

Actividades antiinflamatorias del camote morado (*Ipomea batatas*) y zanahoria negra (*Daucus carota ssp. sativus*) en las células intestinales del miofibroblasto (CCD-18Co)

Milenka Michelle León García

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras
Octubre, 2014

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Actividades antiinflamatorias del camote morado (*Ipomea batatas*) y zanahoria negra (*Daucus carota ssp. sativus*) en las células intestinales del miofibroblasto (CCD-18Co)

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

Presentado por

Milenka Michelle León García

Zamorano, Honduras

Octubre, 2014

Actividades antiinflamatorias del camote morado (*Ipomea batatas*) y zanahoria negra (*Daucus carota ssp. sativus*) en las células intestinales del miofibroblasto (CCD-18Co)

Presentado por:

Milenka Michelle León García

Aprobado por:

Jorge Cardona, Ph.D.
Asesor Principal

Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Director
Departamento de Agroindustria
Alimentaria

Juan Ruano Ortiz, D.Sc.
Asesor

Raúl H. Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

Actividades antiinflamatorias del camote morado (*Ipomea batatas*) y zanahoria negra (*Daucus carota ssp. sativus*) en las células intestinales del miofibroblasto (CCD-18Co)

León García Milenka Michelle

Resumen: El consumo diario de frutas y vegetales se ha convertido en un componente importante de nuestra alimentación. El consumo de los mismos en cantidades suficientes y de manera equilibrada ayuda a evitar diversas enfermedades como diabetes, cardiopatías, cáncer, así como deficiencias en micronutrientes. El objetivo de este estudio fue determinar la actividad antiinflamatoria que poseen los extractos de camote morado, zanahoria negra en células del miofibroblasto intestinal (CCD-18Co). Se usó un diseño experimental de bloques completos al azar con arreglo factorial. Los tratamientos fueron cuatro extractos (camote morado, zanahoria negra y sus extractos hidrolizados) y tres concentraciones (10, 25 y 50 µg/ml). Se evaluó proliferación celular, especies reactivas a oxígeno y expresión de diversos genes relacionados a inflamación. El crecimiento celular no fue afectado por la presencia de extractos lo que indica que los extractos son específicos al ataque de inflamación y no al desarrollo normal de las células. Se determinó el efecto de reducción de la expresión de genes relacionados con inflamación a la misma concentración (25 µg/ml) en el cual todos los extractos mostraron reducción en los genes TNF- α , NF- κ B, IL-6 y IL-1 β . Para especies reactivas a oxígeno (ROS), todos los extractos redujeron la generación de ROS, la mayor reducción se encontró en extractos hidrolizados de zanahoria negra a concentraciones 25 µg/ml y en extractos hidrolizados de camote morado fue independiente para todos los extractos hidrolizados. Este estudio demostró la capacidad antiinflamatoria del camote morado y zanahoria negra como potenciales agentes en la prevención de enfermedades crónicas como diabetes y cáncer.

Palabras clave: Antocianinas, expresión de genes, inflamación.

Abstract: Daily consumption of fruits and vegetables has become an important component of our diet. The consumption of these products in sufficient and balanced quantities helps prevent various diseases such as diabetes, heart disease, cancer, as well as deficiencies in micronutrients. The objective of this study was to determine the anti-inflammatory activity of purple sweet potato, black carrot and their hydrolyzed extracts in intestinal myofibroblast cells (CCD-18Co). A complete randomized block design with factorial arrangement was used. Treatments were four extracts (purple sweet potato, black carrot and hydrolyzed extracts) at three concentrations (10, 25 y 50 µg/ml). Cell proliferation, reactive oxygen species assays and gene expression related to inflammation were evaluated. The extracts did not affect the behavior of the cells showing that the extracts were specific reducing inflammation with no toxicity against normal cells. Inhibition of gene expression was evaluated with extracts (25 µg/ml) were all the extracts showed a reduction on TNF- α , NF- κ B, IL-6 and IL-1 β gene expression. For Reactive Oxygen of Species (ROS) all the extracts reduced the generation of ROS, the higher reduction was found in the hydrolyzed extract from black carrot at concentration of 25 µg/ml and for hydrolyzed extract for purple sweet potato was independent to the concentrations used. This study demonstrated the anti-inflammatory activity of purple

sweet potato and black carrot as potential relevance to the prevention chronic diseases such as diabetes and cancer.

