallic acid and pyrogallol on hepatic cancer cells (HepG2) and identify their metabolites by LC-ESI-MS. Completely Randomized Design (CRD) was used for cell proliferation (four concentrations and six treatments) using resazurin kit. Gallic acid and pyrogallol (gallic acid metabolite) inhibited cell growth at 25 µg/ml and above. Combination (gallic acid + pyrogallol) reduced cell proliferation to 41% at 25 µg/ml for each compound. Treatments with S9 enzymes showed a significant reduction with an indirect relation of proliferation on HepG2 due to the interaction thereof. Methyl-pyrogallol-O-sulfate was the unique tentatively identified metabolite. Gallic acid and pyrogallol exerted a cytotoxicity indirect correlation on HepG2. It is recommended use cofactors to promote a better conjugation and make dilution factors to detect these metabolites by LC-ESI-MS.

**Key words:** Polyphenols, conjugation, cell proliferation, metabolites, cytotoxicity

## CONTENIDO

Portadilla .....	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos .....	v
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>3</b>
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>8</b>
<b>4. CONCLUSIONES .....</b>	<b>17</b>
<b>5. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>18</b>
<b>6. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>19</b>
<b>7. ANEXOS .....</b>	<b>25</b>

## ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Diseño experimental para proliferación celular de compuestos en células HepG2.....	6
2. Diseño experimental para proliferación celular de compuestos combinados en células HepG2 .....	6
3. Muestras de pirogalol analizadas en LC-ESI-MS .....	7

Figuras	Página
1. Estructura química del ácido gálico .....	8
2. Estructura química de pirogalol.....	8
3. Viabilidad celular de hepatocarcinoma célula humana (HepG2) a diferentes concentraciones de ácido gálico sin enzimas S9. ....	9
4. Viabilidad celular de hepatocarcinoma célula humana (HepG2) a diferentes concentraciones de pirogalol sin enzimas S9. ....	10
5. Viabilidad celular de hepatocarcinoma célula humana (HepG2) a diferentes concentraciones de ácido gálico y pirogalol sin enzimas S9.....	11
6. Viabilidad celular de hepatocarcinoma célula humana (HepG2) a diferentes concentraciones de ácido gálico con enzimas S9. ....	12
7. Viabilidad celular de hepatocarcinoma célula humana (HepG2) a diferentes concentraciones de pirogalol con enzimas S9. ....	13
8. Viabilidad celular de hepatocarcinoma célula humana (HepG2) a diferentes concentraciones de ácido gálico y pirogalol con enzimas S9.....	14
9. Ion identificado en LC-MS, metabolito de pirogalol (MS).....	15
10. Estructuras químicas tentativas de metil-pirogalol-O-sulfato .....	15
11. Ion identificado en LC-MS, metabolito de pirogalol (MS2).....	16

Anexos	Página
1. Cálculos de preparación de tratamientos .....	25
2. Ejemplo de etiquetado de platos para proliferación celular .....	25
3. Información estadística de proliferación celular .....	26
4. Cromatografía de muestra de fracción celular de pirogalol + S9 .....	26
5. Cromatografía de control + S9 (fracción S9) .....	27

## 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es un problema de salud a nivel mundial considerado la segunda causa de muerte con 8.8 millones en el 2015, siendo 788,000 por cáncer de hígado (OMS 2018; Siegel *et al.* 2018) y situado dentro de los 10 tipos de cáncer que afectan a la humanidad (Lima *et al.* 2016). La Sociedad de Cáncer Americano (ACS 2018) estima alrededor de 42,000 casos y 30,200 muertes por cáncer de hígado y conducto biliar intrahepático; con mayor incidencia en hombres y representando un 4% de la población americana (Siegel *et al.* 2018). En Honduras, se registraron 4,200 y 3,880 muertes de cáncer de hígado en hombres y mujeres respectivamente, que representa el 0.1% de muertes en el año 2012 (OMS 2014).

El consumo de frutas y vegetales esta ligado estrechamente a la reducción en el riesgo de enfermedades degenerativas (Pimpão *et al.* 2013). Los polifenoles de frutas y vegetales son metabolitos secundarios producidos por las plantas como protección hacia la radiación ultravioleta y patógenos; aportando astringencia, amargor y estabilidad oxidativa en alimentos (Pandey y Rizvi 2009). La ingesta diaria se estima que puede llegar 1 gr/día en personas con dietas ricas en frutas y bebidas como vino, té, café y chocolate; ignorando la cantidad que esta disponible y es absorbida por el organismo (Gómez Juristi 2015). La biodisponibilidad se define como la cantidad de nutriente ingerido que es absorbido y se encuentra disponible para funciones fisiológicas en el organismo (Thompson 2013). El metabolismo de polifenoles ha tenido similar o mayor potencial hacia los beneficios de la salud humana (Barnes *et al.* 2016) exhibiendo ciertas propiedades antioxidantes y antiinflamatorias en estudios *in vitro* e *in vivo* (Sadeghi Ekbatan *et al.* 2018).

Estos compuestos polifenólicos al ser ingeridos, son pobremente absorbidos en el intestino delgado (Sadeghi Ekbatan *et al.* 2018) y conjugados mediante una hidrólisis enzimática por lactasa hidrolasa o  $\beta$ -glucosidasa citosólica (Pimpão *et al.* 2013) dónde posteriormente ingresan al torrente sanguíneo (Vetrani *et al.* 2016). Dichas enzimas rompen el enlace  $\beta$ -glucosídico para generar aglicones que alcanzan el hígado donde son sujetos a la fase II del metabolismo (Grootaert *et al.* 2015) siendo conjugados en metilados por catecol-O-metyltransferasa, sulfatados por sulfotransferasa y glucoronidados por glucoroniltransferasa, para ser transportados hacia el tejido sanguíneo o excretados mediante orina (Heleno *et al.* 2015; Marín *et al.* 2015).

En contraste, los taninos son compuestos polifenólicos producidos por las plantas (Aguilar *et al.* 2014), dónde se encuentran los taninos hidrolizables que incluyen los galotaninos y elagitaninos (Marín *et al.* 2015). El mango (*Mangifera indica*) es una fuente rica en galotaninos y ácido gálico, que ha demostrado ciertas propiedades anticancerígenas y antioxidantes (Barnes *et al.* 2016).

Ácido gálico (GA) 3,4,5-ácido trihidroxibenzoico, es un ácido fenólico hallado en uvas, nueces, productos naturales y algunas bebidas como té, vinos, entre otros (Lima *et al.* 2016); así mismo puede ser obtenido a través de la hidrólisis de galotaninos (Nemec *et al.* 2017) y ha sido identificado como el mayor compuesto polifenólico en mango (Masibo y He 2008) que posee propiedades antioxidantes, antimutagénicas, antitumorales y cierta citotoxicidad en células cancerígenas (Lima *et al.* 2016; Nemec *et al.* 2016). Pirogalol se conoce que es el mayor metabolito bioactivo de los galotaninos (Nemec *et al.* 2017); además el ácido gálico puede ser decarboxilado por galato decarboxilasa y obtener pirogalol como resultado final del metabolismo de los taninos e incrementando su efecto anticancerígeno (López de Felipe *et al.* 2014).

El estudio del metabolismo de compuestos se ha llevado a cabo a través del uso de HepG2, que es una hepatocarcinoma de línea celular humana que imita la función metabólica del hígado y es comúnmente usada para estudiar el metabolismo de compuestos (Borowiec *et al.* 2017); capaz de producir enzimas de la fase I y II del metabolismo (Chequer *et al.* 2012).

Esta es diferenciada de otras células debido a los diferentes patrones de expresiones de las enzimas metabólicas requeridas para la conjugación (Parmentier *et al.* 2007b). La enzima S9 del hígado ha sido usada para evaluar el metabolismo de drogas y xenobióticos (Parmentier *et al.* 2007a) ya que contiene fracciones microsomales y citosólicas representando un completo perfil enzimático metabólico que incluye enzimas de la fase I, II y sus cofactores (Richardson *et al.* 2016).

Los estudios de citotoxicidad *in vitro* en líneas celulares emplean diferentes métodos de tinción celular para evaluar la viabilidad celular sobre tratamientos (Escobar *et al.* 2010). El ensayo de resazurina sirve como un indicador redox en células, que monitorea el número de células viables; este reactivo azul no tóxico ni fluorescente permite evaluar la actividad metabólica de los compuestos, células viables reducen resazurin en resofurina produciendo una alta fluorescencia de color rosado; mientras que las células no viables mantienen el color azul sin fluorescencia (Escobar *et al.* 2009; Silva *et al.* 2017).

El presente estudio se llevo a cabo para evaluar la actividad citotóxica cancerígena de los metabolitos hepáticos de ácido gálico y pirogalol, además, identificar dichos compuestos en LC-ESI-MS.

Se plantearon los siguientes objetivos:

- Promover la conjugación de derivados de taninos con enzimas S9
- Identificar los derivados de taninos metabolizados y no metabolizados en LC-ESI-MS
- Evaluar el efecto bioactivo de derivados de taninos en hepatocarcinoma línea celular humana (HepG2)

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### **Localización del estudio.**

El estudio se llevó a cabo en los laboratorios de Nutrición y Química de Alimentos del Departamento de Nutrición y Ciencia de los Alimentos de la Universidad de Texas A&M, College Station, Texas, Estados Unidos.

### **Fase I. Evaluación citotóxica en células HepG2.**

**Siembra y división de células.** Se usaron células cancerígenas del hígado humano (HepG2) adquiridas del centro de colección de tipos de cultivos (ATCC, Manassas, VA). El criocontenedor (1 ml) se mantuvo en hielo seco para luego ser descongelado en baño María (Fisher Scientific ISOTEMP 210) a una temperatura de 37 °C durante un minuto.

