

**Actividad antiinflamatoria del mango
(*Mangifera indica*) en preadipocitos (3T3-L1)**

Roberto Antonio Cedillos Hernández

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano

Honduras

Noviembre, 2016

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Actividad antiinflamatoria del mango (*Mangifera indica*) en preadipocitos (3T3-L1)

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

Roberto Antonio Cedillos Hernández

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2016

Actividad antiinflamatoria del mango (*Mangifera indica*) en preadipocitos (3T3-L1)

Roberto Antonio Cedillos Hernández

Resumen. El estrés oxidativo se ha relacionado con enfermedades crónicas como cáncer, diabetes y enfermedades cardiovasculares, por lo que se vuelve una necesidad investigar y contribuir a la prevención de las mismas. El mango toma relevancia porque tiene polifenoles que tienen propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. El objetivo de este estudio fue determinar la capacidad antioxidante y antiinflamatoria que posee el ácido gálico, pirogalol y extracto de mango en preadipocitos (3T3-L1). Se utilizaron diseños experimentales completamente al azar. Las propiedades biológicas que se evaluaron fueron: proliferación celular (tres compuestos y ocho concentraciones) usando resazurina; especies reactivas de oxígeno (tres compuestos y cinco concentraciones) mediante la prueba DCFH-DA y expresión genética de marcadores de inflamación (dos compuestos y tres concentraciones) por medio de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. Los tratamientos disminuyeron la proliferación celular. El ácido gálico inhibió el crecimiento celular a la concentración de 0.31 mg/L y superiores. El pirogalol (metabolito del ácido gálico) y extracto de mango inhibieron la proliferación celular a partir de la concentración 0.62 mg/L. Los tratamientos no fueron eficientes en la reducción de especies reactivas de oxígeno. Finalmente, el estudio resaltó la actividad antiinflamatoria de ácido gálico reduciendo la expresión de los genes NF- κ B e IL-6 y pirogalol para el gen NF- κ B. Se recomienda utilizar otros agentes inflamatorios, determinar las proteínas de inflamación por western blot y continuar estudios *in vivo*.

Palabras Clave: Estrés oxidativo, inflamación, polifenoles, radicales libres.

Abstract. The oxidative stress has been related with chronic diseases such as cancer, diabetes and cardiovascular diseases, this is why it becomes a need to investigate and contribute to prevent these diseases. Mango takes relevance because it contains polyphenols that have antioxidant and antiinflammatory properties. The objective of this study was to determine the antioxidant and antiinflammatory capacity that gallic acid, pyrogallol and mango extract have in preadipocytes (3T3-L1). Completely randomized experimental designs were used. The biological properties studied were: cell proliferation (three compounds and eight concentrations) using resazurin; reactive oxygen species (three compounds and five concentrations) through DCFH-DA assay and gene expression (two compounds and three concentrations) by real time polymerase chain reaction. The treatments reduced cell proliferation. Gallic acid inhibited cell growth at 0.31 mg/L concentration and above. Pyrogallol (gallic acid metabolite) and mango extract inhibited cell proliferation from 0.62 mg/L concentration. The treatments were not efficient reducing reactive oxygen species production. Finally, the study showed the antiinflammatory activity of gallic acid by reducing NF- κ B and IL-6 genes and pyrogallol by reducing NF- κ B gene expression. It is recommended to use other inflammatory agents, determine inflammation proteins through western blot and continue *in vivo* studies.

Key words: Free radicals, inflammation, oxidative stress, polyphenols.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	9
4. CONCLUSIONES	21
5. RECOMENDACIONES	22
6. LITERATURA CITADA.....	23
7. ANEXOS	29

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Diseño experimental para proliferación celular en preadipocitos (3T3-L1).	3
2. Diseño experimental para especies reactivas de oxígeno en preadipocitos (3T3-L1). 4	
3. Diseño experimental para expresión genética en preadipocitos (3T3-L1).	4

Figuras	Página
4. Modelos estructurales de ácido gálico y pirogalol en su forma libre.	9
5. Proliferación de los preadipocitos (3T3-L1) en presencia de ácido gálico.	10
6. Proliferación de los preadipocitos (3T3-L1) en presencia de pirogalol.	11
7. Proliferación de los preadipocitos (3T3-L1) en presencia de extracto de mango. .	12
8. Generación de especies reactivas de oxígeno en presencia de ácido gálico en preadipocitos (3T3-L1).	13
9. Generación de especies reactivas de oxígeno en presencia de pirogalol en preadipocitos (3T3-L1).	14
10. Generación de especies reactivas de oxígeno en presencia de extracto de mango en preadipocitos (3T3-L1).	15
11. Efecto de los tratamientos en la expresión del primer NF- κ B, en preadipocitos (3T3-L1).	17
12. Efecto de los tratamientos en la expresión del primer MCP-1 en preadipocitos (3T3-L1).	18
13. Efecto de los tratamientos en la expresión del primer IL-1 β en preadipocitos (3T3-L1).	19
14. Efecto de los tratamientos en la expresión del primer IL-6 en preadipocitos (3T3-L1).	20

Anexos	Página
1. Abreviaturas	29
2. Ejemplos de cálculos de preparación de tratamientos	29
3. Platos y ejemplo de etiquetado para los ensayos celulares.....	30
4. Cromatograma y tabla descriptiva de compuestos presentes en la pulpa de mango variedad Keitt con HPLC a 280 nm	31
5. Ejemplo de cuantificación, calificación y dilución de ARN extraído de células preadipocitos (3T3-L1).....	32
6. Continuación de cuantificación, calificación y dilución de ARN extraído de células preadipocitos (3T3-L1).....	33
7. Información estadística de la proliferación celular	34
8. Información estadística de la producción de especies reactivas de oxígeno	34
9. Información estadística de los marcadores de inflamación	34

1. INTRODUCCIÓN

Es importante mantener hábitos de consumo y estilos de vida más saludables. Esto con el fin de reducir las probabilidades de contraer enfermedades crónicas tales como el cáncer, diabetes, complicaciones del sistema circulatorio y respiratorio. Las anteriores son las principales causas de muertes en el mundo. En el año 2008 se registraron 36 millones de personas que murieron por alguna enfermedad crónica afectando a hombres y mujeres por igual (OMS 2013).

La obesidad es una de las enfermedades que ha tomado gran relevancia. Para el año 2014 se calculaba la muerte de 2.8 millones de personas a causa de obesidad o sobrepeso (OMS 2014). La obesidad es caracterizada por un exceso en el almacenamiento de grasa en el tejido adiposo además de estar relacionado con el aumento del estrés oxidativo e inflamación que pueden desencadenar enfermedades crónicas (Hostis *et al.* 2006).

El estrés oxidativo corresponde al desbalance que existe entre agentes oxidantes como especies reactivas de oxígeno (ROS) y antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD) y compuestos polifenólicos (Venereo 2002). Este desbalance puede resultar en el daño a las células del organismo ya que los agentes oxidantes tienen la capacidad de atacar lípidos y ADN (Betteridge 2000). Las especies reactivas de oxígeno se definen como moléculas que poseen oxígeno y pueden tener carga (positiva o negativa) o no y que tiene la capacidad de oxidar otras moléculas (Camps *et al.* 2010).

En contraste, los polifenoles son compuestos bioactivos que presentan uno o varios anillos fenólicos, se originan como producto del metabolismo secundario en las plantas y están clasificados basados en el número de anillos y elementos estructurales que presenten (Bravo 1998). Poseen propiedades antioxidantes, actividades enzimáticas (Quiñones *et al.* 2011) y se caracterizan por ser compuestos muy hidrofílicos (Manach *et al.* 2003).

El mango (*Mangifera indica*) es un cultivo de origen asiático considerado como el rey de las frutas debido a su buen sabor y textura que gusta a las personas (Kulkarni 2005). Se reporta más de 1000 variedades (Prakash y Khan 2005) y es considerado de gran importancia en la dieta y economía de más de 85 países predominando en climas tropicales (De la Cruz y García 2002). Posee antioxidantes compuestos fenólicos y carotenoides (Reyes 2010); es por esto que se considera que tiene potencial para combatir los padecimientos involucrados con la inflamación porque han demostrado aumentar la expresión de antioxidantes y el bloqueo de la producción de citoquinas inflamatorias dentro de las células (Chuang y McIntosh 2011; Middleton *et al.* 2000).

Los polifenoles encontrados en el mango pueden variar en cantidades y tipos dependiendo de la variedad (Berardini *et al.* 2005). Sin embargo, para la mayoría de cultivares se reporta ácido gálico y sus derivados en forma de galotaninos hidrolizables que están presentes en las hojas, corteza, fruto o cáscara (Krenek *et al.* 2014).

Cuando el cuerpo entra en un proceso de infección o daño al tejido, pueden ocurrir procesos de inflamación. Ésta es una respuesta natural en defensa del organismo y en la que interviene el sistema inmune para combatir el daño generado. Existen repercusiones negativas cuando este proceso se da de manera prolongada y existe la liberación exagerada de citoquinas, las cuales son moléculas que regulan el proceso de inflamación y pueden provocar daños al tejido (Calder *et al.* 2009, Arbizu 2013).

Por lo descrito anteriormente, este estudio se llevó a cabo para determinar el efecto de los compuestos de mango en la proliferación celular, generación de especies reactivas de oxígeno e inflamación a través de marcadores moleculares con el fin de contribuir a la investigación del potencial de los polifenoles en la nutrición y medicina.

Para este estudio se plantearon los siguientes objetivos:

- Evaluar el efecto de ácido gálico, pirogalol y extracto de mango en la proliferación celular en preadipocitos (3T3-L1).
- Determinar el efecto del ácido gálico, pirogalol y extracto de mango en la producción de especies reactivas de oxígeno en preadipocitos (3T3-L1).
- Evaluar el efecto del ácido gálico y pirogalol en la expresión genética de los marcadores de inflamación: NF- κ B, MCP-1, IL-1 β e 1L-6.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del estudio. El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de química y nutrición del departamento de Nutrición y Ciencia de los Alimentos de la Universidad de Texas A&M, ubicada en 400 Bizzell Street, College Station en el estado de Texas, Estados Unidos de América.

Diseño experimental. Para desarrollar el estudio se realizaron tres diferentes diseños experimentales, uno para cada propiedad biológica estudiada. El primero de éstos fue para evaluar la proliferación celular. Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) (tres compuestos y ocho concentraciones), los compuestos usados fueron: ácido gálico, pirogalol y extracto de mango (variedad Keitt) y las concentraciones fueron las siguientes: 0.31, 0.62, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 mg/L (Cuadro 1). Cabe destacar que se utilizaron controles en los cuales hubo células a las cuales no se les aplicó ningún compuesto. Hubo un total de 25 tratamientos con siete muestras para cada uno y tres repeticiones para un total de 525 unidades experimentales.

Cuadro 1. Diseño experimental para proliferación celular en preadipocitos (3T3-L1).

Compuestos	Concentración (mg/L)							
	0.31	0.62	1.25	2.5	5	10	20	40
Ácido gálico	T ^λ 1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
Pirogalol	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16
Extracto de mango	T17	T18	T19	T20	T21	T22	T23	T24
Control ^Ω	T 25							

^λT: Tratamiento. ^Ω Control: células sin presencia de compuestos.

Para realizar el experimento de especies reactivas de oxígeno se utilizó un DCA (tres compuestos y cinco concentraciones), se utilizaron los mismos compuestos que se usaron en el ensayo de proliferación celular y se usaron las siguientes concentraciones: 0.62, 1.25, 2.5, 5 y 10 mg/L (Cuadro 2), las mismas fueron escogidas para fines investigativos y prácticos. Cabe destacar que hubo controles negativos en los cuales hubo células que no estuvieron en presencia de los compuestos y que no fueron inducidas a inflamación por la citoquina factor de necrosis tumoral (TNF α). También, hubo controles positivos en los cuales hubo células que estuvieron sin presencia de los compuestos pero que sí fueron inducidas a inflamación con el TNF α (10 ng/ml), para su posterior comparación y análisis. Se tuvieron 17 tratamientos con siete muestras por repetición y tres repeticiones, para un total de 357 unidades experimentales.

Cuadro 2. Diseño experimental para especies reactivas de oxígeno en preadipocitos (3T3-L1).

Compuestos	Concentración (mg/L)				
	0.62	1.25	2.5	5	10
Ácido gálico	T ^λ 1	T 2	T 3	T 4	T 5
Pirogalol	T 6	T 7	T 8	T 9	T 10
Extracto de mango	T 11	T 12	T 13	T 14	T 15
Control negativo ^Ω			T16		
Control positivo ^Σ			T17		

^λT: Tratamiento. ^ΩControl negativo: células sin mediador inflamatorio TNF α y sin compuestos.