Keywords: Anthocyanins, gene expression, inflammation.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	v
Índice de cuadros, figuras y anexos.....	vi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	10
4. CONCLUSIONES.....	20
5. RECOMENDACIONES.....	21
6. LITERATURA CITADA	22
7. ANEXOS	25

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Diseño experimental para proliferación celular	3
2. Diseño experimental para la extracción de ARN y especies reactivas a oxígeno ROS.	4

Figuras	Página
1. Cromatograma de separación de antocianinas de extracto de zanahoria negra analizada en el HPLC (520 nm).	11
2. Cromatograma de separación de antocianinas de extracto de camote morado analizado en HPLC (520 nm) (Cipriano <i>et al.</i> 2014 por publicar).	11
3. Proliferación celular de células CCD-18Co células del miofibroblasto en presencia de extractos de camote morado, zanahoria negra y extractos hidrolizado.	13
4. Generación de especies reactivas a oxígeno (ROS) en células del miofibroblasto CCD-18Co, tratadas con extracto de camote morado y camote morado hidrolizado.	14
5. Generación de especies reactivas a oxígeno (ROS) en células del miofibroblasto CCD-18Co, tratadas con extracto de zanahoria y zanahoria negra hidrolizada.	14
6. Efecto de diferentes tratamientos en células del miofibroblasto CCD-18Co. En la expresión del primer NF- κ B.	17
7. Efecto de diferentes tratamientos en células del miofibroblasto CCD-18Co. En la expresión del primer 1L-1 β	18
8. Efecto de diferentes tratamientos en células del miofibroblasto CCD-18Co. En la expresión del primer IL-6.	18
9. Efecto de diferentes tratamientos en células del miofibroblasto CCD-18Co. En la expresión del primer TNF- α	19

Anexos	Página
1. Abreviaturas.	26
2. Etiquetado de los platos utilizados en los ensayos realizados.	27
3. Ejemplo de cálculos para los tres ensayos realizados.	28
4. Cálculo de la dilución de los extractos.	28
5. Cálculo para inducción de inflamación (TNF- α + extracto + medio)	28
6. Ejemplos de ensayos realizados.	29
7. Mezcla maestra I y II para cADN.	29
8. Composición de los primers o cebadores utilizados en el ensayo de PCR.	30
9. Mezcla realizada para PCR.	30
10. Cuadros ANDEVA de los ensayos realizados.	30
11. Secuencias de primers o cebadores.	31
12. Ácidos orgánicos y alifáticos.	31
13. Esqueleto de los flavonoides.	32
14. Antocianidinas aciladas en extractos de zanahoria negra y camote morado.	33

1. INTRODUCCIÓN

Las antocianinas constituyen el grupo más grande de pigmentos naturales solubles en agua provenientes de frutas y verduras (He y Giusti 2010) y existen más de 635 antocianinas identificadas (Andersen y Jordheim 2008). Antocianinas pertenecen al grupo de flavonoides presente en frutas y verduras que se encuentran entre color rojo y púrpura en color y se ha demostrado que tienen propiedades anti-inflamatorias (Kano *et al.* 2005). La evidencia sugiere que la absorción de antocianinas se produce en el estómago y el intestino delgado, donde la absorción de tejido epitelial parece ser eficiente, sin embargo, el transporte en circulación, distribución en el tejido y la excreción son muy limitados (He y Giusti 2010).

El camote morado (*Ipomea batatas*) se cultiva en los trópicos en las zonas templadas, cálidas del mundo, sus raíces proporcionan energía a partir del almidón, así como vitaminas y minerales esenciales (Villanueva 1977). El color de la piel del camote morado varía de blanco, marrón, púrpura hasta rojo (Padmaja 2009). El camote morado es especialmente rico en antocianinas (Lu *et al.* 2010). En general, las antocianinas han demostrado tener muchos beneficios para la salud que incluyen, actividades anti-inflamatorias y antioxidantes así como la prevención de cáncer cito tóxico, y otros efectos beneficiosos *in vitro*, en modelos animales y estudios clínicos humanos (Dillard y German 2000). Las propiedades cito-tóxicas de las antocianinas en células cancerígenas pueden estar asociadas a sus potentes propiedades antioxidantes (Lim 2012). El camote morado contiene cianidina y peonidina, dos antocianinas que se encuentran unidas a diferentes acilaciones y glicosilaciones principalmente soforosa y glucosa, estas antocianinas tienen propiedades anti-inflamatorias y antioxidantes (He y Giusti 2010). Además, estas raíces son consideradas altamente funcionales por su bajo contenido energético, con las potenciales actividades anti-inflamatorias y anti-diabéticas (Kusano y Abe 2000). Algunos de los beneficios para la salud incluyen la estabilización de la glucosa en sangre y disminución de la resistencia a la insulina (Ylonen *et al.* 2003).