En el laboratorio de cultivo celular, se trabajó en la cabina de bioseguridad (Thermo Scientific forma 1400 series) donde fueron previamente limpiados con alcohol al 70% sobre la superficie de trabajo. Se transfirió el criocontenedor mediante el uso de una micropipeta en un plato Petri previamente identificado (línea celular, pasaje, fecha e iniciales de la persona). Se agregaron 10 ml de medio de cultivo, que previamente fue preparado y está constituido de 500 ml Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) (ATCC, Manassas, VA), 50 ml de suero fetal bovino (FBS) (Gibco, Thermo Fisher Scientific) al 100% y 5 ml de mezcla de antibiótico (5000 unidades/ml de penicilina y 5000 µg/ml de estreptomycin) (GIBCO, Thermo Fisher Scientific) con el uso de una pipeta electrónica. Al ser agregado, se realizaron ligeros movimientos circulares para mezclar el medio de cultivo con las células. Posteriormente, se almacenaron en la incubadora (Forma Series II Water-Jacketed CO<sub>2</sub> Incubator HEPA Class 100, Thermo Electron Corporation) permitiendo la adhesión y crecimiento de las células al fondo del plato.

Después de 24 horas, se observó en un microscopio invertido (Jenco, USA) determinando un 80% de confluencia visualmente para su posterior división. De ser el porcentaje de confluencia menor, se procedía a cambiar el medio de cultivo previamente calentado en baño María por quince minutos aproximadamente. El cambio de medio se efectuó de la siguiente manera: se aspiraba (bomba de vacío) el medio de cultivo, se agregaba 10 ml de medio de cultivo nuevo y se colocaba en la incubadora por 24 horas para revisar su confluencia nuevamente.

Una vez alcanzada la confluencia, se prepararon los materiales, se aspiró el medio antiguo y se agregaron 5 ml de buffer fosfato salino (PBS) con el fin de enjuagar las células y remover aquellas que no se adhirieron al fondo del plato. Por consiguiente, se aspiró el PBS

realizando una ligera inclinación para evitar tocar el fondo del plato; una vez removido, se añadió 2.5 ml de tripsina (Gibco) 0.25% EDTA para desprender la adhesión de las células del fondo del plato durante tres a cinco minutos en la incubadora.

Concluido el tiempo, las células fueron observadas en el microscopio para asegurar su desprendimiento; si no se observaba su completo desprendimiento, se realizaban ligeros golpes en el plato para facilitar el mismo. Posteriormente, se agregaron 8 ml de suero fetal bovino (FBS) al 10% para detener la reacción de la tripsina ya que si se mantiene por mucho tiempo puede ocurrir un daño celular. A continuación, se transfirió el contenido (10.5 ml) a un tubo Falcon de 50 ml con el uso de una pipeta electrónica. Se colocó en los frascos de centrifugación previamente limpiados (alcohol 70%) y colocados dentro de la cabina de bioseguridad. Se centrifugó el contenido celular a 1200 revoluciones por minuto (rpm) por 2 minutos a 25 °C (Jovan C3R1 Centrifuga Multifunción, Thermo Electron Corporation) manteniendo el correcto balance (10.5 ml). Una vez finalizado, se observó la separación entre el sedimento celular y sobrenadante, se aspiró el sobrenadante manteniendo el sedimento celular al fondo del tubo Falcon.

Se agregaron 3 ml de medio de cultivo y se homogenizó con la micropipeta hasta no observar aglomeración de células en la suspensión celular. Posteriormente, se agregó 1 ml a cada plato previamente identificado, 10 ml de medio celular y se almacenaron en la incubadora hasta obtener la confluencia deseada. Se cambió el medio cada dos días y se dividió las células cada cinco días.

**Preparación de células.** Alcanzada la confluencia deseada, se aspiró el medio anterior usando un aspirador y se agregaron 5 ml PBS para enjuagar las células y remover aquellas células muertas no adheridas al fondo del plato. Se aspiró el PBS sin tocar el fondo del plato y se agregó 2.5 ml de tripsina al 0.25% para desprender las células del fondo del plato durante tres a cinco minutos en la incubadora.

Concluido el tiempo de incubación, se observó en el microscopio invertido para asegurar su total desprendimiento. Posteriormente, se agregó 8 ml de FBS al 10% para detener la reacción de la tripsina. Se transfirió el contenido celular (10.5 ml) a un tubo tipo Falcon de 50 ml con el uso de una pipeta electrónica. Después, se colocaron en los frascos de centrifugación previamente limpiados y se centrifugó a 1200 revoluciones por minuto por dos minutos a 25 °C, manteniendo el balance correcto (10.5 ml). Al finalizar, se observó la separación entre el sedimento celular y sobrenadante, y se colocó dentro de la cabina de bioseguridad.

Se aspiró el sobrenadante y se añadió 4 ml EMEM 2% FBS para evitar el crecimiento rápido de las células y se mezcló hasta obtener una completa homogenización. La concentración celular consistió en varios pasos; se agregó 10  $\mu$ L de azul tripano en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, luego se agregó 10  $\mu$ L de suspensión celular y se homogenizó. Finalmente, se tomaron 10  $\mu$ L de la solución y se colocaron en una lámina de recuento celular; se leyó en el contador celular (Countess automated cell counter, Invitrogen), una vez obtenida la concentración se calculó la cantidad de medio para diluir acorde a los diferentes experimentos.

**Proliferación celular.** Para la determinación celular, se siguió el procedimiento de Venancio *et al.* (2017). Se necesitaron 30 ml de suspensión celular a una concentración de 100,000 células por mililitro usando tres platos de 96 pocillos color negro. Se transfirió 100  $\mu$ L de la suspensión celular en cada pocillo por medio de una micropipeta para obtener un total de 10,000 células por pocillo Finalmente, los platos se incubaron durante 24 horas hasta la adhesión de las células al fondo de los pocillos a una temperatura de 37 °C. Cada experimento se llevó a cabo por separado y se desarrollaron de la siguiente manera:

Para todos los tratamientos de ácido gálico y pirogalol, se preparó una solución stock de 5000 mg/L con 50 mg de cada compuesto y 10 ml de agua al 0.1% de ácido fórmico. Posteriormente, se diluyó a una concentración de 200  $\mu$ g/ml para los tratamientos sin enzimas S9 usando 200  $\mu$ L de la solución stock y 4.8 ml de medio celular para ácido gálico y pirogalol respectivamente, mientras que para los tratamientos con enzimas S9 se preparó a una concentración de 250  $\mu$ g/ml usando 250  $\mu$ L y 4.75 ml de medio celular para diluir seguidamente a las respectivas concentraciones.

En los tratamientos de compuestos sin enzimas S9, se removió el medio previamente incubado por 24 horas a 37 °C con el aspirador y se agregaron 200  $\mu$ L en cada pocillo de cada tratamiento que fueron ácido gálico, pirogalol y combinación. Para cada tratamiento se tuvo controles donde se agregó 200  $\mu$ L de medio de cultivo al 2% FBS sin ningún compuesto y blancos que contenían solo medio celular. Después de 48 horas, se agregaron 20  $\mu$ L de solución resazurin y se incubó durante tres horas. Se midió la intensidad de fluorescencia a una absorbancia de 544 nm de excitación y 590 nm de emisión en el contador FLUOstar Omega microplate reader (BMG, Labtech Inc., Durham, NC).

Para los tratamientos de compuestos con enzimas S9 se siguió el protocolo de Kolrep *et al.*(2017) adaptado según la concentración de proteína de S9 y el volumen del tratamiento requerido; donde prepararon una solución stock 5 veces concentrada del compuesto y se acondicionaron a 40  $\mu$ L de compuesto que contenía 20  $\mu$ L del compuesto y 20  $\mu$ L de medio celular o 40  $\mu$ L del compuesto pre incubado con las enzimas S9 durante 1 hora. En el estudio, se preparó las muestras 5 veces concentradas en un volumen total de 1 ml por tratamiento en base a la solución intermedia de 250  $\mu$ g/ml. Posteriormente, se preparó las muestras a un volumen total de 2 ml que contenía 400  $\mu$ L de la solución anterior, 40  $\mu$ L de S9 mix y 1560  $\mu$ L de medio celular al 2% FBS por cada tratamiento; mientras que para la combinación se preparó 400  $\mu$ L ácido gálico, 400  $\mu$ L pirogalol, 40  $\mu$ L S9 mix y 1160  $\mu$ L de medio celular a un volumen total de 2 ml. Estos tratamientos fueron previamente incubados por una hora con la finalidad de promover la conjugación incluyendo tratamientos de control y blancos para cada experimento. Se aspiró el medio antiguo, se agregó 200  $\mu$ L en cada pocillo. Después de 48 horas, se recolectó el medio (fracción celular), se agregó 200  $\mu$ L de medio de cultivo y 20  $\mu$ L de solución resazurin en cada pocillo y se incubó durante 3 horas. La intensidad de fluorescencia se midió a una absorbancia de 544 nm de excitación y 590 nm de emisión en el contador FLUOstar Omega microplate reader. Los experimentos de citotoxicidad fueron llevados a cabo con pasajes del cinco al doce. Las fracciones celulares fueron almacenadas a -80 °C en un congelador de ultra baja temperatura (Ultra low temperature freezer U535 innova, New Brunswick Scientific) hasta análisis en LC-ESI-MS.

**Diseño experimental.** Para la fase I se evaluó la proliferación celular. Se usó un diseño completamente al azar (DCA) evaluando cuatro concentraciones y seis tratamientos con siete repeticiones. Los compuestos usados fueron: ácido gálico, pirogalol, ácido gálico + S9, pirogalol + S9 (1, 5, 25, 50 µg/ml) (Cuadro 1) y combinación (ácido gálico y pirogalol), combinación + S9 (0.5, 2.5, 12.5, 25 µg/ml) (Cuadro 2). Se utilizaron dos controles donde hubo células sin la aplicación de los compuestos; los controles fueron: células y células + S9. Para el análisis, se usó una separación de medias Tukey para comparar con el control y un nivel de significancia de  $\alpha < 0.05$ . Los datos fueron analizados con el programa “Statistical Analysis System” (SAS®, versión 9.4).