^Σ Control positivo: células inducidas a inflamación con TNF α (10ng/mL) en ausencia de compuestos.

Para el análisis de la expresión genética se empleó un DCA (dos compuestos y tres concentraciones). Se utilizó ácido gálico y pirogalol en las siguientes concentraciones: 0.62, 1.25, 2.5 mg/L (Cuadro 3). Se tuvo controles negativos y positivos descritos anteriormente. Hubo ocho tratamientos, seis replicas por ensayo, dos repeticiones y cuatro citoquinas a identificar para un total de 384 unidades experimentales.

Cuadro 3. Diseño experimental para expresión genética en preadipocitos (3T3-L1).

Compuestos	Concentración (mg/L)		
	0.62	1.25	2.5
Ácido gálico	T ^λ 1	T2	T3
Pirogalol	T4	T5	T6
Control negativo ^Ω			T7
Control positivo ^Σ			T8

^λT: Tratamiento. ^ΩControl negativo: células sin mediador inflamatorio TNF α y sin compuestos.

^Σ Control positivo: células inducidas a inflamación con TNF α (10ng/mL) en ausencia de compuestos.

Para el análisis de las muestras se utilizó una separación de medias Duncan para encontrar diferencias estadísticas entre tratamientos con un nivel de significancia de 5%. Los resultados se analizaron con el programa “Statistical Analysis System” (SAS[®] versión 9.4).

Preparación de extractos. Se pesaron y licuaron 600 g de mango con el fin de romper estructuras e incrementar el área superficial. A continuación, se agregó una mezcla de solventes orgánicos en proporción de uno de mango por dos de solvente. La mezcla estaba conformada por metanol y acetona en partes iguales. El solvente se agregó a la pulpa de mango y se homogenizó con el fin de extraer los polifenoles contenidos de la misma. La mezcla se dejó en reposo durante media hora y se filtró con una manta para elaborar quesos, separando así, la parte líquida de la parte sólida. Éste proceso se realizó dos veces más, con el fin de lograr la mayor extracción de polifenoles posible.

Una vez separados, se removió el solvente por evaporación, calentando la mezcla a 60 °C en presencia de vacío durante tres horas. Posteriormente, se usó papeles filtro para separar los compuestos (carotenoides) que se separaron de la solución en el proceso de evaporación, lo anterior, ocurrió debido a diferencias entre naturalezas químicas. Una vez obtenida la mezcla con la mayor parte de solventes removidos, se utilizó diatomita para filtrar la solución. Finalmente, se pasó por una columna de carbono 18 con el fin de remover proteínas, azúcares y fibras solubles y así concentrar los polifenoles del extracto.

Siembra de las células y división de las células. Se usaron preadipocitos de la línea 3T3-L1 (ATCC, Manassas, VA) siguiendo el protocolo de Noratto y colaboradores (2010) adaptado a preadipocitos. Las células se tomaron de un criocontenedor (1 mL) almacenado en el tanque de nitrógeno líquido (Thermolyne Locator[®] Cryo biological storage system), éste las mantenía a temperatura de criopreservación (-190 °C aproximadamente) y se descongelaron a baño María (ISOTemp 210) a una temperatura de 37 °C durante un minuto aproximadamente.

En el área de trabajo de la cabina de bioseguridad (Thermo Scientific forma 1400 series) previamente preparada (aplicando alcohol al 70% en la superficie), se transfirió el contenido del criocontenedor a un plato Petri previamente identificado (línea celular, número de pasaje, fecha de siembra e iniciales de la persona que realizó el proceso), utilizando una micropipeta. Se agregaron 9 mL del medio de cultivo, éste estaba conformado por 500 mL de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Invitrogen, Carlsbad, CA), 50 mL de suero fetal bovino (FBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA) al 100% y 5 mL de penicilina, usando una pipeta electrónica (Pipete-Aid[®]). Una vez agregado, se realizaron movimientos oscilantes para mezclar las células con el medio y posteriormente, se almacenaron en la incubadora (Forma[™] Series II 3110 Water-Jacketed CO₂ Incubators) que alojó a las células durante un día a 37 °C y 5% de dióxido de carbono (CO₂) para permitir la adhesión y crecimiento de las células en el fondo del plato.

Después de 24 horas, las células se observaron bajo el microscopio (Jenco USA[™]) y se determinó el estado y confluencia de manera empírica; una vez alcanzado aproximadamente el 70% de confluencia se dividió las células. Si el porcentaje de confluencia era menor, se cambiaba el medio de cultivo de la siguiente manera: se aspiraba (bomba de vacío) el medio anterior, se agregaban 10 mL de medio de cultivo nuevo y se dejaba otro día en incubación hasta alcanzar la confluencia deseada.

Una vez alcanzada la confluencia esperada, bajo la cámara de flujo laminar, se extrajo el medio usando un aspirador y se agregaron 5 mL de buffer fosfato salino (PBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA) de manera lenta, liberándolos en la pared y no al fondo del plato, con el fin de evitar el desprendimiento de las células del fondo del plato. Lo anterior se realizó para enjuagar las células y suspender las que no se habían logrado adherir al fondo del plato (células muertas). Posteriormente, se aspiró el PBS del plato evitando tocar el fondo del mismo (ligeramente inclinado y por la pared). Una vez extraído el PBS, se agregaron 2 mL de tripsina (Invitrogen, Carlsbad, CA) al 0.25% para desprender las células del fondo del plato y se dejó de tres a cinco minutos en la incubadora.

Finalizado el tiempo, las células se observaron bajo el microscopio para confirmar el desprendimiento de las mismas del fondo del plato. Posteriormente, se agregaron 8 mL de FBS al 10% en la brevedad de lo posible para detener la acción de la tripsina ya que la acción prolongada de la tripsina podía dañar a las células. Consecuentemente, se transfirió el contenido del plato (10 mL) con una pipeta electrónica a un tubo tipo Falcon de 50 mL. Se centrifugó la suspensión a 1200 revoluciones por minuto (rpm) a 25 °C (Jovan CR3: Centrifuga Multifunción, Thermo Electron Corporation), asegurándose que la centrifugadora tuviese el balance correcto (10 mL para este caso). Una vez confirmada la separación del sobrenadante y sedimento celular, se aspiró el sobrenadante con ayuda del aspirador dejando el sedimento celular en el fondo del tubo.

Se agregaron 2 mL de medio de cultivo y se homogenizaron con el sedimento celular con la micropipeta hasta que el sedimento celular se diluyera en su totalidad. Finalmente se agregó 1 mL de la suspensión a los platos Petri para su división, éstos debían estar previamente identificados. Se le agregaron 9 mL de medio de cultivo a cada uno y se almacenaron en la incubadora hasta encontrar la confluencia deseada cambiando el medio de cultivo cada dos días.

Preparación de células. Una vez alcanzada la confluencia esperada, bajo la cámara de flujo laminar, se extrajo el medio anterior usando un aspirador y se le agregaron 5 mL PBS de manera lenta, liberándolos en la pared y no al fondo del plato para evitar el desprendimiento de las células del fondo del plato. Lo anterior se realizó para enjuagar las células y suspender las que no se habían logrado adherir al fondo del plato (células muertas). Posteriormente, se aspiró el PBS del plato evitando tocar el fondo del mismo (ligeramente inclinado y por la pared). Una vez extraído el PBS, se agregaron 2 mL de tripsina al 0.25% para desprender las células del fondo del plato y se dejó de tres a cinco minutos en la incubadora.

Finalizado el tiempo, las células se observaron bajo el microscopio para confirmar el desprendimiento de las mismas. Posteriormente, se agregaron 8 mL de FBS al 10% en la brevedad de lo posible para detener la acción de la tripsina. Consecuentemente, se transfirió el contenido del plato (10 mL) con una pipeta electrónica a un tubo tipo Falcon de 50 mL. Se centrifugó la suspensión a 1200 rpm a 25 °C, asegurándose que la centrifugadora tuviese el balance correcto (10 mL para este caso). Una vez confirmada la separación del sobrenadante del sedimento celular, se aspiró el sobrenadante con ayuda del aspirador dejando el sedimento celular en el fondo del tubo.

Se agregó 1 mL y se homogenizó hasta diluir completamente el sedimento celular. El siguiente paso consistió en determinar la concentración de la suspensión para su posterior dilución; para ello, se tomaron 10 µL de la suspensión celular y se depositaron en un tubo tipo Eppendorf de 1.5 mL de capacidad, luego se le agregaron 10 µL de azul de tripano y se homogenizó. Finalmente, se tomaron 10 µL de la solución formada y se depositaron en una lámina de recuento celular, ésta fue leída con el contador celular (Countess automated cell counter), una vez encontrada la concentración de la suspensión celular, se calculó la cantidad de medio a agregar para poder diluir según las necesidades de cada ensayo.

Proliferación celular. En la determinación de la proliferación celular, se siguió el procedimiento utilizado por Marimoutou y colaboradores (2015). Se necesitaron 30 mL de la suspensión celular con una concentración de 60,000 células por mililitro. Además, se necesitaron tres platos de 96 pocillos color negro. Se transfirieron 100 μ L de la suspensión celular a cada pocillo con una multipipeta para obtener un total de 6,000 células por pocillo aproximadamente. Los platos se incubaron durante 24 horas hasta que las células se adhirieron al fondo de los pocillos.

Al día siguiente, con la técnica de dilución en serie se prepararon las ocho concentraciones para los tres compuestos en el medio de cultivo. Se removió el medio antiguo con el aspirador y se agregaron 200 μ L a cada pocillo para cada tratamiento descrito, cabe destacar que para los controles negativos, se agregaron 200 μ L de medio de cultivo sin ningún compuesto. Después de 48 horas, se agregaron 20 μ L de resazurina a cada pocillo y se esperaron tres horas para realizar la lectura de absorbancia a 490 nm en el contador de partículas electrónico FLUOstar Omega microplate reader (BMG, Labtech Inc., Durham, NC).

Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Para la determinación de la producción de ROS, se siguió el procedimiento que usó Noratto y colaboradores (2010) adaptada a las células preadipocitos (3T3-L1). Se tomaron 20 mL de la suspensión celular con una concentración de 60,000 células por mililitro. Además, se usaron dos platos de 96 pocillos color negro. Se sembraron 100 μ L de la suspensión celular en cada pocillo con el fin de obtener un aproximado de 6,000 células por pocillo.

Al día siguiente, se prepararon las cinco concentraciones para los tres compuestos con la técnica de dilución en serie en medio de cultivo. Posteriormente, se agregaron 100 μ L a cada pocillo correspondiente a cada tratamiento. Para los controles positivos y negativos se utilizó medio de cultivo sin ningún tratamiento. Al término de tres horas, se prepararon nuevamente las diluciones, pero el medio que se utilizó para preparar la segunda aplicación, poseía TNF α (20 ng/mL) y se agregaron 100 μ L a cada pocillo correspondiente. Finalmente, los platos se colocaron en la incubadora durante tres horas más.

Finalizado el tiempo, se aspiró el medio anterior y se enjuagó con 100 μ L de PBS dos veces (aspirando el PBS entre cada enjuague). Luego, se agregaron 100 μ L a cada pocillo de la dilución de 1 μ L de 2',7', Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) en 1 mL de medio de cultivo DMEM sin colorante fenol rojo. Los platos se incubaron durante 30 minutos y finalizado el tiempo, se realizó la lectura en el lector de microplatos a 480 nm de excitación y 520 nm de emisión.

Extracción de ácido ribonucleico (ARN). Para el ensayo de identificación de marcadores de inflamación, se siguió la metodología utilizada por Arbizu (2013). Se utilizaron dos platos de 12 pocillos y 12 mL de suspensión celular a una concentración de 200,000 células por mililitro. Se sembraron 0.5 mL en cada pocillo para obtener un total de 100,000 células por pocillo. Los platos se incubaron por 24 horas con el fin de lograr la adhesión de las células al fondo del plato.

Al día siguiente, con la técnica de dilución en serie, se prepararon las tres concentraciones para los dos compuestos en medio de cultivo y se agregaron los tratamientos a los pocillos correspondientes. Los platos se incubaron durante tres horas y posteriormente, se agregaron nuevamente los tratamientos con la diferencia que la segunda aplicación tuvo el agente inflamatorio TNF α (20ng/mL) (sin aspirar el medio anterior). Una vez agregada la segunda solución, se realizó una espera de 3 horas y a su término, se removió el medio. Se agregaron 5 mL de PBS para enjuagar las células, se aspiró el PBS y se agregaron 350 μ L de RLT Lisis Buffer. Finalmente, se almacenó a -80 °C durante 24 horas.