La zanahoria (*Daucus carota*) es uno de los cultivos de raíces más importantes cultivadas en todo el mundo (Kotecha *et al.* 1998). La variedad de zanahorias Negras (*Daucus carota* ssp. *sativus*) es originaria de Turquía, Oriente Medio y Extremo Oriente (Kammerer *et al.* 2003). Estas zanahorias son valoradas como un principal componente en la alimentación diaria sobre todo porque es una fuente rica en beta caroteno, hidratos de carbono y minerales como el calcio, fósforo, hierro y magnesio (Kammerer *et al.* 2004). Además, las zanahorias negras también contienen antocianinas (Kotecha *et al.* 1998) mayormente consisten en cianidina acilada llamada cianidina 3-sinapoil-xilosil-glucosil-galctosida (27.5%) y cianidina 3-feruloil-xilosil-glucosil-galactosida (13.5%) (Kirca *et al.* 2006; Sun *et al.* 2009). La producción de antocianinas en los cultivos de zanahorias han sido estudiados en células desde finales de 1970, el cultivo de células tratadas con una

especie Afgana de zanahoria negra salvaje muestran la presencia de seis tipos de antocianinas todas conteniendo cianidina (Gould *et al.* 2009). Netzel *et al.* (2007), demostró que los extractos ricos en antocianinas provenientes de la zanahoria negra inhibieron significativamente el crecimiento de células HT-29 colon rectal adenocarcinoma y células HL-60 de leucemia promielocítica in vitro. Adicionalmente, los extractos de zanahorias negras son alternativas de gran importancia utilizadas como colorantes sintéticos esto por su mínima toxicidad, mayor resistencia al calor y un pH estable como colorante alimentario (Sevimli-Gur *et al.* 2013).

Las zanahorias constituyen uno de los principales componentes de la nutrición humana y atrae la atención por ser utilizado como alimento funcional, debido a su alto contenido de antocianinas, también hay información sobre cultivos de callos de zanahoria que poseen actividad antioxidante (Sevimli-Gur *et al.* 2013). Extractos de plantas ricos en polifenoles pueden aumentar la actividad enzimática y no enzimática de los sistemas de defensa de los antioxidantes, esto se da al eliminar radicales libres de oxígeno, modulando la transcripción de la actividad de la fase I, II y enzimas antioxidantes (Noratto *et al.* 2011).

El cáncer colon rectal es una de las principales causas de muerte prematura en personas de todo el mundo y la conversión maligna de las células normales del colon puede ser causada por la inflamación crónica. La búsqueda de compuestos anti-inflamatorios naturales como parte de la dieta o de suplementos ha entrado recientemente en el enfoque científico (Noratto *et al.* 2011). En este estudio se buscó evaluar la respuesta de las células del miofibroblasto (CCD- 18Co) ante los extractos de zanahoria negra, camote morado y en su forma hidrolizada a diferentes concentraciones, los cuales fueron proveídos por la empresa Avoca, Inc.

Los objetivos del estudio fueron:

- Determinar las antocianinas presentes en los extractos.
- Evaluar los efectos de los extractos y concentraciones utilizadas con respecto a la proliferación celular.
- Evaluar el efecto de los extractos en la expresión de los genes TNF- α , NF- κ B, IL-6, IL-1 β .
- Determinar que concentración es la que obtuvo mejores resultados en cuanto a reducción de inflamación en especies reactivas a oxígeno.
- Comparar los extractos de camote morado, zanahoria negra y extractos hidrolizados.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio fue realizado en el laboratorio de Nutrición y Ciencia de Alimentos de la Universidad de Texas A&M, College Station, TX Estados Unidos. Se realizaron varios ensayos para determinación de propiedades anti-inflamatorias y de proliferación de células con la utilización de extractos de camote morado y de zanahoria negra provistos por la empresa Avoca, Inc.