Cuadro 1. Diseño experimental para proliferación celular de compuestos en células HepG2

Compuestos	Concentración (µg/ml)			
	1	5	25	50
Ácido gálico	T <sup>a</sup> 1	T2	T3	T4
Pirogalol	T5	T6	T7	T8
Ácido gálico + S9*	T9	T10	T11	T12
Pirogalol + S9*	T13	T14	T15	T16
Control+ S9 (AG <sup>β</sup> )				C <sup>b</sup> 1
Control + S9 (PG <sup>χ</sup> )				C2
Control				C3

<sup>a</sup> T: tratamiento. \* Los tratamientos fueron concentradas 5 veces más y diluidas a su concentración final. <sup>β</sup> AG: Ácido gálico. <sup>χ</sup> PG: pirogalol. <sup>b</sup> C: células sin presencia de compuestos

Cuadro 2. Diseño experimental para proliferación celular de compuestos combinados en células HepG2

Compuestos	Concentración (µg/ml)			
	0.5 <sup>φ</sup> - 0.5 <sup>δ</sup>	2.5 – 2.5	12.5 – 12.5	25 - 25
Ácido gálico + Pirogalol	T17	T18	T19	T20
Ácido gálico +Pirogalol + S9*	T21	T22	T23	T24
Control + S9				C4

<sup>φ</sup> Concentración de ácido gálico. <sup>δ</sup> Concentracipon de pirogalol. \* Los tratamientos fueron concentrados 5 veces más y diluidas a su concentración final.

## Fase II. Identificación de metabolitos de ácido gálico y pirogalol en LC-ESI-MS.

Se evaluaron dos tratamientos que fueron: fracción S9 que fue pre incubada por una hora y fracción celular que fue recolectada después de 48 horas de incubadora de los experimentos previos. Además, se evaluó el control para comparar la identificación de metabolitos y los tratamientos se mezclaron sin importar la concentración (Cuadro 3) debido a que previamente no se pudo encontrar metabolitos al analizar cada tratamiento por separado. Esto se realizó con la finalidad de concentrar las muestras para detectar metabolitos.

Cuadro 3. Muestras de pirogalol analizadas en LC-ESI-MS

Muestra	Tratamientos
	Metanol + Agua acidificada pH 3
PG + S9 (Fracción S9)	T1
PG + S9 (Fracción celular)	T2
PG (Fracción celular)	T3
Control <sup>b</sup> + S9 (Fracción S9)	T4
Control + S9 (Fracción celular)	T5

<sup>b</sup> Control: células sin presencia de compuestos

**Preparación de las muestras.** se mezclaron las cuatro concentraciones de pirogalol de fracción S9 y fracción celular respectivamente. Se filtraron las muestras a través de un cartridge C18 (Hypersep™ C18 Cartridges, Thermo Fisher Scientific) previamente acondicionado con 2 ml de metanol al 0.01% ácido fórmico, 2 ml de agua al 0.01% ácido fórmico. Se agregó 2 ml de cada muestra, se limpió la muestra con 2 ml de agua acidificada, se eluyó con 500 µL de metanol acidificado y se diluyó con 500 µL de agua acidificada. Las muestras fueron filtradas mediante el uso de un filtro Whatman de 0.45 µm y colocados en viales de 1.5 ml para ser analizados.

**Condiciones del equipo.** se usó un Thermo Finnigan LCQ Deca XP Max MSn con trampa de iones equipado con una fuente ESI (Electrospray ionization). Las separaciones se realizaron en fase reversa usando un Finnigan Surveyor HPLC con un detector Surveyor PDS. Los gradientes de separación fueron empleados usando una Sunfire™ columna C18 (250 X 4.6 mm, 5 µm). Las inyecciones fueron de 60 µL por muestra. La fase móvil A fue metanol grado HPLC y la fase móvil B fue agua al 0.1% ácido fórmico a una velocidad de 400 µL/min. El gradiente A fue 100% durante 3 minutos, disminuyó a un 90% y la fase B aumentó a 10% durante 17 minutos. Fase A disminuyó a 70% y fase B aumentó a 30%; después de 20 minutos, fase A disminuyó a 50% y fase B aumentó a 50% durante 15 minutos. La fase A disminuyó a 30% y la fase B incrementó a 70% durante 10 min; después fase B aumentó a 100%. por 30 segundos y se inyectó fase A al 100% durante 2.5 minutos para regresar a las condiciones iniciales. La interface de electrospray trabajó en modo negativo a una absorbancia de 280 nm.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los polifenoles son metabolitos secundarios sintetizados por las plantas que poseen uno o varios anillos fenólicos y grupos oxidrilos (-OH) en su estructura química (Quiñones *et al.* 2012). En su clasificación, se encuentran los taninos que químicamente son metabolitos secundarios derivados de plantas que pueden ser ésteres de ácido gálico o sus derivados unidos a una gran variedad de oligómeros y polímeros de proantocianidinas (Olivas Aguirre *et al.* 2015). Los taninos se dividen en taninos condensados (flavonoides y proantocianidinas) e hidrolizables (galotaninos y elagitaninos), donde el ácido gálico es un galotanino monomérico que está unido a varias moléculas de glucosa (Govea Salas *et al.* 2013).

El ácido gálico (Figura 1) conocido como 3,4,5 trihidroxibenzoico está presente en diferentes frutos como: uva, berries, nueces, manzana y mango y en bebidas como: vino y té verde (Govea Salas *et al.* 2013; Mansouri *et al.* 2013) y posee ciertas propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimutagénicas y anticancerígenas (Verma *et al.* 2013). Asimismo, pirogalol (Figura 2) es conocido por la descomposición de taninos hidrolizables, así también el ácido gálico puede ser enzimáticamente decarboxilado por la microflora del colón para después ser absorbido y conjugado por las enzimas hepáticas y renal antes de ser eliminado por orina (Upadhyay *et al.* 2010; Barnes *et al.* 2016).

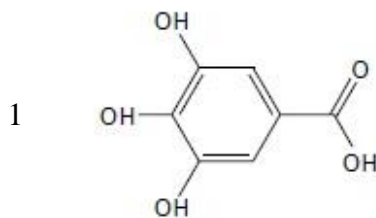


Figura 1. Estructura química del ácido gálico (Wang *et al.* 2016)

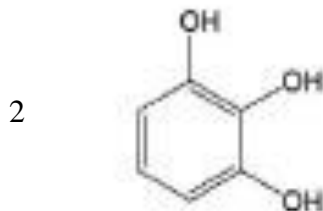


Figura 2. Estructura química de pirogalol (Wang *et al.* 2018)

El ácido gálico es un ácido fenólico que tiene una relevancia importante debido a que ha sido identificado como el mayor compuesto polifenólico en mango y su concentración va a depender principalmente de las condiciones de maduración del fruto (Masibo y He 2008).

### **Proliferación celular (HepG2) sin enzimas S9.**

Es un ensayo que permite determinar la actividad de crecimiento, detección de drogas y determinar el potencial de compuestos químicos en pruebas citotóxicas, mutagénicas y cancerígenas en experimento *in vitro* e *in vivo* (RDG 2008). En los experimentos de proliferación celular se encontraron diferencias significativas para ácido gálico (Figura 3).

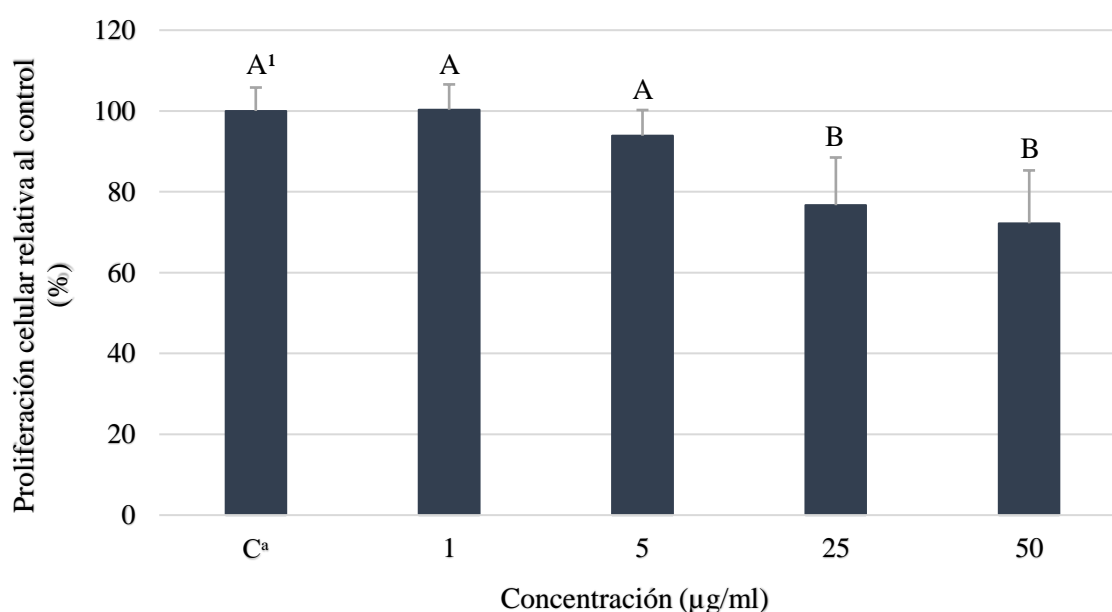


Figura 3. Viabilidad celular de hepatocarcinoma célula humana (HepG2) a diferentes concentraciones de ácido gálico sin enzimas S9.

C<sup>a</sup>: Control, células sin ácido gálico. <sup>1</sup> Diferentes letras indican diferencias estadísticas entre tratamientos ( $p < 0.05$ ).

Los estudios científicos expresan los valores de citotoxicidad en valores  $DL_{50}$  dónde se refiere a la dosis letal que el compuesto reduce la proliferación celular en 50%. Durante la realización del trabajo no se obtuvo valores  $DL_{50}$  debido a que la finalidad era el uso de las células para la producción de metabolitos; a pesar de eso se encontró una reducción de viabilidad celular en 23 y 27% a concentraciones de 25 y 50 µg/ml, respectivamente. Estos resultados divergen a la investigación de Lima *et al.* (2016) que encontraron una reducción del 40% a una concentración de 51 µg/ml en la misma línea celular, esto pudo ser debido a que usaron un ensayo de exclusión azul tripano y diferente densidad de siembra por pocillo.