Se usó el Mini Kit Rneasy QIAGEN Sample & Assays technology, Cat # 74104. Al día siguiente, se descongelaron los platos a temperatura ambiente. Una vez descongelados, se raspó cada pocillo con una espátula para desprender la mayor cantidad de células posible y se mezcló con jeringas de un mililitro. Posteriormente, se agregaron 350 μ L de etanol al 70% al pocillo y se transfirieron a columnas Qia Sherendder spin con un tubo recolector cada una. Se centrifugó a 8000 rpm durante 15 segundos y se descartaron los residuos, se agregaron 700 μ L de Buffer RW1 y se volvió a centrifugar a 8000 rpm durante 15 segundos. Se volvieron a descartar los fluidos del contenedor y posteriormente, se agregaron 500 μ L de buffer RPE y se centrifugaron a 8,000 rpm durante 15 segundos.

Por último, se cambiaron los tubos de colección y se centrifugaron a 8000 rpm durante un minuto, con el fin de eliminar cualquier residuo de las soluciones anteriores. Consecuentemente, se colocaron nuevos tubos de colección de 1.5 mL en la centrifugadora y se agregaron 30 μ L de agua libre de nucleasas, se centrifugaron a 8,000 rpm durante un minuto y así se extrajo el ARN de la columna. El ARN extraído se colocó en hielo para evitar su degradación. Finalmente, se determinó la calidad y cantidad del ARN de las muestras con el espectrofotómetro NanoDrop[®] ND-1000 Thermo Scientific.

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR). Se usaron las cuantificaciones de ARN, se calcularon las cantidades de agua libre de nucleasas y ARN a utilizar (12 μ L en total) y se colocaron en tubos tipo Eppendorf. Se agregaron 3 μ L de la mezcla iScript Reverse Transcription Supermix para obtener un total de 15 μ L y se llevaron al Thermo cycler (Eppendorf), una vez terminado el proceso, se agregaron 100 μ L de agua y se almacenaron a temperatura de 4 °C hasta su uso, con el fin de evitar su degradación.

Se prepararon los primers diluidos de los genes antes descritos. Para ello, se usó el primer anterior y posterior en 10 μ L cada uno y se agregaron 80 μ L de agua libre de nucleasas, se preparó la mezcla Master Mix, conformada por iTaq Universal Probes supermix (300 μ L) y el primer diluido (60 μ L), este proceso se hizo para cada uno de los primers usados.

Se usó un plato para PCR de 384 pocillos y se usaron 6 μ L del Master Mix en cada pocillo (correspondiente a cada primer) y 4 μ L de la muestra diluida para cada plato. Se centrifugó durante cinco minutos a 25 °C y finalmente, se leyó en el equipo de PCR en tiempo real (7900 HT Fast Real Time, Sequence detection system, Applied Biosystems) durante dos horas. Se realizó una cuantificación relativa comparada al ARN de un gen específico (control), en este caso, se usó β -actin, esta comparación permitió determinar si la expresión de estos genes fue suprimida o inducida.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los polifenoles son compuestos que presentan estructuras moleculares caracterizadas por uno o varios anillos fenólicos, originados como producto del metabolismo secundario en las plantas (Bravo 1998). Éstos están divididos en varias clases y sub clases basadas en el número de anillos y elementos estructurales que presenten; poseen propiedades antioxidantes y la capacidad de modular actividades enzimáticas (Quiñones *et al.* 2011), además se caracterizan por ser compuestos muy hidrofílicos (Manach *et al.* 2003).

La cantidad y diversidad de polifenoles presentes en el mango depende de la variedad y etapa del cultivo (Berardini *et al.* 2005). Sin embargo, para la mayoría de cultivares se reporta ácido gálico y sus derivados en forma de galotaninos hidrolizables. Pueden presentarse en las hojas, corteza, o fruto (Krenek *et al.* 2014). El ácido gálico (Figura 1A) es un compuesto de la categoría de ácidos fenólicos y es derivado del ácido hidroxibenzoico (Quiñones *et al.* 2011). Está presente en una gran diversidad de plantas y se puede encontrar de manera libre, en forma de ésteres, éteres y taninos hidrolizables (Karamac *et al.* 2006). El pirogalol (Figura 1B) es un compuesto hidroxilado (Lima *et al.* 2016) que no se encuentra en el mango naturalmente ya que es un metabolito del ácido gálico producido por la microbiota del colón, a través del proceso de descarboxilación (Barnes *et al.* 2015).

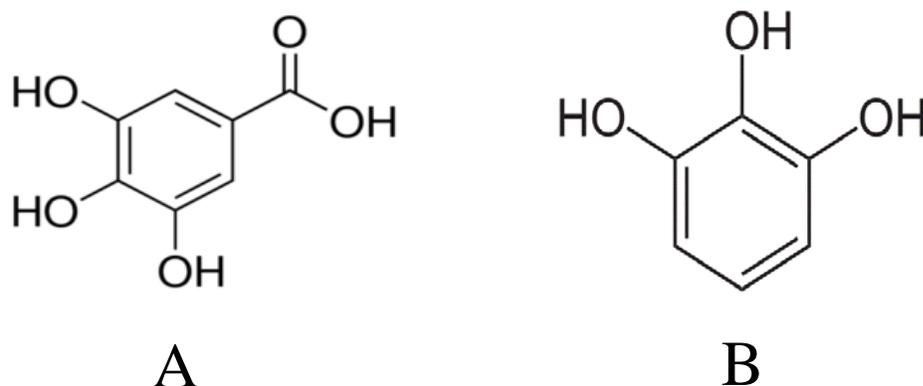


Figura 1. Modelos estructurales de ácido gálico (A) (Karamac *et al.* 2006) y pirogalol (B) (Miyazaki *et al.* 2004) en su forma libre.

Krenek y colaboradores (2014) identificaron más de 15 compuestos en la pulpa de mango variedad Keitt con cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y posteriormente, con espectrofotometría de masas se hizo una cuantificación de los mismos. Gran parte de la composición es ácido gálico conjugado (glucosilado).

Proliferación celular (3T3-L1). La división celular es el proceso en el cual una célula origina dos células hijas con información genética idéntica a la original (Lacadena 1996). El anterior sirve para regenerar tejidos, producir crecimiento y desarrollo del individuo (Audesirk *et al.* 2004). La proliferación celular es el ensayo en el cual se puede determinar el crecimiento celular en un medio de cultivo con algún compuesto y consecuentemente determinar citotoxicidades (RDG 2008). En el ensayo de proliferación celular se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) para ácido gálico (Figura 2).

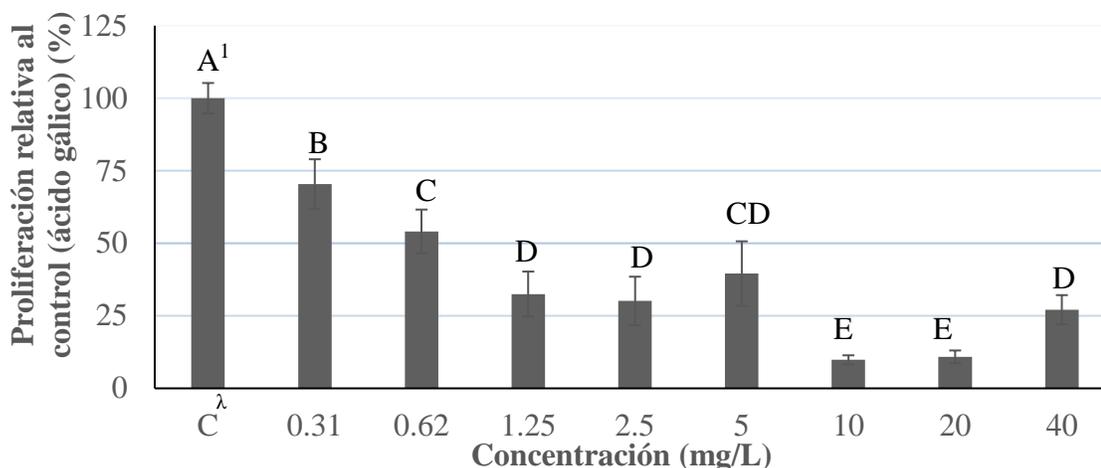


Figura 2. Proliferación de los preadipocitos (3T3-L1) en presencia de ácido gálico. ^λC: Control; células sin presencia de ácido gálico. ¹Diferentes letras indican diferencias estadísticas entre tratamientos ($P < 0.05$).

Un aspecto importante a determinar en cuanto a la toxicidad de un compuesto es la dosis letal 50 (DL₅₀). Ésta es la concentración a la cual la población celular es reducida a un 50% (Repetto y Repetto 2009). Se obtuvo una DL₅₀ para el ácido gálico entre las concentraciones de 0.62 y 1.25 mg/L, debido a que las mismas redujeron la población celular a un 54% y 33%, respectivamente. Estos resultados discrepan con los encontrados por Hsu y colaboradores (2006) en la cual se determinó una LD₅₀ de 7.36 mg/L en células preadipocitos (3T3-L1). Lo anterior se podría explicar debido a factores como errores en el pipeteo y preparación de diluciones, así como también, las diferencias en tiempos y reactivos usados ya que en el estudio anterior, se utilizó resazurina y en el utilizado por Hsu y colaboradores (2006), se usó bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT).

Lo importante a destacar es la susceptibilidad que poseen las células preadipocitos y células saludables en general ante el ácido gálico en comparación con líneas celulares cancerígenas. Otros estudios resaltan la disminución del 47% (cerca de la DL₅₀) de la población en células CG-1 a concentraciones de 8.5 mg/L en células espermatogonias (células que dan origen a los espermatozoides) (Park *et al.* 2007), éstas son similares a las obtenidas por Hsu y colaboradores (2006). En contraste con la DL₅₀ de ácido gálico superiores a 25 mg/L (Lu *et al.* 2010) para diferentes líneas celulares tumorales (U28 y U251n).

Para pirogalol (Figura 3), la DL_{50} se encontró entre las concentraciones de 1.25 y 2.5 mg/L ya que las mismas redujeron la población celular a un 51% y 31%, correspondientemente. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Kim y colaboradores (2008) al descubrir una DL_{50} de 5.67 mg/L en células cancerígenas (HeLa). Además, otros estudios determinaron una DL_{50} de 6.30 mg/L para células del endotelio pulmonar de becerro (CPAEC) y 25.22 mg/L para células endoteliales del cordón umbilical humano (HUVEC) (Han y Park 2010), esto indica que las células preadipocitos resultaron ser más susceptibles a pirogalol que otras líneas celulares.

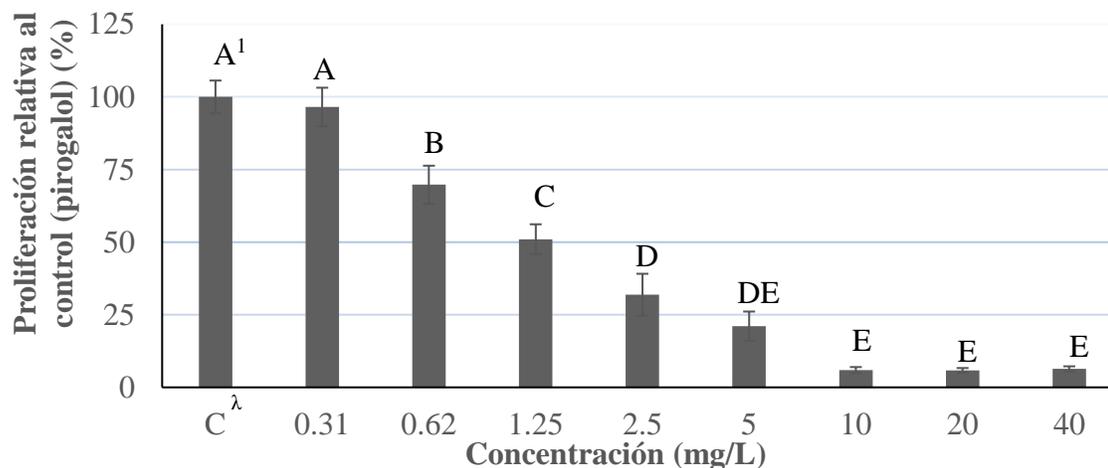


Figura 3. Proliferación de los preadipocitos (3T3-L1) en presencia de pirogalol.
^λC: Control; células sin presencia de pirogalol. ¹ Diferentes letras indican diferencias estadísticas entre tratamientos (P<0.05).