Diseño del estudio. El diseño experimental utilizado para la proliferación de celular fue bloques completos al azar (BCA) con arreglo factorial de 4×3 con cuatro extractos (camote morado, camote morado hidrolizada, zanahoria negra, y zanahoria negra hidrolizada) y tres concentraciones (10, 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$) de cada extracto (Cuadro 1). Además, los tratamientos fueron comparados con un control en el cual no se aplicó ningún extracto para un total de 13 tratamientos con 3 repeticiones y cada repetición analizada por triplicado para un total de 117 unidades experimentales.

Cuadro 1. Diseño experimental para proliferación celular

Extractos	Concentraciones $\mu\text{g/mL}$		
	10	25	50
Camote morado	TRT 1	TRT 2	TRT 3
Camote morado hidrolizado	TRT 4	TRT 5	TRT 6
Zanahoria negra	TRT 7	TRT 8	TRT 9
Zanahoria negra hidrolizado	TRT 10	TRT 11	TRT 12
Control [§]	TRT13		

[§] Control: crecimiento celular en ausencia de extractos.

Para la extracción de ARN se usó un diseño experimental de bloques completos al azar (BCA) con arreglo factorial de 4×1 . Se evaluaron 6 tratamientos y 1 concentración (25 $\mu\text{g/mL}$) ya que no existió respuesta adecuada a concentraciones muy bajas o muy altas con tres repeticiones (cuadro 2). Los tratamientos evaluados fueron comparados con un control negativo (el cual no tiene presencia de extractos) y un control positivo (células sin extracto pero α inflamadas con TNF- α).

Para el ensayo de (ROS) se usó un diseño experimental de bloques completos al azar (BCA) con arreglo factorial de 3×4 . Son 4 tratamientos y 3 concentraciones con tres repeticiones (cuadro 2). Los cuales fueron comparados con el control negativo (el cual no tiene presencia de extractos) y el positivo (células sin extracto pero con TNF- α inducidas a inflamación).

Cuadro 2. Diseño experimental para la extracción de ARN y especies reactivas a oxígeno ROS.

Extractos	Concentraciones $\mu\text{g/mL}$		
	10	25	50
Camote morado	TRT 1	TRT 2	TRT 3
Camote morado hidrolizado	TRT 4	TRT 5	TRT 6
Zanahoria negra	TRT 7	TRT 8	TRT 9
Zanahoria negra hidrolizado	TRT 10	TRT 11	TRT 12
Control + [§]		TRT 13	
Control - [§]		TRT 14	

[§] Control: células inducidas a inflamación con TNF- α .

[§] Control: células no inflamadas.

Se utilizó una separación de medias LSMeans para encontrar diferencias significativas entre los extractos y las concentraciones. Los resultados fueron analizados con el programa “Statistical Analysis System” (SAS versión 9.4®).

Hidrolisis básica de extractos. Extractos de camote morado y zanahoria negra ricos en antocianinas fueron preparados (3 mL), con el objetivo de hidrolizar el enlace éster en los compuestos. Se colocó los extractos en tubos de ensayo de tornillo con tapa con 12 mL de NaOH acuoso 1N durante 10 min a 37 °C, y se aplicó nitrógeno para prevenir oxidación. Al finalizar el proceso de hidrolisis, la solución se acidificó con HCl concentrado para estabilizar los componentes y se enfrió en un baño de hielo durante cinco minutos (Terahara *et al.* 2004).

Separación de antocianinas. Las muestras de los extractos de zanahoria negra y de camote morado fueron filtrados a través de micro filtros de 0.45 μm y se almacenaron en viales de 1.5 ml para su posterior análisis. La separación de las antocianinas de zanahoria negra se realizó utilizando el equipo Alliance Waters 2695 (Waters Corp., Mildfold, MA) HPLC, equipado con un detector de matriz de fotodiodos (PDA) Waters 996. Las separaciones se llevaron a cabo en una columna Phenomenex Hydro-Synergy de 150×3.0 mm (Torrance, CA.) con una columna guardia C18. Las fases móviles consistieron en agua / ácido fórmico / acetonitrilo (87/10/3, fase móvil A) y de agua / ácido fórmico /

acetonitrilo (40/10/50, fase móvil B). El programa de gradiente del solvente corrió la fase A con flujo constante y la fase B 10% isocrático por cinco minutos; de 10 a 16% en tres minutos, de 16 a 30% en 22 minutos, de 30 a 100% en cinco minutos, de 100% isocrático por cinco minutos, de 100 a 10% cinco minutos, con un tiempo total de ejecución de 50 minutos. El flujo fue de 1 mL / min y el volumen de inyección para todas las muestras fue 20 µL (Kammerer *et al.* 2004). Se identificó los compuestos de manera cualitativa mediante tiempos de retención y comparación con Kammerer (2004).