Además, Sun *et al.* (2016) evaluaron el efecto citotóxico del ácido gálico en células hepáticas cancerígenas y normales; se observó que a concentraciones de 28.5 y 80.9 µg/ml

se reduce el 50% de crecimiento celular. Otro estudio realizado por Lu *et al.* (2010) obtuvieron una viabilidad celular de 70, 81 y 95% en U87, U251 y células endoteliales de cerebro de ratón a una concentración de 20  $\mu\text{g/ml}$ ; al igual que Chang *et al.* (2015) que no encontraron un efecto citotóxico a concentraciones de 12.75  $\mu\text{g/ml}$  sobre hepatocitos. Estos resultados permiten comprender la citotoxicidad que posee el ácido gálico ante diferentes líneas celulares tumorales comparado con células normales a pesar del uso de diferentes métodos para evaluar la proliferación celular.

Durante el análisis de pirogalol, se pudo observar diferencias significativas de las concentraciones más altas; donde 25 y 50  $\mu\text{g/ml}$  redujeron la proliferación celular en 12 y 34%, respectivamente (Figura 4).

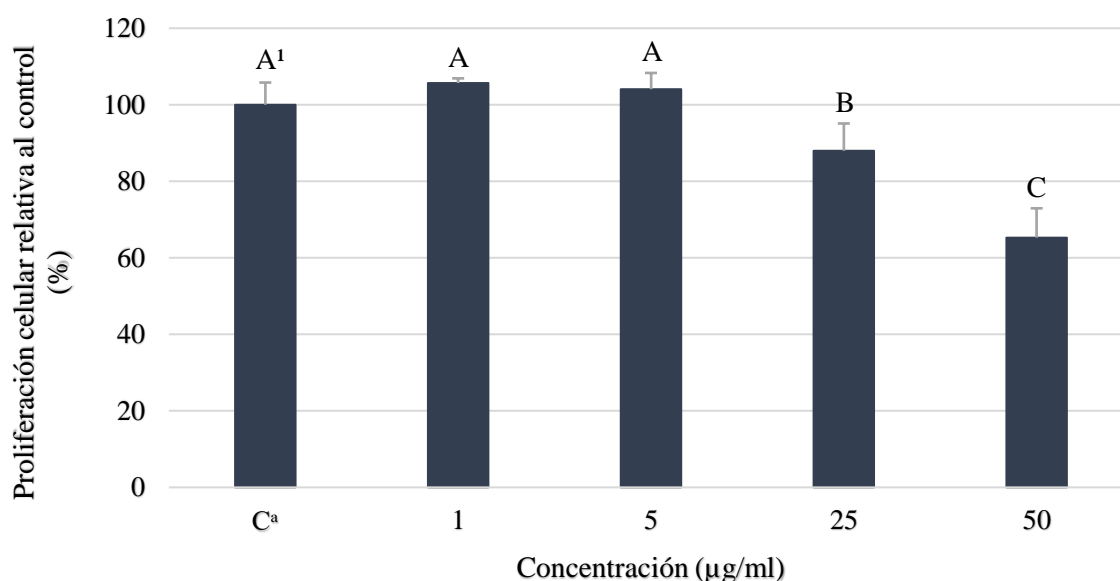


Figura 4. Viabilidad celular de hepatocarcinoma célula humana (HepG2) a diferentes concentraciones de pirogalol sin enzimas S9.

C<sup>a</sup>: Control, células sin pirogalol. <sup>1</sup> Diferentes letras indican diferencias estadísticas entre tratamientos ( $p < 0.05$ ).

Los resultados discrepan con los obtenidos por Nemeč *et al.* (2016) donde obtuvieron una reducción del 50% de proliferación celular a 1  $\mu\text{g/ml}$  en células cancerígenas de mama (MCF10DCIS.COM). Asimismo, otros estudios muestran un decrecimiento a la mitad con una concentración de 5.67  $\mu\text{g/ml}$  en células cancerígenas cervicales humanas (HeLa) (Kim SWook *et al.* 2008) y redujo el 50% de la población entre una concentración de 6.3 y 12.61  $\mu\text{g/ml}$  en células de fibroblastos pulmonares humanos (HPF) (Park 2016). Estos resultados reflejan que las células hepáticas cancerígenas poseen una mayor resistencia al pirogalol en comparación a otras líneas cancerígenas celulares.

En la combinación usada (ácido gálico + pirogalol) se observaron diferencias en tres tratamientos siendo la dosis más alta de 25 - 25  $\mu\text{g/ml}$  de ácido gálico y pirogalol que redujo

la población celular en 41% (Figura 5). No hay resultados previos que demuestren el uso de esta combinación en diferentes líneas celulares pero Nemec *et al.* (2016) determinaron un mayor efecto anti proliferativo de polifenoles de granada comparado con los compuestos individuales en células cancerígenas del colón (HT-29 y HCT119).

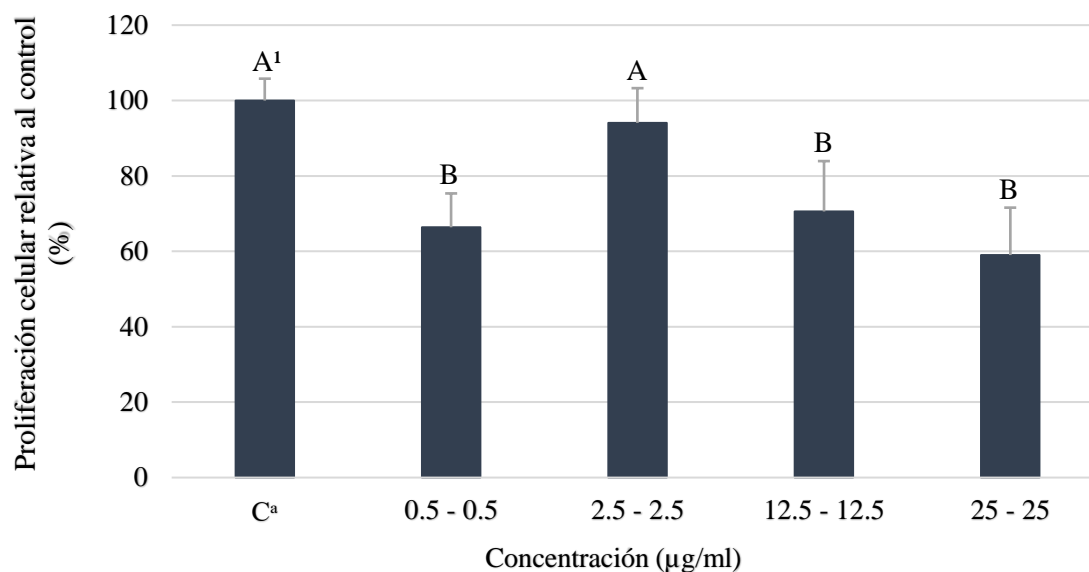


Figura 5. Viabilidad celular de hepatocarcinoma célula humana (HepG2) a diferentes concentraciones de ácido gálico y pirogalol sin enzimas S9.

C<sup>a</sup>: Control, células sin ácido gálico y pirogalol. <sup>1</sup> Diferentes letras indican diferencias estadísticas entre tratamientos ( $p < 0.05$ ).

El tratamiento de 2.5 – 2.5 µg/ml de ácido gálico y pirogalol no presentó diferencias estadísticas; esto pudo ser un error durante el proceso de preparación de diluciones y pipeteo. Además, es importante resaltar que el tratamiento 25 – 25 µg/ml de ácido gálico y pirogalol fue más letal reduciendo 41% de viabilidad celular comparado a 23 y 12% de los compuestos individuales. Estos resultados contrastan con Chávez (2015) que redujo la población celular a medida que incrementa la concentración del compuesto en células cancerígenas de colón (HT-29); mientras que no redujo el crecimiento en células intestinales de miofibroblastos (CCD-18).

### **Proliferación celular (HepG2) con enzimas S9.**

La fracción S9 o microsómica es comúnmente usada para la identificación de metabolitos de la fase I, II o ambos a la vez y el estudio del metabolismo de drogas; donde se usó la fracción S9 que contiene parte citosólica y microsomal de baja actividad enzimática comparada a los aislados de los mismos (Golizeh *et al.* 2015; Richter *et al.* 2017). Asimismo, la célula hepatocarcinoma humana (HepG2) contiene ciertas enzimas de la fase II del metabolismo como sulfotransferasas (SULT) y glucoronosiltransferasas (UDP)

(Jeurissen *et al.* 2008) usadas para simular el metabolismo hepático de polifenoles (Sadeghi Ekbatan *et al.* 2018).

Acorde a los resultados, la concentración más letal fue 50  $\mu\text{g/ml}$  que redujo en 44% la proliferación celular; mientras que el control + enzimas S9 fue diferente en 33.71% y se observó un comportamiento no dependiente de la concentración (Figura 6); esto puede ser producto de la falta de estudios relacionados con la interacción entre las células cancerígenas y las enzimas S9.