Finalmente, el extracto de mango (Figura 4) presentó un DL_{50} entre 1.25 y 2.5 mg/L, disminuyendo la población a 58% y 48%, respectivamente. Estos resultados concuerdan con los generados por Noratto y colaboradores (2010) en el que establecieron DL_{50} para diferentes variedades de mango. Se probaron cinco variedades en las cuales, las variedades Ataulfo y Haden mostraron unas DL_{50} de 1.6 y 2.3 mg /L, respectivamente. No obstante, las otras variedades (Francis, Kent y Tommy Atkins) obtuvieron unas LD_{50} entre 5 y 27 mg/L. Esto se puede explicar debido a las variaciones en perfiles de polifenoles entre cultivares y etapas del cultivo de mango (Berardini *et al.* 2005) y consecuentemente, su variación en el efecto de proliferación celular.

Se evidenció que el ácido gálico mostró tener una DL_{50} más baja que el extracto de mango y pirogalol. Esto se puede explicar debido a que el extracto de mango usado poseía una diversidad de compuestos fenólicos (manteniendo la misma concentración) y de haberse encontrado compuestos que generaran toxicidades, afectarían en menor medida, debido a que estaban más diluidos. Para la comparación entre ácido gálico y pirogalol se puede explicar debido a que el grupo carboxilo presente en el ácido gálico y ausente en pirogalol fue motivo de un mayor estrés en los preadipocitos.

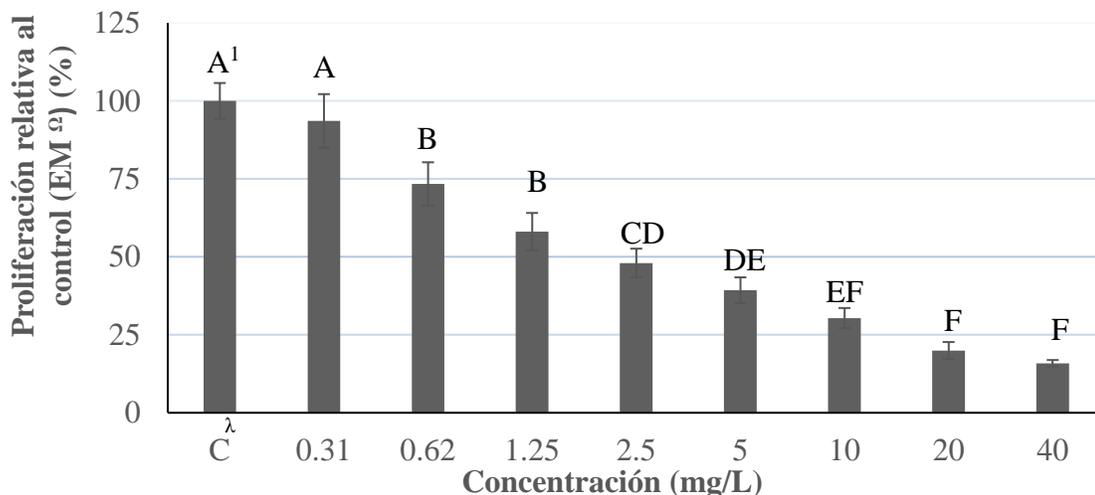


Figura 4. Proliferación de los preadipocitos (3T3-L1) en presencia de extracto de mango. ^λC: Control; células sin presencia de extracto de mango. ^ΩEM: Extracto de mango. ¹Diferentes letras indican diferencias estadísticas entre tratamientos (P<0.05).

Para el pirogalol y extracto de mango se mantuvo una relación inversa entre proliferación celular en todas las concentraciones. Sin embargo, para el ensayo con ácido gálico la concentración de 5 mg/L resultó ser más letal que las concentraciones superiores (10 y 20 mg/L) lo que se puede explicar como un error en la preparación de las diluciones o pipeteo de los tratamiento en las muestras.

La proliferación celular disminuyó a medida que se incrementó la concentración de los tres compuestos usados. Estos resultados son similares a los que se mostró en el estudio de células cancerígenas (HT-29) de Chávez (2015) en los que se usaron extractos de diferentes partes de cacao comparados con un control en el cual no se usó ningún compuesto. Además, los resultados de este estudio contrastan con los que presentó León (2014) en los cuales se utilizó extracto de camote morado y zanahoria negra en células intestinales del miofibroblasto (CCD-18Co). En el anterior se evaluó concentraciones de 10, 25 y 50 mg/L sin encontrar diferencias significativas. Esto se podría explicar debido a la diversidad metabólica que poseen las diferentes células y las diferencias en los perfiles de polifenoles utilizados ya que a pesar de utilizar concentraciones más altas a las de este estudio no provocó reducción en la proliferación celular.

Especies reactivas de oxígeno (ROS). Las especies reactivas de oxígeno se definen como moléculas que poseen oxígeno que pueden tener carga (positiva o negativa) o no y que tiene la capacidad de oxidar otras moléculas (Camps *et al.* 2010). En organismos vivos son producidos de manera natural originadas por el metabolismo del oxígeno (Help *et al.* 2005). También, se producen en situaciones de estrés, por ejemplo, en procesos de inflamación a causa de infecciones, ingesta de productos tóxicos o radiación y éstos pueden producir daños a células vecinas por la modificación en la estructura de macromoléculas como lípidos y ADN (Devlin 2006).

En el ensayo de las especies reactivas de oxígeno se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) para los tres compuestos evaluados. Idealmente, se hubiese esperado un incremento significativo en la producción de ROS entre los controles negativo y positivo. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los controles para ninguno de los tratamientos, lo cual pudo haber ocurrido debido a una incorrecta preparación del medio de cultivo con el TNF α , interacciones entre el TNF α y los compuestos o errores de pipeteo.

Se esperaba que los compuestos utilizados funcionaran como antioxidantes en la reducción de la generación de ROS. Sin embargo, los resultados fueron contrastantes porque hubo un incremento significativo ($P < 0.05$) en la producción de ROS para todos los tratamientos a partir de la primera concentración (0.62 mg/L). Marimoutou y colaboradores (2015) obtuvieron resultados contrastantes al utilizar tres extractos de plantas medicinales en células preadipocitos (3T3-L1) inflamadas, logrando disminuir la generación de ROS. Estas diferencias se pudieron dar debido a las variaciones entre los extractos utilizados.

Los tratamientos con ácido gálico (Figura 5) incrementaron de manera significativa la producción de ROS desde la concentración más baja (0.62 mg/L) en un 36% y obteniendo un incremento hasta de 62% en la concentración más alta (10 mg/L). El ácido gálico también incrementó significativamente ($P < 0.05$) la generación de ROS en células cancerígenas de pulmón (Calcu-6-cells) a concentraciones de 8.5 mg/L (You *et al.* 2011).

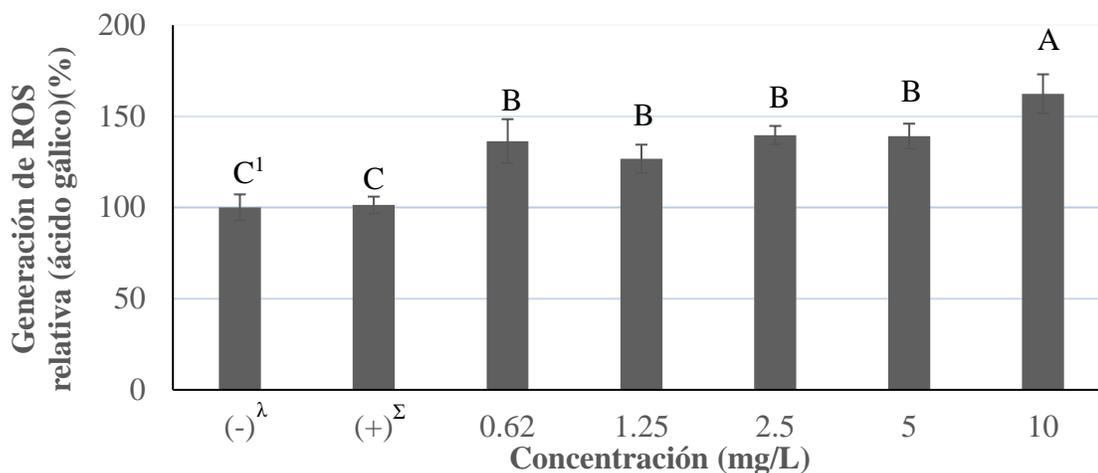


Figura 5. Generación de especies reactivas de oxígeno en presencia de ácido gálico en preadipocitos (3T3-L1).

^λ(-): Control negativo; células sin presencia de ácido gálico y en ausencia de inductor a inflamación TNF α . ^Σ(+): Control positivo; células inducidas a inflamación con TNF α (10 μ g/mL) en ausencia de ácido gálico. ¹Diferentes letras indican diferencias estadísticas entre tratamientos ($P < 0.05$).

El pirogalol (Figura 6) fue el compuesto que más provocó el incremento de la generación de ROS. La concentración más baja (0.62 mg/L) incrementó en un 72% la producción de ROS y a partir de las concentraciones de 2.5 mg/L incrementó en 100% o más. En células cancerígenas (HeLa) se determinó un incremento significativo ($P < 0.05$) con una

concentración de 2.54 mg/L (Han 2008). Sin embargo, al mismo tiempo el estudio anterior contrastó con los obtenidos en éste, debido a que también, determinaron que a concentraciones de 5 mg/L y hasta una concentración de 25.22 mg/L de pirogalol lograron disminuir significativamente la producción de ROS. Esto se pudo deber a las diferencias entre líneas celulares así como se mostraron en proliferación celular.

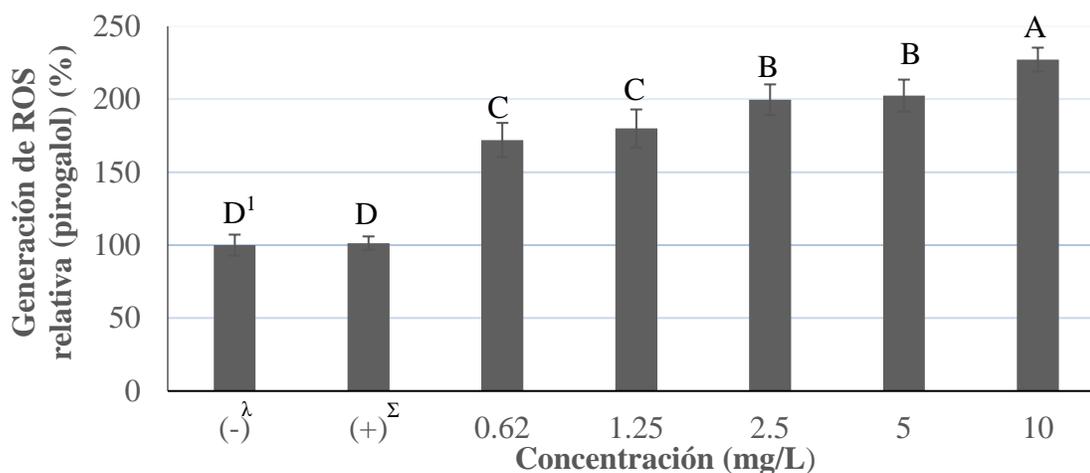


Figura 6. Generación de especies reactivas de oxígeno en presencia de pirogalol en preadipocitos (3T3-L1).

λ(-): Control negativo; células sin presencia de pirogalol y en ausencia de inductor a inflamación TNFα. Σ(+): Control positivo; células inducidas a inflamación con TNFα (10µg/mL) en ausencia de pirogalol. ¹ Diferentes letras indican diferencias estadísticas entre tratamientos (P<0.05).

Finalmente, el extracto de mango (Figura 7) fue el compuesto que menos incrementó la generación de ROS, la concentración más baja (0.62mg/L) incremento en un 12%, mientras que la más alta (10 mg/L) fue de 42%. Estos resultados concuerdan parcialmente en los obtenidos por Abdullah y colaboradores (2015), en los que se probó extracto de semillas de mango Kernel en células cancerígenas humanas (MDA-MB-231) ya que usando extracto de mango a una concentración de 10 mg/L logró aumentar significativamente (P<0.05) la producción de ROS en comparación con la concentración de 5 mg/L. Se mantuvo esta tendencia hasta 50 mg/L así como en los resultados de este estudio.

No obstante, otro estudio utilizando extracto de mango variedad Keitt en el que se usaron concentraciones de 2.5, 5 y 10 mg/L, no se encontraron diferencias significativas (P<0.05) en comparación con el control positivo (TNFα a 10 ng/mL) en células mamarias saludables (MCF-12A) (Arbizu 2013). Lo anterior se puede explicar debido a diferencias entre los procedimientos de extracción de mango dando como resultado diferencias en efecto a la generación de ROS.