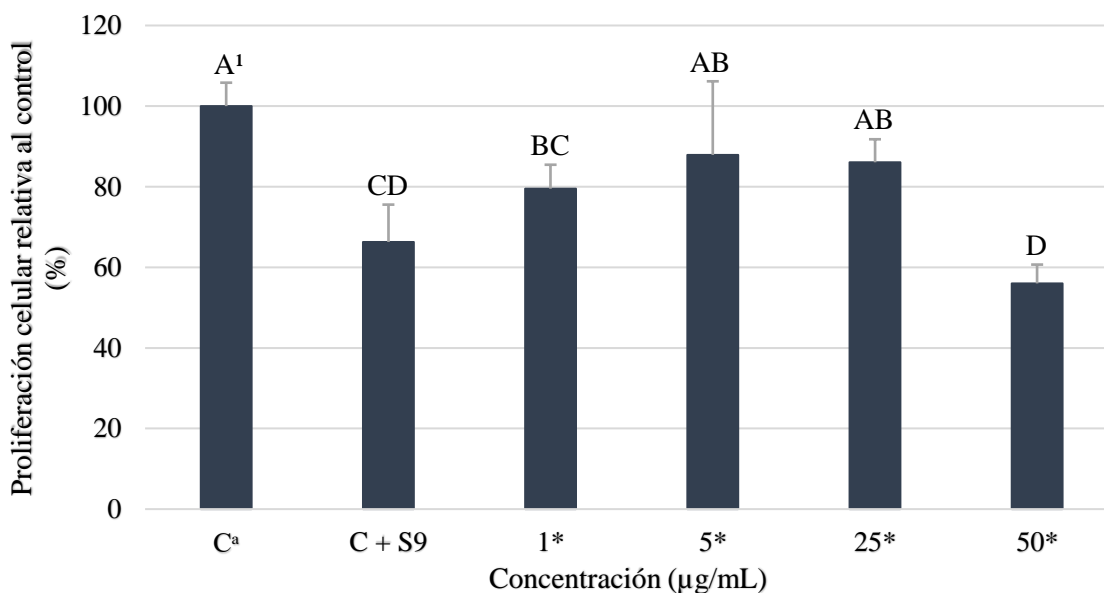


Figura 6. Viabilidad celular de hepatocarcinoma célula humana (HepG2) a diferentes concentraciones de ácido gálico con enzimas S9.

C<sup>a</sup>: Control, células sin ácido gálico y pirogalol. \*Las muestras fueron concentradas 5 veces más y posteriormente diluidas. <sup>1</sup> Diferentes letras indican diferencias estadísticas entre tratamientos ( $p < 0.05$ ).

Estos resultados contrastan con Heleno *et al.* (2014) que reportaron la citotoxicidad del ácido coumárico, hidroxibenzoico, cinámico y sus derivados dónde el ácido hidroxibenzoico no presento actividad citotóxica mientras que sus derivados de metilación y glucuronidación redujeron la población al 50% con  $192.39 \pm 7.72$  y  $507.38 \pm 31.06$   $\mu\text{M}$  en HepG2. No obstante, Silva *et al.* (2017) discrepa con nuestro estudio debido a que HepG2 mostró una mayor resistencia a los ésteres de ácido gálico al interferir en la citotoxicidad debido a su capacidad metabólica reflejada en la expresión de enzimas de la fase I y II. Además, Piazzon *et al.* (2012) mostraron que los derivados glucuronidados de ácido ferúlico y cafeico tienen similar capacidad antioxidante, mientras que los sulfatados poseen baja capacidad antioxidante en comparación a los compuestos parentales. Estos resultados aún desconocen la interacción que poseen dichos compuestos conjugados sobre las células hepáticas cancerígenas.

Los resultados de pirogalol con enzimas S9 (Figura 7) mostraron una reducción dependiente de la dosis en la mayoría de tratamientos, siendo el de 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  que mostró una reducción de 23.15% de la población celular. Estos hallazgos discrepan con los obtenidos por Kolrep *et al.* (2017), donde pre incubaron el ácido okadaico con enzimas S9 humanas resultando una alta citotoxicidad de 45% a 50 nM comparado al compuesto parental que obtuvo a 150 nM un 55% de reducción celular. Estos resultados evidencian que el pirogalol + enzimas S9 (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) tuvo una reducción celular de 23.15% comparado al compuesto normal de 34.73%. Además, se puede observar que a una concentración de 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  se obtuvo un valor mayor que el control, esto se pudo dar por errores experimentales durante el pipeteo.

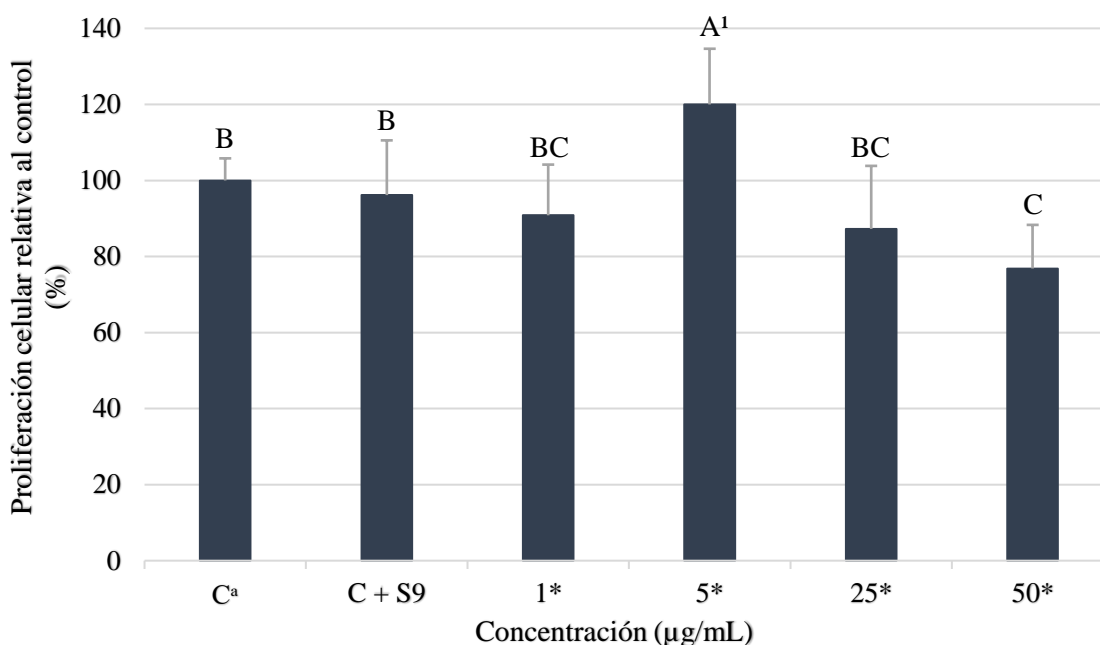


Figura 7. Viabilidad celular de hepatocarcinoma célula humana (HepG2) a diferentes concentraciones de pirogalol con enzimas S9.

C<sup>a</sup>: Control, células sin ácido gálico y pirogalol. \*Las muestras fueron concentradas 5 veces más y posteriormente diluidas. <sup>1</sup> Diferentes letras indican diferencias estadísticas entre tratamientos ( $p < 0.05$ ).

El tratamiento de 0.5-0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y 12.5-12.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  fueron las dosis más citotóxicas que redujeron la población en 32.1 y 23.26% (Figura 8), respectivamente. Estudios previos no han evaluado la combinación de dichos compuestos, no obstante, se puede comparar que el mecanismo metabólico de este tratamiento es similar a los compuestos parentales combinados. Además, se puede evidenciar que los tratamientos de control + enzimas S9 fueron diferentes en los tres experimentos; esto se puede dar al desconocimiento sobre la interacción directa de las enzimas con las células hepáticas cancerígenas (HepG2).

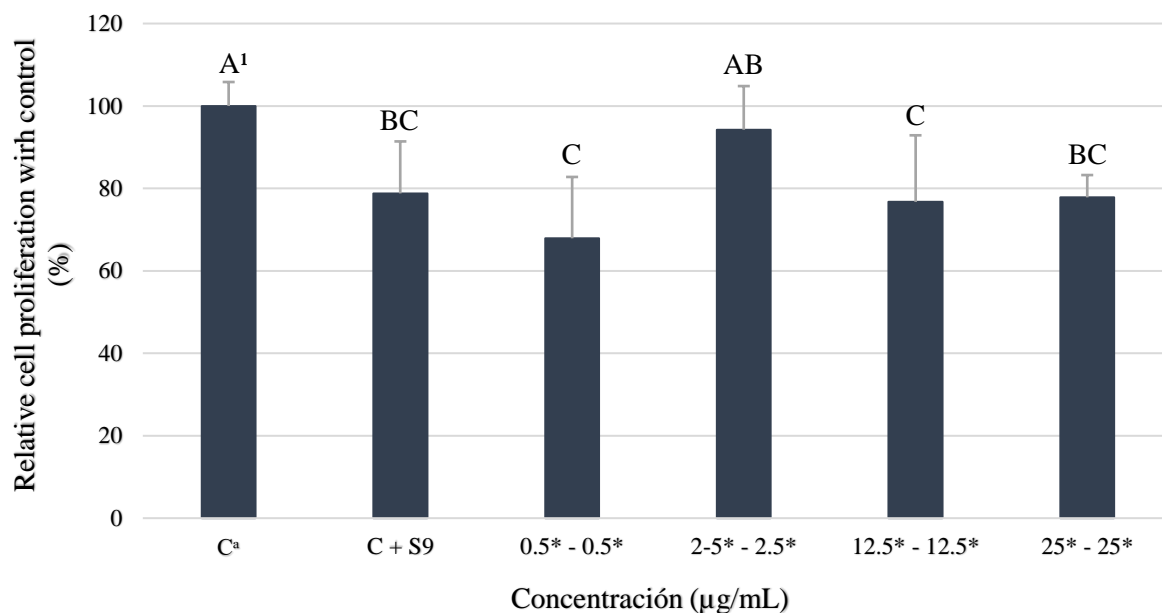


Figura 8. Viabilidad celular de hepatocarcinoma célula humana (HepG2) a diferentes concentraciones de ácido gálico y pirogalol con enzimas S9.

C<sup>a</sup>: Control, células sin ácido gálico y pirogalol. \*Las muestras fueron concentradas 5 veces más y posteriormente diluidas. <sup>1</sup> Diferentes letras indican diferencias estadísticas entre tratamientos ( $p < 0.05$ ).

### Identificación de metabolitos.

El estudio de metabolitos de polifenoles se ha incrementado en los últimos años debido a la importancia de conocer su comportamiento dentro del cuerpo humano (Pimpão *et al.* 2015). Estos polifenoles son pobremente absorbidos donde pueden sufrir varios procesos metabólicos (Pimpão *et al.* 2014). Experimentos *in vitro* han permitido evaluar las propiedades de compuestos bioactivos ignorando el metabolismo humano que crea ciertos compuestos bioactivos conjugados metilados y sulfatados (Barnes *et al.* 2016). La biodisponibilidad de un polifenol está ligado a la capacidad de transporte a través de un enterocito y bioaccesibilidad como la cantidad del compuesto en solución disponible para la absorción (Talcott S y Talcott S 2018).

Estudios previos han demostrado que posterior al consumo de un puré de berries se encontraron dichos polifenoles en sus formas conjugadas a través de análisis de muestra muestras de orina y plasma (Pimpão *et al.* 2014, 2015). Además, Barnes *et al.* (2016) caracterizaron y cuantificaron siete metabolitos urinarios procedentes de ácido gálico y pirogalol después del consumo de mango. Por ello, es importante estudiar el metabolismo *in vitro* de estos compuestos y comprender si tiene un mejor o igual efecto bioactivo sobre líneas celulares cancerígenas.

El metabolito tentativamente identificado fue metil-pirogalol-O-sulfato (Figura 9) 219 masa-carga (m/z) (Figura 10) y una fragmentación de iones de 191 masa-carga (m/z) (Figura 11) a un tiempo de retención de 54.35 minutos. Estos resultados contrastan con

Barnes *et al.* (2016) que identificaron el compuesto en un tiempo de retención de 43 y 47.52 minutos en análisis de orina después del consumo de 400 gramos de pulpa de mango variedad Keitt. De igual manera, Pimpão *et al.* (2014) identificaron el metabolito después de la ingesta de un puré de berries en análisis de orina y sintetizados enzimáticamente. La fragmentación del metabolito tentativamente identificado discrepa con estudios previos (Pimpão *et al.* 2014; Pimpão *et al.* 2015; Barnes *et al.* 2016); esto pudo ser consecuencia de una mala ionización o baja sensibilidad en la espectrometría de masas debido al contenido de medio celular que poseía la muestra. Estos experimentos *in vitro* no han sido previamente realizados debido al alto contenido de las muestras biológicas.

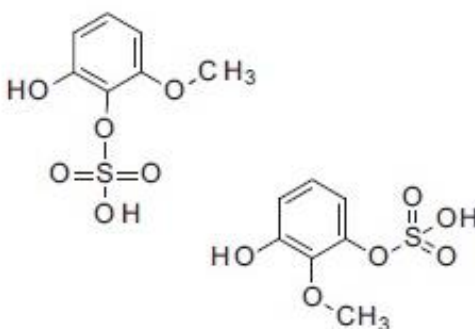


Figura 9. Estructuras químicas tentativas de metil-pirolgalol-O-sulfato (Barnes *et al.* 2016)

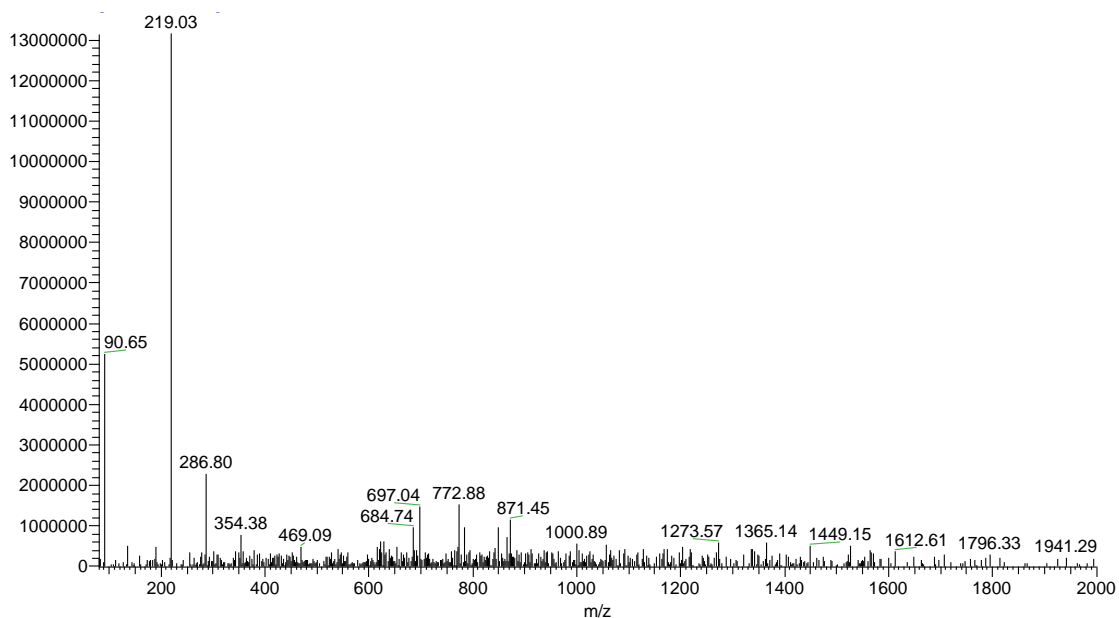


Figura 10. Ion identificado en LC-MS, metabolito de pirolgalol (MS)

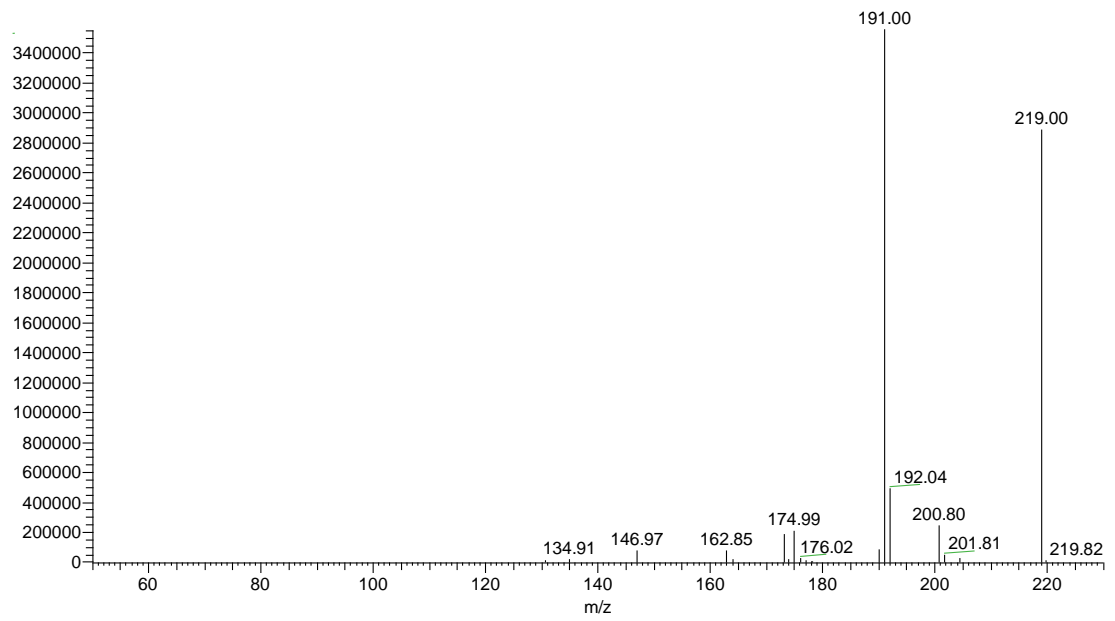


Figura 11. Ion identificado en LC-MS, metabolito de pirogalol (MS2)

#### **4. CONCLUSIONES**

- El único metabolito tentativo que promovió la conjugación y fue identificado de derivados taninos fue metil-pirogalol-O-sulfato en la fracción S9 de pirogalol.
- De los efectos bioactivos, ácido gálico y pirogalol ejercieron una correlación indirecta de citotoxicidad en HepG2.

## **5. RECOMENDACIONES**

- Promover la conjugación de metabolitos mediante el uso de diferentes cofactores como: NADPH, PAPS, UDP, SULT, COMT.
- Desarrollar diferentes factores de dilución para muestras biológicas y posibilitar la identificación en LC-ESI-MS
- Analizar la bioactividad de los diferentes compuestos contenidos en extractos de mango con el fin de identificar otros posibles metabolitos en HepG2.

## 6. LITERATURA CITADA

ACS (American Cancer Society). 2018. Facts and figures 2018 - Liver and intrahepatic bile duct. Atlanta, GA: [sin editorial] ; [consultado 2018 feb 21]. [https://cancerstatisticscenter.cancer.org/?\\_ga=2.176137828.77445841.1519245457-1958308332.1517939762](https://cancerstatisticscenter.cancer.org/?_ga=2.176137828.77445841.1519245457-1958308332.1517939762).

Aguilar Zárate P, Cruz Hernández MA, Montañez JC, Belmares Cerda RE, Aguilar CN. 2014. Bacterial tannases: production, properties and applications. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 13(1):63–74. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62031166005>.

Barnes RC, Krenek KA, Meibohm B, Mertens-Talcott SU, Talcott ST. 2016. Urinary metabolites from mango (*Mangifera indica* L. cv. Keitt) galloyl derivatives and *in vitro* hydrolysis of gallotannins in physiological conditions. *Mol Nutr Food Res*. 60(3):542–550. eng. doi:10.1002/mnfr.201500706.

Borowiec K, Sz wajgier D, Olejnik A, Kowalska K, Targoński Z. 2017. Effects of a bilberry preparation on selected cell lines of the digestive system. *Czech J. Food Sci*. 34(4):300–305. doi:10.17221/375/2015-CJFS.

Chang YJ, Hsu SL, Liu YT, Lin YH, Lin MH, Huang SJ, Ho J-aA, Wu L-C. 2015. Gallic acid induces necroptosis via TNF- $\alpha$  signaling pathway in activated hepatic stellate cells. *PLoS ONE*. 10(3):e0120713. eng. doi:10.1371/journal.pone.0120713.

Chávez V. KN. 2015. Actividad antiinflamatoria de los coproductos de cacao (*Theobroma cacao*) en células humanas cancerígenas (HT-29). Honduras. 30 p. <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/4556/1/AGI-2015-015.pdf>.