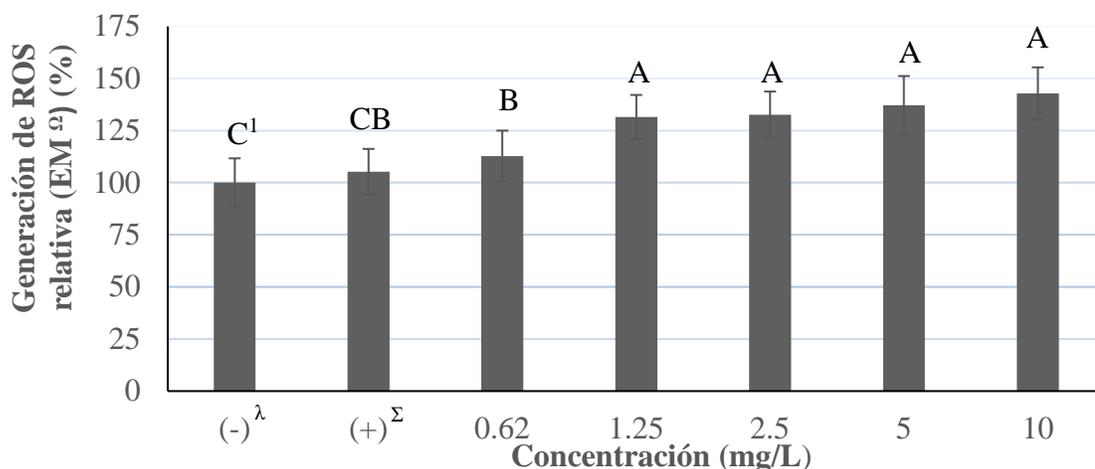


Figura 7. Generación de especies reactivas de oxígeno en presencia de extracto de mango en preadipocitos (3T3-L1).

^λ (-): Control negativo; células sin presencia de extracto de mango y en ausencia de inductor a inflamación TNF α . ^Σ (+): Control positivo; células inducidas a inflamación con TNF α (10 μ g/mL) en ausencia de extracto de mango. ^ΩEM: Extracto de mango. ¹ Diferentes letras indican diferencias estadísticas entre tratamientos (P<0.05).

En el ensayo de las especies reactivas de oxígeno se encontraron diferencias significativas (P<0.05) para los tres compuestos evaluados. Idealmente, se hubiese esperado un incremento significativo en la producción de ROS entre los controles negativo y positivo. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas (P>0.05) entre los controles para ninguno de los tratamientos, lo anterior pudo haber ocurrido debido a una incorrecta preparación del medio de cultivo con el TNF α , interacciones entre el TNF α y los compuestos o errores de pipeteo.

Se esperaba que los compuestos utilizados funcionaran como antioxidantes en la reducción de la generación de ROS. Sin embargo, los resultados fueron contrastantes porque hubo un incremento significativo (P<0.05) en la producción de ROS para todos los tratamientos a partir de la primera concentración (0.62 mg/L). Marimoutou y colaboradores (2015) obtuvieron resultados contrastantes al utilizar tres extractos de plantas medicinales en células preadipocitos (3T3-L1) inflamadas, logrando disminuir la generación de ROS. Estas diferencias se pudieron dar debido a las variaciones entre los extractos utilizados.

Adicionalmente, León (2014) demostró que en las células del miofibroblasto (CCD-18Co) que inflamó (TNF α a 10 ng/mL) lograron aumentar en un 60% la producción de ROS. También, usando extracto de camote morado y extracto de zanahoria disminuyó la generación de ROS hasta en un 50%. En el supuesto de haber incrementado de manera similar en generación de ROS a la de León (2014) para el ensayo de extracto de mango, es probable que se hubiese contemplado una disminución comparada al control positivo. Esto puede explicarse una vez más, por la variabilidad de mecanismos que existe entre células y a la composición de polifenoles en un determinado extracto. Además, los datos de proliferación celular y generación de ROS concuerdan con Fulda y colaboradores (2009) al establecer que la generación de ROS es inversa a la proliferación celular.

Extracción de ácido desoxirribonucleico (ARN), retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR). En la primera parte del ensayo se determinó la calidad y cantidad del ARN extraído. La cantidad de ARN utilizado para las mezclas no fue igual debido a las variaciones en concentración de ARN extraído. Esto pudo haberse debido a factores como pipeteo y tiempos de centrifugación. La calidad se determinó mediante la relación de absorbancia 260/280 en nanómetros. La anterior debería resultar por encima de 2.0 para considerarlo de alta calidad y siendo calidad la característica más importante (Rojas *et al.* 2011). En el proceso de extracción del ARN de las células, se obtuvo un ARN de alta calidad para todas las unidades experimentales y posteriormente, se realizaron las diluciones.

La transcripción celular es el proceso biológico que permite la expresión de las proteínas (expresión genética) a partir del ADN; éste se transcribe para formar mARN (ARN mensajero) que se traduce para formar proteínas (Lodish *et al.* 2005). En investigación molecular se utiliza la retrotranscripción que consisten en realizar una transcripción en reversa, es decir, formar ADN a partir de ARN (Walker y Rapley 2009). En este estudio se utilizó mARN para generar ADN que fue calificado y cuantificado por medio de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

La inflamación es una respuesta natural en el organismo que lo protege de infecciones o daños; además, ayuda a eliminar a los patógenos, promueve la reparación de tejidos y a fomentar la regulación de la homeostasis en los sitios infectados o dañados. Es caracterizado por el enrojecimiento, dolor y el incremento de comunicadores celulares químicos llamados citoquinas. Las anteriores son proteínas de bajo peso molecular que son producidas ante un estímulo y que posee un papel importante en la intercomunicación de las células para realizar funciones regulatorias en procesos de inflamación (Rivas 2009).

Cabe destacar que si la inflamación se vuelve prolongada, se pueden producir daños irreparables a los tejidos o desencadenar enfermedades crónicas como cáncer. Por esto, existe una autorregulación por medio de la liberación de compuestos antiinflamatorios (Calder *et al.* 2009; Arbizu 2013). Para la inflamación de las células se utilizó TNF α debido a que es considerado uno de los agentes inflamatorios de mayor potencia, lo que conlleva a la expresión de diferentes citoquinas relacionadas a la inflamación (Chen y Goeddel 2002).

El factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B) es una citoquina encargada de regular la expresión de otras citoquinas involucradas en la inflamación como interleucina 6 (IL-6) y TNF α (Lawrence 2009). Para el ensayo de NF- κ B (Figura 8) existieron diferencias estadísticas ($P < 0.05$) entre los controles en los cuales existió un incremento de 136% para el control positivo.

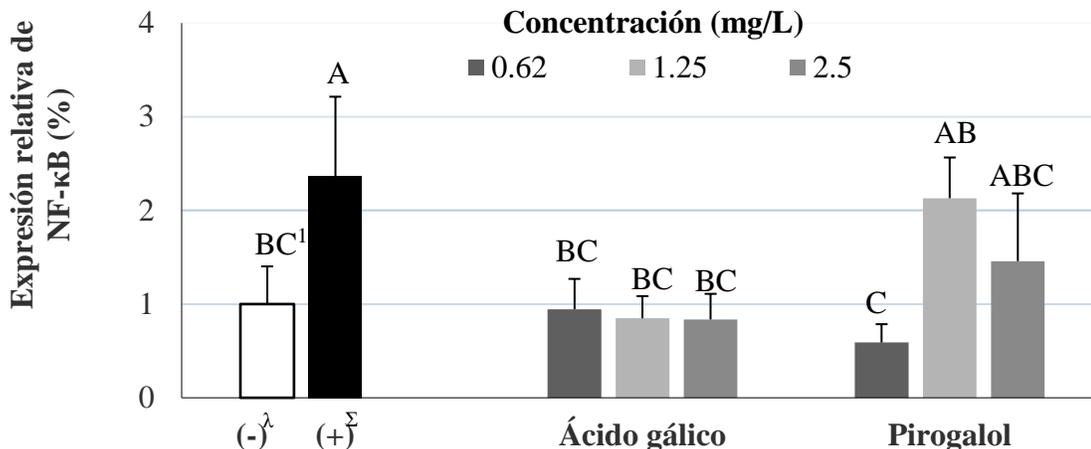


Figura 8. Efecto de los tratamientos en la expresión del primer NF-κB, en preadipocitos (3T3-L1).

^λ(-): Control negativo; células sin presencia de tratamientos y en ausencia de inductor a inflamación TNF α . ^Σ(+): Control positivo; células inducidas a inflamación con TNF α (10 μ g/mL) en ausencia de los tratamientos. ¹Diferentes letras indican diferencias estadísticas entre tratamientos (P<0.05).

Se observó actividad antiinflamatoria para todas las concentraciones usadas de ácido gálico. El pirogalol tuvo efecto similar a una concentración de 0.62 mg/L comparada contra el control positivo, por lo que la expresión de NF-κB sí fue inhibida. Estos resultados se asemejan a los obtenidos por Kim y colaboradores (2005) donde se utilizaron concentraciones de 1.71 mg/L de ácido gálico en células mastocitos reduciendo así la expresión genética de NF-κB comparada con el control positivo. Resultados similares se dieron en el ensayo de (León 2014) en la cual se usaron extractos de zanahoria y camote que mostraron tener la capacidad de reducir la expresión de NF-κB en células del miofibroblasto (CCD-18Co) inducidas y no inducidas a inflamación (TNF α 10 ng/ml).

Arbizu (2013) probó extracto de mango variedad Keitt a concentraciones de 5 y 10 mg/L, éstas redujeron la expresión de NF-κB en células mamarias saludables (MCF-12A) inducidas a inflamación con TNF α (10 ng/ml). Lo que indica que los polifenoles pueden funcionar como inhibidores de NF-κB en ciertos tipos de células. Sin embargo, existió un contraste para las concentraciones de 1.25 y 2.5 mg/L de pirogalol. Éstas no fueron capaces de reducir la expresión de NF-κB, debido a que fue estadísticamente igual (P<0.05) al control positivo. Forman y Cadenas (1997) establecieron que el pirogalol no es capaz de funcionar como inhibidor de esta citoquina y puede promover la expresión de NF-κB.

La proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) es un mensajero químico que induce la quimiotaxis de los macrófagos al área inflamada. Esto significa que promueve la migración e infiltración de macrófagos al área afectada (Arnaiz *et al.* 1995; Deshmane *et al.* 2009). En el ensayo realizado para la identificación de MCP-1 hubo diferencias significativas (P<0.05) en la expresión de MCP-1 (Figura 9). Sin embargo, no de la manera que se esperaba, ya que ambos compuestos no fueron capaces de reducir la expresión de MCP-1. La concentración que incrementó más la expresión genética fue pirogalol a 2.5 mg/L, incrementando la expresión de MCP-1 en un 300% comparada con el control negativo.

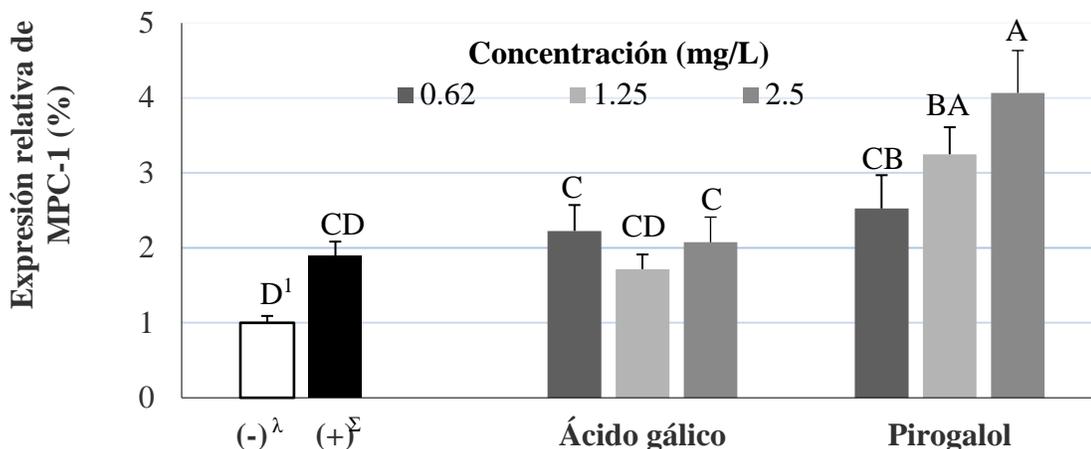


Figura 9. Efecto de los tratamientos en la expresión del primer MCP-1 en preadipocitos (3T3-L1).

^λ(-): Control negativo; células sin presencia de tratamientos y en ausencia de inductor a inflamación TNF α . ^Σ(+): Control positivo; células inducidas a inflamación con TNF α (10 μ g/mL) en ausencia de los tratamientos. ¹Diferentes letras indican diferencias estadísticas entre tratamientos (P<0.05).