Chequer FMD, Venâncio VdP, Bianchi MdLP, Antunes LMG. 2012. Genotoxic and mutagenic effects of erythrosine B, a xanthene food dye, on HepG2 cells. *Food Chem Toxicol*. 50(10):3447–3451. eng. doi:10.1016/j.fct.2012.07.042.

Escobar L, Alfonso PA, Aristizábal FA. 2009. Valoración de dos métodos de tinción en ensayos de citotoxicidad sobre líneas celulares tumorales. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 11(2):49–56. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/11698/38380>.

Escobar L, Rivera A, Aristizábal FA. 2010. Estudio comparativo de los métodos de resazurina y MTT en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas. *Vitae*. 17(1):67–74. es. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0121-40042010000100009&nrm=iso](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042010000100009&nrm=iso).

Golizeh M, Schneider C, Ohlund LB, Sleno L. 2015. Multidimensional LC–MS/MS analysis of liver proteins in rat, mouse and human microsomal and S9 fractions. *EuPA Open Proteomics*. 6:16–27. doi:10.1016/j.euprot.2015.01.003.

Gómez Juristi M. 2015. Metabolismo de flavonoides y ácidos hidroxicinámicos de la dieta. Estudios de transporte *in vitro* y de disponibilidad en humanos [Doctorado]. Madrid, España: Universidad Complutense de Madrid; [consultado el 31 de ago. de 2018]. <https://eprints.ucm.es/33529/1/T36516.pdf>.

Govea Salas M, Zugasti Cruz A, Silva Belmares SY, Valdivia Urdiales B, Rodríguez Herrera R, Aguilar González CN, Morlett Chávez J. 2013. Actividad anticancerígena del ácido gálico en modelos biológicos *in vitro*. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*; [consultado 2018 jun 1]. 5(9):5–11. <http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/AQM/No.%209/2.html>.

Grootaert C, Kamiloglu S, Capanoglu E, van Camp J. 2015. Cell systems to investigate the impact of polyphenols on cardiovascular health. *Nutrients*. 7(11):9229–9255. eng. doi:10.3390/nu7115462.

Heleno SA, Ferreira ICFR, Calhella RC, Esteves AP, Martins A, Queiroz MJRP. 2014. Cytotoxicity of *Coprinopsis atramentaria* extract, organic acids and their synthesized methylated and glucuronate derivatives. *Food Research International*. 55:170–175. doi:10.1016/j.foodres.2013.11.012.

Heleno SA, Martins A, Queiroz, Maria João R. P, Ferreira ICFR. 2015. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: a review. *Food Chem*. 173:501–513. eng. doi:10.1016/j.foodchem.2014.10.057.

Jeurissen SMF, Punt A, Delatour T, Rietjens IMCM. 2008. Basil extract inhibits the sulfotransferase mediated formation of DNA adducts of the procarcinogen 1'-hydroxyestragole by rat and human liver S9 homogenates and in HepG2 human hepatoma cells. *Food Chem Toxicol*. 46(6):2296–2302. eng. doi:10.1016/j.fct.2008.03.010.

Kim SW, Han YW, Lee ST, Jeong HJ, Kim SH, Kim IH, Lee SO, Kim DG, Kim SH, Kim SZ, et al. 2008. A superoxide anion generator, pyrogallol, inhibits the growth of HeLa cells via cell cycle arrest and apoptosis. *Mol Carcinog*. 47(2):114–125. eng. doi:10.1002/mc.20369.

Kolrep F, Rein K, Lampen A, Hessel-Pras S. 2017. Metabolism of okadaic acid by NADPH-dependent enzymes present in human or rat liver S9 fractions results in different toxic effects. *Toxicol In Vitro*. 42:161–170. eng. doi:10.1016/j.tiv.2017.04.009.

Lima KG, Krause GC, Schuster AD, Catarina AV, Basso BS, Mesquita FC de, Pedrazza L, Marczak ES, Martha BA, Nunes FB, Chiela ECF, Jaeger N, Thomé MP, Haute GV, Dias HB, Donadio MV, De Oliveira JR. 2016. Gallic acid reduces cell growth by induction of apoptosis and reduction of IL-8 in HepG2 cells. *Biomed Pharmacother*. 84:1282–1290. eng. doi:10.1016/j.biopha.2016.10.048.

- López de Felipe F, Las Rivas B de, Muñoz R. 2014. Bioactive compounds produced by gut microbial tannase: Implications for colorectal cancer development. *Front Microbiol.* 5:684. eng. doi:10.3389/fmicb.2014.00684.
- Lu Y, Jiang F, Jiang H, Wu K, Zheng X, Cai Y, Katakowski M, Chopp M, To S-ST. 2010. Gallic acid suppresses cell viability, proliferation, invasion and angiogenesis in human glioma cells. *Eur J Pharmacol.* 641(2-3):102–107. eng. doi:10.1016/j.ejphar.2010.05.043.
- Mansouri MT, Farbood Y, Sameri MJ, Sarkaki A, Naghizadeh B, Rafeirad M. 2013. Neuroprotective effects of oral gallic acid against oxidative stress induced by 6-hydroxydopamine in rats. *Food Chem.* 138(2-3):1028–1033. eng. doi:10.1016/j.foodchem.2012.11.022.
- Marín L, Miguélez EM, Villar CJ, Lombó F. 2015. Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: Antimicrobial properties. *Biomed Res Int.* 2015:905215. eng. doi:10.1155/2015/905215.
- Masibo M, He Q. 2008. Major mango polyphenols and their potential significance to human health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* 7(4):309–319. doi:10.1111/j.1541-4337.2008.00047.x.
- Nemec MJ, Kim H, Marciante AB, Barnes RC, Hendrick ED, Bisson WH, Talcott ST, Mertens-Talcott SU. 2017. Polyphenolics from mango (*Mangifera indica L.*) suppress breast cancer ductal carcinoma *in situ* proliferation through activation of AMPK pathway and suppression of mTOR in athymic nude mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry.* 41:12–19. eng. doi:10.1016/j.jnutbio.2016.11.005.
- Nemec MJ, Kim H, Marciante AB, Barnes RC, Talcott ST, Mertens-Talcott SU. 2016. Pyrogallol, an absorbable microbial gallotannins-metabolite and mango polyphenols (*Mangifera Indica L.*) suppress breast cancer ductal carcinoma *in situ* proliferation *in vitro*. *Food Funct.* 7(9):3825–3833. eng. doi:10.1039/c6fo00636a.
- Olivas-Aguirre FJ, Wall-Medrano A, González-Aguilar GA, López-Díaz JA, Álvarez-Parrilla E, de la Rosa, Laura A., Ramos-Jimenez A. 2015. Taninos hidrolizables; bioquímica, aspectos nutricionales y analíticos y efectos en la salud. *Nutrición Hospitalaria.* 31(1). Español. <http://www.redalyc.org/pdf/3092/309232878005.pdf>.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). 2014. Perfiles oncológicos de los países. [sin lugar]: OMS; [consultado 2018 feb 22]. [http://www.who.int/cancer/country-profiles/hnd\\_es.pdf](http://www.who.int/cancer/country-profiles/hnd_es.pdf).
- OMS (Organización Mundial de la Salud. 2018). Cancer. [sin lugar]: [sin editorial] ; [consultado 2018 abr 2]. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>.
- Pandey KB, Rizvi SI. 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2(5):270–278. eng. doi:10.4161/oxim.2.5.9498.

- Park WH. 2016. Pyrogallol induces the death of human pulmonary fibroblast cells through ROS increase and GSH depletion. *Int J Oncol.* 49(2):785–792. eng. doi:10.3892/ijo.2016.3543.
- Parmentier Y, Bossant MJ, Bertrand M, Walther B, editores. 2007a. *Comprehensive Medicinal Chemistry II*. Francia: Elsevier. ISBN: 9780080450445.
- Parmentier Y, Bossant M-J, Bertrand M, Walther B. 2007b. *In vitro* studies of drug metabolism. En: Parmentier Y, Bossant MJ, Bertrand M, Walther B, editores. *Comprehensive Medicinal Chemistry II*. Francia: Elsevier. p. 231–257.
- Piazzon A, Vrhovsek U, Masuero D, Mattivi F, Mandoj F, Nardini M. 2012. Antioxidant activity of phenolic acids and their metabolites: Synthesis and antioxidant properties of the sulfate derivatives of ferulic and caffeic acids and of the acyl glucuronide of ferulic acid. *J Agric Food Chem.* 60(50):12312–12323. eng. doi:10.1021/jf304076z.
- Pimpão RC, Dew T, Figueira ME, McDougall GJ, Stewart D, Ferreira RB, Santos CN, Williamson G. 2014. Urinary metabolite profiling identifies novel colonic metabolites and conjugates of phenolics in healthy volunteers. *Mol Nutr Food Res.* 58(7):1414–1425. eng. doi:10.1002/mnfr.201300822.
- Pimpão RC, Dew T, Oliveira PB, Williamson G, Ferreira RB, Santos CN. 2013. Analysis of phenolic compounds in portuguese wild and commercial berries after multienzyme hydrolysis. *J Agric Food Chem.* 61(17):4053–4062. eng. doi:10.1021/jf305498j.
- Pimpão RC, Ventura MR, Ferreira RB, Williamson G, Santos CN. 2015. Phenolic sulfates as new and highly abundant metabolites in human plasma after ingestion of a mixed berry fruit purée. *Br J Nutr.* 113(3):454–463. eng. doi:10.1017/S0007114514003511.
- Quiñones M, Miguel M, Aleixandre A. 2012. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria.* 27(1):76–89.
- RDG (Roche Diagnosed GmbH). 2008. Apoptosis, cytotoxicity and cell proliferation. 4th edition. Germany: [sin editorial]. 186 p.
- Richardson SJ, Bai A, Kulkarni AA, Moghaddam MF. 2016. Efficiency in drug discovery: liver S9 fraction assay as a screen for metabolic stability. *Drug Metabolism Letters.* 10(2):83–90. doi:10.2174/1872312810666160223121836.
- Richter LHJ, Flockerzi V, Maurer HH, Meyer MR. 2017. Pooled human liver preparations, HepaRG, or HepG2 cell lines for metabolism studies of new psychoactive substances: a study using MDMA, MDBD, butylone, MDPPP, MDPV, MDPB, 5-MAPB, and 5-API as examples. *J Pharm Biomed Anal.* 143:32–42. eng. doi:10.1016/j.jpba.2017.05.028.