Estos resultados contrastan con los que presentó Hidalgo y colaboradores (2012), en los cuales el ácido gálico redujo significativamente la expresión de MCP-1 en células somáticas humanas con concentraciones de 0.17, 1.70, 8.50 y 17.01 mg/L. Esto se puede explicar debido a las diferencias entre metabolismos que existen entre células. No obstante, para el caso de una infección no prolongada esto podría significar benéfico al cuerpo debido al efecto que tiene MCP-1 descrito anteriormente. Cabe destacar que no existió diferencia estadística para los controles positivos y negativos como se esperaba; es probable que se haya debido a factores como errores de pipeteo y diluciones. También, con un número mayor de repeticiones es probable que se hubiese alcanzado la diferencia estadística en comparación con el control negativo al reducir el error.

Las citoquinas como interleucina 6 (IL-6) e interleucina 1 β (IL-1 β) han sido relacionadas con la inflamación. La IL-1 β es inducida por otras citoquinas como TNF α e induce la destrucción de los tejidos y promueve los daños provocados por TNF α . La IL-6 es producida a altos niveles de IL-1 y TNF α . Ésta no causa daños al tejido a diferencia de IL-1 y TNF α , sus funciones son regular el crecimiento de los linfocitos B activados y diferenciar células progenitoras hematopoyéticas. Éstas son las células encargadas de producir glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas (Rugeles *et al.* 2009; INCUCAI).

La expresión genética de IL-1 β mostró diferencias significativas (P<0.05) (Figura 10) para las concentraciones de 1.25 y 2.5 mg/L de pirogalol ya que se incrementó en un 160 y 259%, respectivamente, en comparación con el control negativo. Sin embargo, no existieron diferencias estadísticas entre controles. Esto se puede explicar debido a que LPS tiene mayor capacidad que TNF α en inducir la producción IL-1 β (Rugeles *et al.* 2009). En el caso de existir inflamación en el control positivo, es probable que se hubiese encontrado reducción de la expresión de la citoquina IL-1 β para los tratamientos de ácido gálico, no obstante, no se puede apreciar la capacidad antiinflamatoria debido a la ausencia de

incremento en la expresión de IL-1 β en el control positivo. Un polifenol que es encontrado en té verde (epigallocatechin-3-gallate, EGCG) disminuyó significativamente la expresión de IL-1 β en condrocitos humanos (Ahmed *et al.* 2002). Estos resultados contrastantes se podrían explicar debido a las diferencias entre células y variaciones en la naturaleza de los polifenoles.

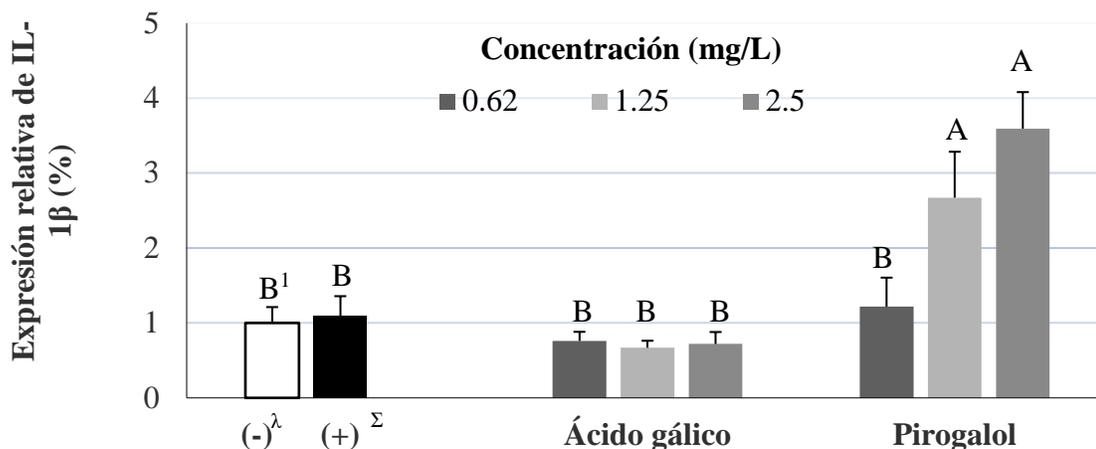


Figura 10. Efecto de los tratamientos en la expresión del primer IL-1 β en preadipocitos (3T3-L1).

^λ(-): Control negativo; células sin presencia de tratamientos y en ausencia de inductor a inflamación TNF α . ^Σ(+): Control positivo; células inducidas a inflamación con TNF α (10 μ g/mL) en ausencia de los tratamientos. ¹Diferentes letras indican diferencias estadísticas entre tratamientos (P<0.05).

Se determinaron diferencias significativas para la expresión de IL-6 (P<0.05) (Figura 11) entre los controles positivos y negativos. Además, se evidenció la actividad antiinflamatoria del ácido gálico al inhibir la expresión de IL-6 en concentraciones de 0.62 y 1.25 mg/L en comparación con el control positivo. Estos resultados se asemejan a los obtenidos por Kim y colaboradores (2005), en el cual se probó una concentración de 1.70 mg/L de ácido gálico en células mastocitos, logrando disminuir la expresión genética de IL-6 comparada con el control positivo. El pirogalol en todas sus concentraciones no fue capaz de evitar la producción de IL-6 inducida por TNF α , siendo estadísticamente igual al control positivo. Esto indica que los compuestos mostraron tener actividades antiinflamatorias específicas para diferentes marcadores moleculares, es decir, que los polifenoles no reducen por igual la expresión de diferentes marcadores de inflamación.

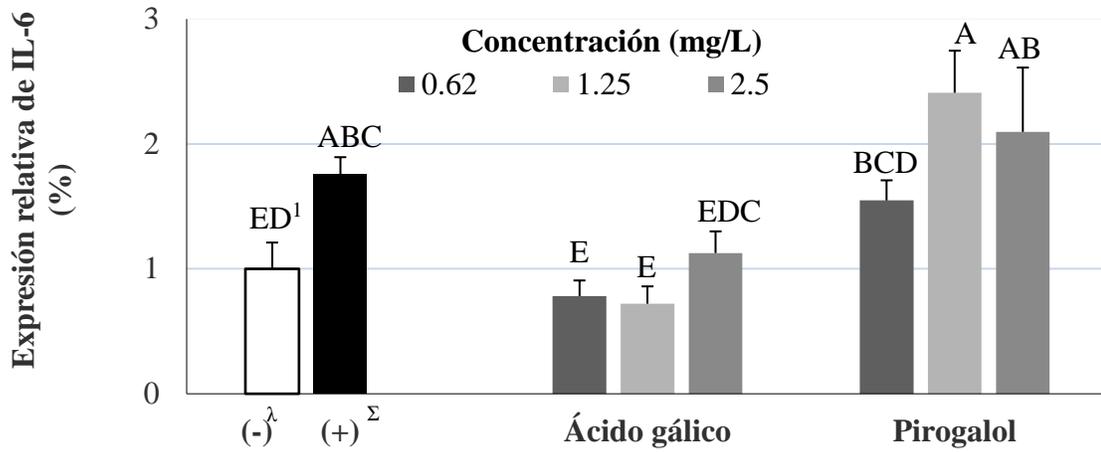


Figura 11. Efecto de los tratamientos en la expresión del primer IL-6 en preadipocitos (3T3-L1).

λ(-): Control negativo; células sin presencia de tratamientos y en ausencia de inductor a inflamación TNFα. Σ(+): Control positivo; células inducidas a inflamación con TNFα (10μg/mL) en ausencia de los tratamientos. ¹Diferentes letras indican diferencias estadísticas entre tratamientos (P<0.05).

4. CONCLUSIONES

- El ácido gálico disminuyó la proliferación en las células preadipocitos (3T3-L1) en el tratamiento más diluido (0.31 mg/L) mientras que el pirogalol y el extracto de mango necesitaron concentraciones de 0.62 mg/L o superiores.
- Ninguno de los compuestos utilizados fue capaz de reducir la generación de especies reactivas de oxígeno.
- El ácido gálico mostró actividades antiinflamatorias suprimiendo la expresión de NF- κ B e IL-6 mientras que el pirogalol inhibió la expresión genética de NF- κ B en comparación con las células inflamadas con TNF α (10 ng/mL).
- Ninguno de los polifenoles usados fue eficiente en la reducción de la expresión genética de MCP-1 ni IL-1 β .

5. RECOMENDACIONES

- Evaluar las especies reactivas de oxígeno en células utilizando otros inductores de inflamación como peróxido de hidrógeno o lipopolisacárido bacteriano.
- Utilizar concentraciones diferentes del agente inflamatorio.
- Determinar las proteínas marcadoras de inflamación por western blot.
- Evaluar el efecto de los polifenoles de mango en las propiedades biológicas utilizando ensayos *in vivo*.

6. LITERATURA CITADA

Abdullah A, Mohammed, Rasedee A, Mirghani M, Qubaisi A. 2015. Induction of apoptosis and oxidative stress in estrogen receptor-negative breast cancer, MDA-MB231 cells, by ethanolic mango seed extract. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 15:45.

Ahmed S, Rahman A, Hasnain A, Lalonde M, Goldberg VM, Haqqi TM. 2002. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits the IL-1 beta-induced activity and expression of cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase-2 in human chondrocytes. *Free Radical Biology and Medicine*. 33(8): 1097-1105.

Arbizu S. 2013. Anti-inflammatory and cytotoxic activities of mango (*Mangifera indica* L. var Keitt) polyphenols in cancer and non-cancer breast fibroblast in vitro [Tesis]. Universidad de Texas A&M-Texas. 144 p.

Arnaiz A, Regueiro J, López C. 1995. *Inmunología*. Madrid(España): Editorial Complutense; [consultado 2016 ago 25]. <https://books.google.hn/books?id=UHN9f8wiIKIC&pg=PA171&dq=quimiotaxis&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwi-uZbn09zOAhUGax4KHe7cBxgQ6AEIGjAA#v=onepage&q=quimiotaxis&f=false>.

Audesirk T, Audesirk G, Byers B. 2004. *Biology: Life on Earth*. 6ta ed. Pearson Education Inc. México. [consultado 2016 sep 02]. <https://books.google.hn/books?id=oMFPqbw7Dx4C&pg=PA181&dq=importancia+de+division+celular&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjTyMzA-e7OAhXGbiYKHVwnCqsQ6AEIGjAA#v=onepage&q=audesirk&f=false>.

Barnes R, Krenek K, Meibohm B, Mertens-Talcott S, Talcott S. 2015. 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: 542-550

Berardini N, Schieber A, Klaiber I, Beifuss U, Carle R, Conrad J. 2005. 7-O-methylcyanidin 3-O-β-D-galactopyranoside, a novel anthocyanin from mango (*Mangifera indica* L.) cv. 'Tommy Atkins' peels. *Chem Sci*. 60(7):801-4.

Betteridge D. 2000. What is oxidative stress?. *Metabolism*. 49:3-8.

Bravo L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition reviews*. Madrid(España): 56(11); 317-333.

Calder P, Albers R, Antoine J, Blum S, Bourdet-Sicard R, Ferns TG, Folkerts G, Friedmann P, Frost G, Guarner F, Lovik M, Macfarlane S, Meyer P, Rabet L, Serafini M, Eden W, Loo J, Dias W, Vidry S, Winklhofer-Roob B, Zhao J. 2009. Inflammatory Disease Processes and Interactions with Nutrition. *British Journal of Nutrition*. 101(1): 1-45.

Camps D, Ruffino S, Majul E, Joison A. 2010. *Bioquímica del estrés oxidativo y especies reactivas de oxígeno*. 1ra ed. Córdoba(Argentina): UCC. 72p.

Chávez K. 2015. Actividad antiinflamatoria de los coproductos del cacao (*Theobroma cacao*) en células humanas cancerígenas (HT-29) [Tesis]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano-San Antonio de oriente. 30p.

Chen G, Goeddel D. 2002. TNF-R1 signalling: a beautiful pathway. *Science Signaling* 296. 1634-163.

Chuang C, McIntosh M. 2011. Potential mechanisms by which polyphenol-rich grapes prevent obesity-mediated inflammation and metabolic diseases. *Annu Rev Nutr* 31: 155–176.

De la Cruz, J. y H.S. García. 2002. *Mango: Post-harvest Operations*. Instituto Tecnológico de Veracruz, FAO. 69p.

Deshmane S, Kremlev S, Amini S, Sawaya B. 2009. Monocyte chemoattract Protein-1 (MCP-1): An Overview. *J Interferon Cytokine*; 29(6): 313-326.

Devlin T. 2006. *Bioquímica, libro de texto con aplicaciones clínicas*. 4ta ed. Barcelona(España): Reverté S.A.; [consultado 2016 ago 13]. https://books.google.hn/books?id=p3DCb9ITLx8C&pg=PA591&dq=especies+reactivas+de+oxigeno&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjO_IPH577OAhVB6CYKHUBID6oQ6AEIHTAA#v=onepage&q=especies%20reactivas%20de%20oxigeno&f=false.

Forman H, Cadenas E. 1997. *Oxidative Stress and Signal Transduction*. 1era Ed. Springer Science+Business Media, B V. [consultado 2016 Sep 05]. 19p. <https://books.google.hn/books?id=NFXxBwAAQBAJ&pg=PA19&dq=pyrogallol+NFKb&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwj4jp3RpvjOAhWJYyYKHVsbAWsQ6AEILTAB#v=onepage&q=pyrogallol%20NFKb&f=false>.

Fulda S, Gorman A, Hori O, Samal A. 2009. Cellular Stress Responses: Cell Survival and Cell Death. *International Journal of Cell Biology*. vol 2010. 23 p.

Han Y, Kim S, Kim S, Park W. 2008. Pyrogallol as a glutathione depletor induces apoptosis in HeLa cells. *International journal of molecular medicine*. 21: 721-730.

Han Y, Park W. 2010. Pyrogallol-induced calf pulmonary arterial endothelial cell death via caspase-dependent apoptosis and GSH depletion. *Food and Chemical Toxicology* 48: 558–563.

Help P. 2015. An introduction to reactive oxygen species. Biotek instruments, Inc. White paper [consultado 2016 sep 02]. <http://www.biotek.com/resources/articles/reactive-oxygen-species.html>

Hidalgo M, Martin-Santamaria S, Recio I, Sanchez-Moreno C, Pascual-Teresa B, Rimbach G, Pascual-Teresa S. 2012. Potential anti-inflammatory, anti-adhesive, anti/estrogenic, and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities of anthocyanins and their gut metabolites. *Genes Nutr.* 7:295–306.

Hostis N, Rosen E, Lander E. 2006. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature (Lond).* 440: 944-8.

Hsu C, Huang S, Yeng G, 2006. Inhibitory effects of Phenolic Acids on the Proliferation of 3T3-L1 Preadipocytes in Relation to Their Antioxidant Activity. *J. Agric. Food Chem.* 54(12): 4191–4197.

Instituto Nacional Central Único Coordinador de Ablación e Implante. ¿Qué son las células hematopoyéticas. Buenos Aires(Argentina): INCUCAI; [consultado 2016 ago 25]. <http://www.incucai.gov.ar/index.php/component/content/article/20-institucional/lineas-de-accion/66-registro-nacional-de-donantes-de-cph#preguntas-frecuentes>.

Karamac M, Kosinska A, Pegg R. 2006. Content of gallic acid in selected plant extracts. *Pol J Food Nutr Sci.* 15/16(1): 55-58.

Kim S, Han Y, Lee S, Jeong H, Kim SH, Kim I, Lee S, Kim D, Kim SH, Kim SZ, Park W. 2008. A Superoxide Anion Generator, Pyrogallol, Inhibits the Growth of HeLa Cells Via Cell Cycle Arrest and Apoptosis. *Molecular Carcinogenesis* 47:114–125.

Kim S, Jun c, Suk K, Choi B, Lim G, Park S, Lee S, Kim H, Shink T. 2005. Gallic acid inhibits histamine release and pro-inflammatory cytokine production in mast cells toxicological sciences. 91(1): 123–131.

Krenek K, Barnes R, Tacott S. 2014. Phytochemical composition and effects of commercial enzymes on the hydrolysis of gallic acid glycosides in mango (*Manguiфера indica* cv. Keitt) pulp. [Tesis]. Universidad de Texas A&M-Texas. 7 p.

Kulkarni U. 2005. We are what we eat. San bum publishers. New Delhi(India). [consultado 2016 sep 01]. https://books.google.hn/books?id=XKfcFwrzbzJQC&pg=PA182&dq=mango+king+of+fruits&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjF3t6pze_OAhXEQiYKHQRuAvUQ6AEIIDAB#v=onepage&q=mango%20king%20of%20fruits&f=false.

Lacadena J. 1996. Citogenética. 1ra ed. Madrid(España): Editorial Complutense; [consultado 2016 ago 20]. https://books.google.hn/books?id=VcmrQY8FdksC&pg=PA145&dq=division+celular&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=division%20celular&f=false.

Lawrence T. 2009. The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation. Cold Spring Harb Perspect Biol. 1(6).

León M. 2014. Actividades antiinflamatorias del camote morado (*Ipomea batatas*) y zanahoria negra (*Daucus carota* spp. *sativus*) en las células intestinales del mifibroblasto (CCD-18Co) [Tesis]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano-San Antonio de oriente. 30p.

Lima V, Oliveira C, Santos E, Morais L, Tintino S, Freitas T, Geraldo Y, Pereira R, Cruz R, Menezes I, Coutinho H. 2016. Antimicrobial and enhancement of the antibiotic activity by phenolic compounds: Gallic acid, caffeic acid and pyrogallol [Tesis]. Universidad Regional de Cariri-Cariri. 9 p.

Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser C, Krieger M, Scott M, Zipursky A, Darnell J. 2005. Biología celular y molecular. 5ta ed. Buenos Aires(Argentina): Editorial médica panamericana; [consultado 2016 ago 23]. <https://books.google.hn/books?id=YdyMSxY2LjMC&pg=PA115&dq=transcripci%C3%B3n+celular&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwir4f3f8NjOAhXCNSYKHVaVCvMQ6AEIGjAA#v=onepage&q=transcripci%C3%B3n%20celular&f=false>.

Lu Y, Jiang F, Jiang H, Wu K, Zheng X, Cai Y, Katakowski M, Choppb M, Shun S, To T. Gallic acid suppresses cell viability, proliferation, invasion and angiogenesis in human glioma cells. European Journal of Pharmacology. 641: 102-107.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jiménez L. 2003. Polyphenols: food sources and bioavailability. American Society for Clinical Nutrition. 79: 729-747.

Marimoutou M, Sage L, Smadja J, Lefebvre C, Gonthier, Da Silva R. 2015. Antioxidant polyphenol-rich extracts from the medicinal plants *Antirhea borbonica*, *Doratoxylon apetalum* and *Gouania mauritiana* protect 3T3-L1 preadipocytes against H₂O₂, TNF α and LPS inflammatory mediators by regulating the expression of superoxide dismutase and NF- κ B genes. Journal of inflammation. Biomed. 15p.

Middleton E Jr, Kandaswami C & Theoharides TC. 2000 The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. Pharmacol Rev. 52: 673–751.

Miyazaki K, Arai S, Iwamoto T, Takasaki M, Tomoda A. 2004. Metabolism of pyrogallol to purpurogallin by human erythrocytic hemoglobin. J Exp. Med. 203(4): 319-330.

Noratto G, Bertoldi M, krenek K, Talcott S, Stringheta P, Mertens-talcott S. 2010. Anticarcinogenic Effects of Polyphenolics from Mango (*Mangifera indica*) Varieties. J. Agric. Food Chem. 58 (7): 4104–4112.

OMS (Organización Mundial para la Salud). 2013. Enfermedades crónicas. [consultado 2016 feb 22]. http://www.who.int/topics/chronic_diseases/es/.

OMS (Organización Mundial para la Salud). 2014. 10 datos sobre la obesidad. [consultado 2016 feb 22]. <http://www.who.int/features/factfiles/obesity/es/>.

Park W, Chang M, Kim H, Choi H, Yang W, Kim D, Park E, Park S. 2007. Cytotoxic effect of gallic acid on testicular cell lines with increasing H₂O₂ level in GC-1 spg cells. *Toxicology in Vitro*. 22: 159–163.

Prakash O, Khan R. 2005. A tryst with mango. Instituto Central subtropical para la horticultura. Nueva Delhi(India). [consultado 2016 sep 01]. https://books.google.hn/books?id=UAc_Pp6ahK8C&pg=PA173&dq=more+than+1000+variety+of+mango&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjn9fKa0e_OAhXKdSYKHcFVDI8Q6AEIGjAA#v=onepage&q=more%20than%201000%20variety%20of%20mango&f=false.

Quiñones M, Miguel M, Aleixandre A. 2011. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr Hosp*. 27(1): 76-89.

Repetto G, Repetto M. 2009. Toxicología fundamental. 4ta ed. Sevilla(España): Díaz de Santos; [consultado 2016 ago 12]. <https://books.google.hn/books?id=WheuVgivN6wC&pg=PA34&dq=dosis+letal+50&hl=es419&sa=X&ved=0ahUKEwiNmc217rzOAhXF5iYKHTO6C8UQ6AEIHAB#v=onepage&q=dosis%20letal%2050&f=false>.

Reyes, N. 2010. Tecnología para aprovechamiento y conservación del mango Tommy Atkins. [consultado 2016 feb 22]. http://www.fomixcampeche.gob.mx/documentos/articulos_04/focare_04_viento_mango.pdf.

Rivas V. 2009. Respuesta celular cutánea y producción de citoquinas como factores determinantes de protección en la infestación por *Hypoderma* sp. [Tesis]. Universidad de Santiago de Compostela-Santiago de Compostela. 211p.

Roche Diagnostics GmbH. 2008. Apoptosis, Citotoxicity and Cell Proliferation. 4ta ed. Mannheim(Alemania): Lifescience; [consultado 2016 ago 12]. https://lifescience.roche.com/wcsstore/RASCatalogAssetStore/Articles/05242134001_05.08.pdf.

Rojas L, Portal O, Jiménez E. 2011. Extracción de ARN total en plantas y hongos filamentosos. *Biotecnología ambiental*. 11(4): 213-222.

Rugeles M, Patiño P, Montoya C. 2009. Inmunología, una ciencia activa. 2da ed. Medellín(Colombia): Universidad de Antioquia; [consultado 2016 ago 25]. <https://books.google.hn/books?id=2yIZdSTdjKcC&pg=PA349&dq=interleucina+6&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwui5LaT6NzOAhXBqR4KHd9EB8AQ6AEIzAA#v=onepage&q=interleucina%206&f=false>.

Venereo J. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cubana Med Milit*. 31(2): 126-133.

Walker J, Rapley R. 2009. *Molecular Biology and Biotechnology*. 5ta ed. Hatfield(Reino Unido): Universidad de Hertfordshire; [consultado 2016 ago 23]. https://books.google.hn/books?id=KRU_fy3J8u4C&pg=PA126&dq=reverse+transcriptase+pcr&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjihZOj39jOAhUEYiYKHf9xAlgQ6AEIGjAA#v=onepage&q=reverse%20transcriptase%20pcr&f=false.

You B, Kim S, Kim SH, Park W. 2011. Gallic acid induced lung cancer cell death is accompanied by ROS increase and glutathione depletion. *Mol Cell Biochem*. 357 :295–303.

7. ANEXOS

Anexo 1. Abreviaturas.

1. EM: Extracto de mango.
2. FBS: Suero bovino fetal.
3. HPLC: Cromatografía líquida de alta eficiencia.
4. IL-1 β : Interleucina 1 beta.
5. IL-6: Interleucina.
6. LPS: Lipopolisacárido bacteriano.
7. mARN: Ácido ribonucleico mensajero.
8. NF- κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de células B.
9. PBS: Buffer fosfato salino.
10. ROS: Especies reactivas de oxígeno.
11. RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.
12. TNF α : Factor de necrosis tumoral.
13. β -actin: Beta actina.
14. RPM: Revoluciones por minuto.

Anexo 2. Ejemplos de cálculos de preparación de tratamientos

La concentración de ácido gálico y pirogalol fue 6,000 mg/L:

$$40 \text{ mg/L} = 6,000 \text{ mg/L} \times X \text{ } \mu\text{L} = 40 \text{ mg/L} \times 10,000 \text{ } \mu\text{L}$$

$$10 \text{ mg/L} = 6,000 \text{ mg/L} \times X \text{ } \mu\text{L} = 10 \text{ mg/L} \times 5,000 \text{ } \mu\text{L}$$

La concentración del extracto de mango fue 5,000 mg/L

$$40 \text{ mg/L} = 5,000 \text{ mg/L} \times X \text{ } \mu\text{L} = 40 \text{ mg/L} \times 10,000 \text{ } \mu\text{L}$$

$$10 \text{ mg/L} = 5,000 \text{ mg/L} \times X \text{ } \mu\text{L} = 10 \text{ mg/L} \times 5,000 \text{ } \mu\text{L}$$

Anexo 3. Ejemplo de cálculo para las concentraciones celulares.