Sadeghi Ekbatan S, Iskandar MM, Sleno L, Sabally K, Khairallah J, Prakash S, Kubow S. 2018. Absorption and metabolism of phenolics from digests of polyphenol-rich potato extracts using the Caco-2/HepG2 co-culture system. *Foods*. 7(1):8–18. <http://www.mdpi.com/2304-8158/7/1/8/pdf>. doi:10.3390/foods7010008.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. 2018. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 68(1):7–30. eng. doi:10.3322/caac.21442.

Silva IC, Polaquini CR, Regasini LO, Ferreira H, Pavan FR. 2017. Evaluation of cytotoxic, apoptotic, mutagenic, and chemopreventive activities of semi-synthetic esters of gallic acid. *Food Chem Toxicol*. 105:300–307. eng. doi:10.1016/j.fct.2017.04.033.

Sun G, Zhang S, Xie Y, Zhang Z, Zhao W. 2016. Gallic acid as a selective anticancer agent that induces apoptosis in SMMC-7721 human hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Lett*. 11(1):150–158. eng. doi:10.3892/ol.2015.3845.

Talcott S, Talcott S. 2018. Metabolismo *in vitro* de polifenoles del mango y sus actividades anti-inflamatorias. College Station, TX: Texas A&M University; [consultado el 7 de jun. de 2018]. [http://www.mango.org/wp-content/uploads/2018/04/Metabolism\\_Mango\\_Polyphenols\\_Spn.pdf](http://www.mango.org/wp-content/uploads/2018/04/Metabolism_Mango_Polyphenols_Spn.pdf).

Thompson MA. 2013. Handbook on gallic acid: Natural occurrences, antioxidant properties and health implications. Hauppauge NY: Nova Publishers. xv, 350 (Biochemistry research trends). ISBN: 978-1-62618-921-8.

Upadhyay G, Tiwari MN, Prakash O, Jyoti A, Shanker R, Singh MP. 2010. Involvement of multiple molecular events in pyrogallol-induced hepatotoxicity and silymarin-mediated protection: Evidence from gene expression profiles. *Food Chem Toxicol*. 48(6):1660–1670. eng. doi:10.1016/j.fct.2010.03.041.

Venancio VP, Cipriano PA, Kim H, Antunes LMG, Talcott ST, Mertens-Talcott SU. 2017. *Cocoplum (Chrysobalanus icaco L.)* anthocyanins exert anti-inflammatory activity in human colon cancer and non-malignant colon cells. *Food Funct*. 8(1):307–314. eng. doi:10.1039/c6fo01498d.

Verma S, Singh A, Mishra A. 2013. Gallic acid: Molecular rival of cancer. *Environ Toxicol Pharmacol*. 35(3):473–485. eng. doi:10.1016/j.etap.2013.02.011.

Vetrani C, Rivellese AA, Annuzzi G, Adiels M, Borén J, Mattila I, Oresic M, Aura AM. 2016. Metabolic transformations of dietary polyphenols: Comparison between *in vitro* colonic and hepatic models and *in vivo* urinary metabolites. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 33:111–118. doi:10.1016/j.jnutbio.2016.03.007.

Wang J, Shen X, Yuan Q, Yan Y. 2018. Microbial synthesis of pyrogallol using genetically engineered *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*. 45:134–141. eng. doi:10.1016/j.ymben.2017.12.006.

Wang Q, Zhou K, Ning Y, Zhao G. 2016. Effect of the structure of gallic acid and its derivatives on their interaction with plant ferritin. *Food Chem.* 213:260–267. eng. doi:10.1016/j.foodchem.2016.06.085.

## 7. ANEXOS

### Anexo 1. Cálculos de preparación de tratamientos

La solución stock para ácido gálico y pirogalol fue 5,000 µg/ml

$$5,000 \mu\text{g/ml} \times X \mu\text{L} = 200 \mu\text{g/ml} \times 5,000 \mu\text{L}$$

$$X = 200 \mu\text{L solución de trabajo} + 4,800 \mu\text{L de medio celular}$$

$$1 \mu\text{g/mL} = 200 \mu\text{g/ml} \times X \mu\text{L} = 1 \mu\text{g/ml} \times 2,000 \mu\text{L}$$

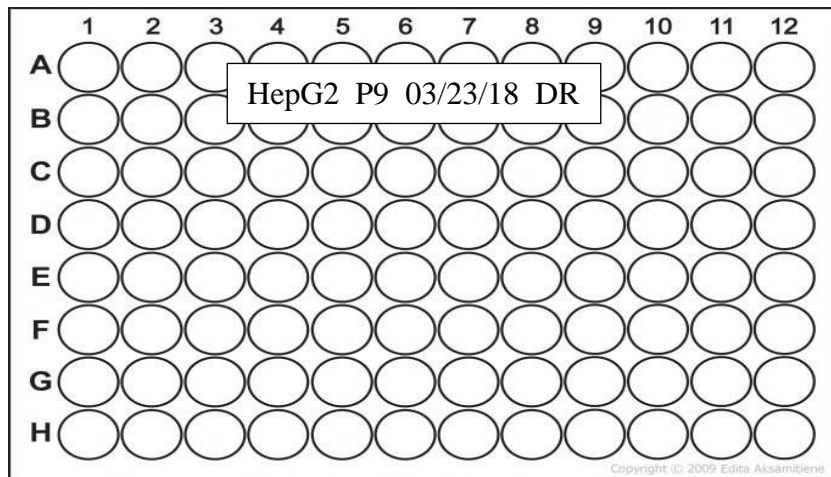
$$X = 10 \mu\text{L solución de trabajo} + 1,990 \mu\text{L de medio celular}$$

$$50 \mu\text{g/mL} = 200 \mu\text{g/ml} \times X \mu\text{L} = 50 \mu\text{g/ml} \times 2,000 \mu\text{L}$$

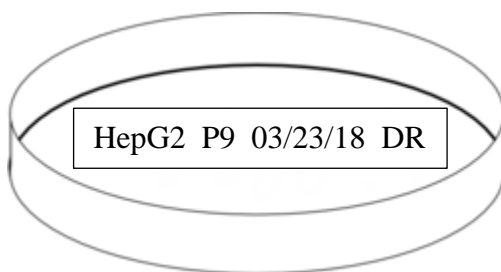
$$X = 500 \mu\text{L solución de trabajo} + 1,500 \mu\text{L de medio celular}$$

### Anexo 2. Ejemplo de etiquetado de platos para proliferación celular

#### 1. Plato de proliferación celular



2. Plato petri

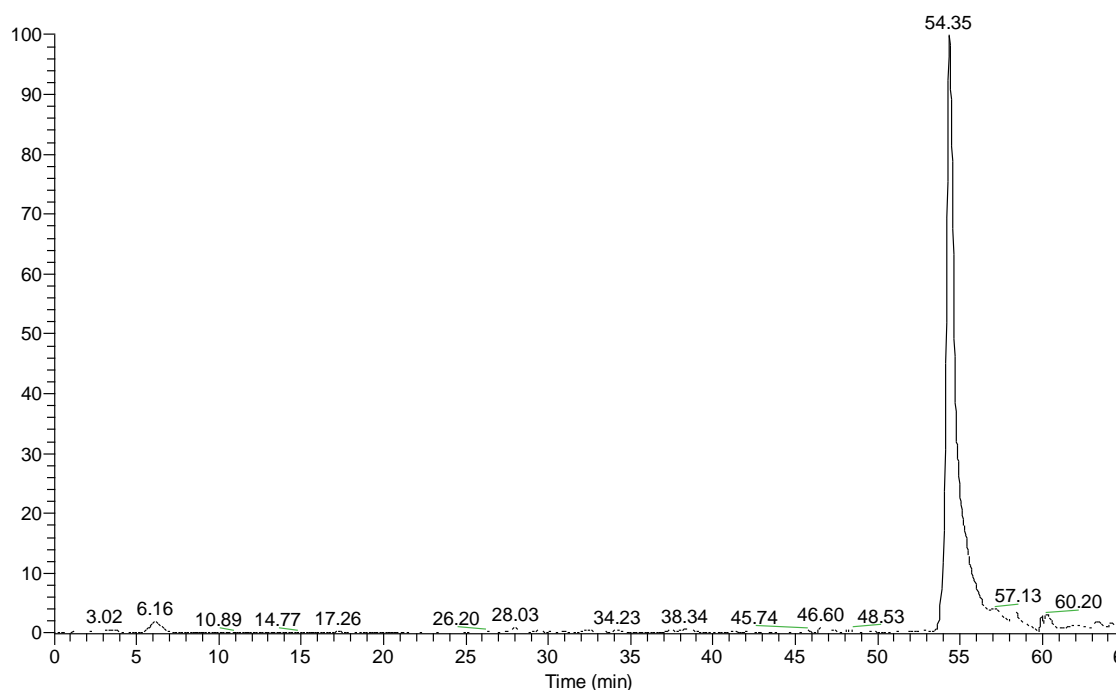


**Anexo 3.** Información estadística de proliferación celular

Tratamiento	Parámetro			
	Pr>F	Valor F	R-Cuadrado	CV <sup>δ</sup>
Ácido gálico	<.0001	7.82	0.76	9.54
Pirogalol	<.0001	38.49	0.94	4.97
Ácido gálico + Pirogalol	<.0001	12.37	0.83	11.59
Ácido gálico + S9	<.0001	9.95	0.78	11.65
Pirogalol + S9	<.0001	11.89	0.81	9.61
Ácido gálico + Pirogalol + S9	0.0001	5.47	0.66	12.62

<sup>δ</sup> CV: Coeficiente de Variación

**Anexo 4.** Cromatografía de muestra de fracción celular de pirogalol + S9



**Anexo 5. Cromatografía de control + S9 (fracción S9)**