Conteo obtenido y promedio:

1. 220,000 células por mililitro.
2. 160,000 células por mililitro.

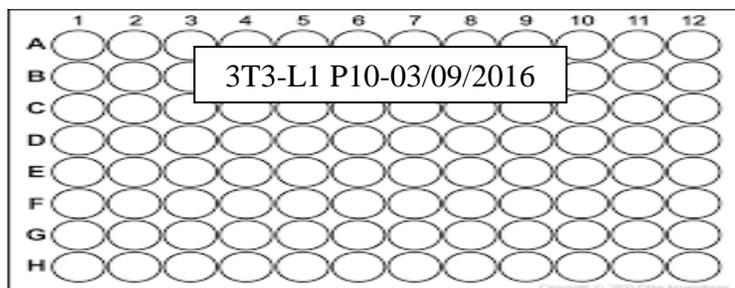
$$(220,000 + 160,000) / 2 = 180,000 \text{ células por mililitro.}$$

$$60,000 \text{ células/mL} \times 15,000 \text{ } \mu\text{L} = 180,000 \text{ células/mL} \times X \text{ } \mu\text{L}$$

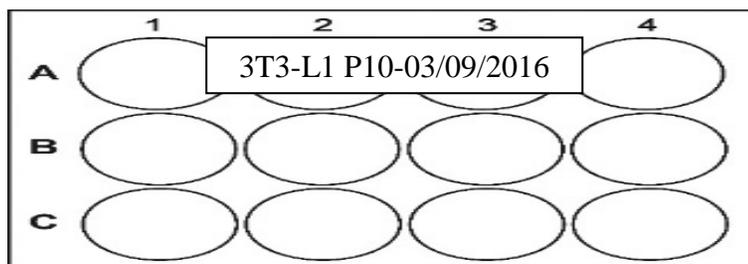
5 mL de suspensión celular + 10 mL de medio de cultivo

Anexo 3. Platos y ejemplo de etiquetado para los ensayos celulares.

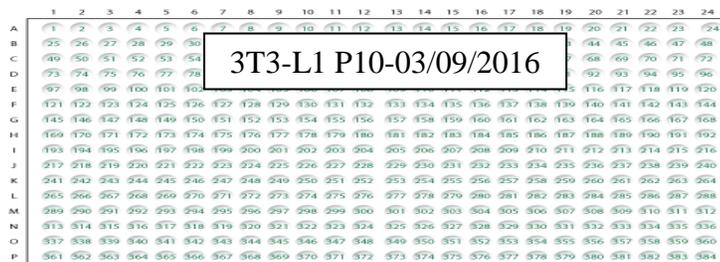
1. Proliferación celular y especies reactivas de oxígeno.



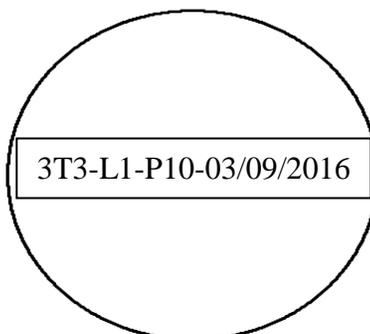
2. Extracción de ARN.



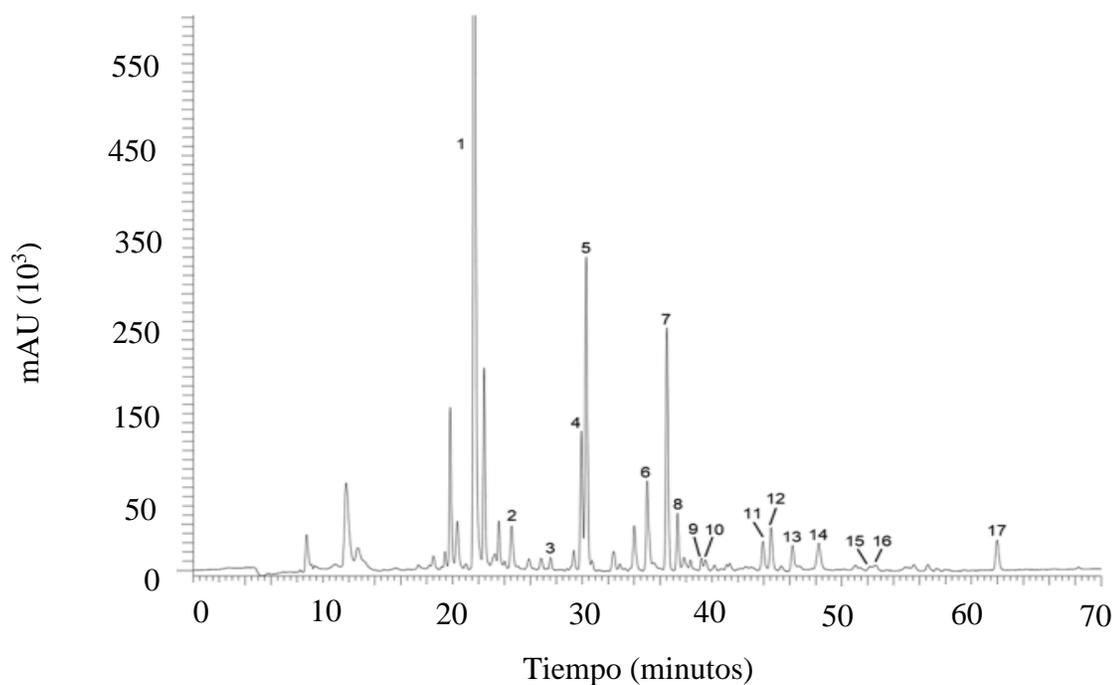
3. Reacción en cadena de la polimerasa.



4. Plato Petri.



Anexo 4. Cromatograma y tabla descriptiva de compuestos presentes en la pulpa de mango variedad Keitt con HPLC a 280 nm (Krenek *et al.* 2014).



Pico	RT ^λ (min)	Compuesto	Concentración (mg/kg)
1	21.67	Éster glucogalina	37.67 ± 0.56
2	24.55	Ácido gálico	1.74 ± 0.10
3	27.55	Diglucoalina	0.45 ± 0.01
4	29.93	Éter glucogalina	3.82 ± 0.13
5	30.30	p-ácido hidroxibenzoico glucósido	18.49 ± 0.72
6	35.00	Ácido cumárico glucósido	1.61 ± 0.05
7	63.52	ácido dihidroxifaseico glucósido	2.60 ± 0.04
8	37.35	Ácido ferúlico hexósido	0.91 ± 0.02
9	41.17	Ácido sinápico hexósido-pentósido	0.13 ± 0.01
10	41.42	Ácido sinápico hexósido	0.164 ± 0.01
11	43.93	ácido dihidroxifaseico glucósido	0.47 ± 0.03
12	44.55	hidroxi-dimentil ácido decadienoico glucopiranosil éster	1.78 ± 0.09
13	46.22	hidroxi-dimentil ácido decadienoico glucopiranosil éster	1.25 ± 0.13
14	48.23	Ácido Abcísico glucósido	0.57 ± 0.52
15	52.02	Eriodictiol-O-dihexósido	T ^Ω
16	52.62	Eriodictiol-O-hexósido	T
17	61.98	Ácido Abcísico	0.55 ± 0.04

^λTR: Tiempo de retención del compuesto a través de la columna en el HPLC. ^ΩT: Trazas.

Anexo 5. Ejemplo de cuantificación, calificación y dilución de ARN extraído de células preadipocitos (3T3-L1).

Muestra	Concentración (ng/μL)	Calidad (260/280)	ARN (μL)	Agua (μL)	Master mix (μL)
CN ^{λ} -1	228.41	2.07	5.19	6.81	3
CN-2	183.37	2.08	6.46	5.54	3
CN-3	119.52	2.10	9.91	2.09	3
CP ^{Ω} -1	202.07	2.09	5.86	6.14	3
CP-2	209.20	2.07	5.66	6.34	3
CP-3	123.34	2.09	9.60	2.40	3
AG ^{Σ} 0.6-1	164.70	2.08	7.19	4.81	3
AG 0.6-2	146.64	2.08	8.08	3.92	3
AG0.6-3	117.45	2.11	10.09	1.91	3
AG 1.25-1	214.55	2.09	5.52	6.48	3
AG 1.25-2	152.07	2.09	7.79	4.21	3
AG.25-3	129.20	2.07	9.17	2.83	3
AG 2.5-1	228.42	2.09	5.19	6.81	3
AG 2.5-2	225.62	2.08	5.25	6.75	3
AG 2.5-3	98.71	2.12	12.00	0.00	3
P ^{κ} 0.6-1	221.28	2.07	5.35	6.65	3
P 0.6-2	179.57	2.09	6.60	5.40	3
P 0.6-3	159.52	2.09	7.43	4.57	3
P 1.25-1	175.29	2.09	6.76	5.24	3
P 1.25-2	169.50	2.11	6.99	5.01	3
P 1.25-3	256.34	2.08	4.62	7.38	3
P 2.5-1	177.61	2.11	6.67	5.33	3
P 2.5-2	158.45	2.10	7.48	4.52	3
P 2.5-3	134.67	2.08	8.80	3.20	3

^{λ} CN: Control negativo, células sin inductor a inflamación TNF α . ^{Ω} PC: Control positivo, células con inductor a inflamación TNF α (10 μ g/ml). ^{Σ} AG: Tratamiento ácido gálico. ^{κ} P: Tratamiento pirogalol.

Anexo 6. Continuación de cuantificación, calificación y dilución de ARN extraído de células preadipocitos (3T3-L1).

Muestra	Concentración (ng/μL)	Calidad (260/280)	ARN (μL)	Agua (μL)	Master mix (μL)
CN ^λ -4	180.42	2.03	4.89	7.11	3
CN-5	175.36	2.05	5.03	6.97	3
CN-6	147.67	2.05	5.98	6.02	3
CP-4	156.74	2.06	5.63	6.37	3
CP-5	164.29	2.05	5.37	6.63	3
CP-6	178.98	2.06	4.93	7.07	3
GA-0.6 -4	150.89	2.06	5.85	6.15	3
GA-0.6 -5	159.55	2.06	5.53	6.47	3
GA-0.6 -6	176.68	2.06	5.00	7.00	3
GA-1.25 -4	130.70	2.06	6.75	5.25	3
GA-1.25 -5	135.97	2.07	6.49	5.51	3
GA-1.25 -6	99.19	2.06	8.90	3.10	3
GA-2.5-4	171.52	2.04	5.15	6.85	3
GA-2.5-5	150.35	2.07	5.87	6.13	3
GA-2.5-6	112.07	2.08	7.88	4.12	3
P-0.6-4	161.41	2.06	5.47	6.53	3
P-0.6-5	79.90	2.11	11.05	0.95	3
P-0.6-6	90.43	2.10	9.76	2.24	3
P-1.25-4	116.45	2.03	7.58	4.42	3
P-1.25-5	99.00	2.08	8.92	3.08	3
P-1.25-6	82.07	2.05	10.76	1.24	3
P-2.5-4	88.51	2.07	9.97	2.03	3
P-2.5-5	105.51	2.06	8.37	3.63	3
P-2.5-6	73.56	2.00	12.00	0.00	3

^λ CN: Control negativo, células sin inductor a inflamación TNF α . ^Ω PC: Control positivo, células con inductor a inflamación TNF α (10 μ g/ml). ^Σ AG: Tratamiento ácido gálico. ^κ P: Tratamiento pirogalol.

Anexo 7. Información estadística de la proliferación celular.

Compuesto	Parámetro			
	PR>F	R-Cuadrado	Valor F	CV ^Σ
Ácido gálico	<.0001	0.73	8.77	54.04
Pirogalol	<.0001	0.78	11.85	49.89
Extracto de mango	<.0001	0.84	17.71	31.71

^Σ CV: Coeficiente de variación.

Anexo 8. Información estadística de la producción de especies reactivas de oxígeno.

Compuesto	Parámetro			
	PR>F	R-Cuadrado	Valor F	CV ^Σ
Ácido gálico	<.0001	0.62	8.32	21.72
Pirogalol	<.0001	0.83	22.86	17.13
Extracto de mango	<.0001	0.92	54.67	13.94

^Σ CV: Coeficiente de variación.

Anexo 9. Información estadística de los marcadores de inflamación.

Marcador de inflamación	Parámetro			
	PR>F	R-Cuadrado	Valor F	CV ^Σ
NF-κB	0.021	0.45	2.41	84.51
MCP-1	<.0001	0.58	5.36	42.82
IL-1β	<.0001	0.58	5.40	71.51
IL-16	<.0001	0.57	5.13	50.39

^Σ CV: Coeficiente de variación.