Separación de antocianinas de camote morado se realizó utilizando el equipo Alliance Waters 2695 (Waters Corp., Mildfold, MA) HPLC, equipado con un detector de matriz de fotodiodos (PDA) Waters 996. Las separaciones se llevaron a cabo con una columna de fase inversa Prodigy (5 mm), 4,6 × 250 mm (Agilent, EE.UU.), con una columna guardia de C18. El flujo fue de 1 mL / min, y el volumen de inyección fue de 20 µL por muestra. La fase móvil A consistió en acetonitrilo, mientras que la fase móvil B fue una mezcla de 10% (v / v) de ácido acético en agua destilada. La separación de las antocianinas se llevó a cabo durante 30 minutos. El programa de gradiente del solvente corrió la fase A de 10 a 25%, fase B de 75 a 45% desde cero a 10 minutos; fase A de 25 a 40% desde 15 a 20 minutos; fase B de 45 a 10%, fase A 40 a 25% desde 20 a 30 minutos (Cipriano *et al.* 2014 por publicar).

Siembra de células y cambio de medio. En este estudio se utilizó células intestinales de miofibroblasto CCD-18Co (ATCC Manassas, VA), siguiendo el protocolo de Noratto *et al* (2011). Las células se cultivaron en 500 mL de medio de alta glucosa (Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM) (Invitrogen, Carlsbad, CA), el cual fue suplementado con soluciones de 1% penicilina/estreptomicina, 1% aminoácidos no esenciales (10 mL), 1% piruvato de sodio (100mL) y 20% suero bovino fetal. Todos los insumos antes mencionados fueron suplidos por Invitrogen (Carlsbad, CA).

Las soluciones utilizadas fueron buffer de fosfato salino (PBS) 10% en 90% de agua desionizada. FBS 10% suero bovino fetal (Invitrogen, Carlsbad, CA) en 90% solución de PBS. 0.25% de tripsina (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las soluciones y el medio fueron filtrados previos a su uso para eliminar contaminación. Se utilizó las soluciones antes mencionadas en los diferentes estudios realizados.

Para los ensayos realizados fue necesario tener una cantidad específica de células a utilizar, la confluencia a utilizar dependió del ensayo, en el caso de división celular en platos de 100 mL se buscó una confluencia de 90% para poder dividirlos. Al inicio de cada siembra se calentó las soluciones y el medio a 37 °C a baño maría ISOTemp 210. Se extrajo viales de células CCD18-Co del tanque de nitrógeno líquido, las cuales se dejaron descongelar a temperatura ambiente hasta que estuvieran completamente descongeladas, simultáneo al descongelamiento se preparó la cámara de flujo laminar (Forma 1400 Series Biological Safety and Cabinet, AEX 127905, Thermo Electron Corporation) se desinfectó con etanol al 70% los guantes, el medio y las soluciones extraídas del baño maría simultáneamente para obtener un área estéril donde no hubiera cabida a contaminación. Las células descongeladas fueron extraídas del vial (1 mL) y colocadas en un plato. Con la ayuda de una pipeta, se agregó medio DMEM (8 mL) en cada plato sembrado. Se agitó los platos para lograr una buena homogenización y se llevó a la incubadora (Hepa class 100 forma series II, Thermo electron Corporation) por 24 horas. Se rotuló los platos con

las iniciales del que siembra las células, la fecha de siembra, el pasaje encontrado en los viales y el nombre de la línea celular. Pasadas las 24 horas, se observó los platos bajo el microscopio esperando que las células estuvieran adheridas al fondo del plato posteriormente se aspiró el medio, se enjuagó con PBS (8 mL) para eliminar la solución con la que se congeló a las células y se incubó por 48 horas a 37 °C y 5% CO₂.

Después de 48 horas de incubación se observó la confluencia (población celular dada en porcentaje de manera empírica) de los platos sembrados, la confluencia de los platos se debe encontrar entre un 85-90% para que estos fueran aptos para su división. Cuando la confluencia fue baja se reemplazó el medio cada 48 horas, en este caso se aspiró el medio, se enjuagó con solución salina PBS (8 mL) para eliminar células muertas, posteriormente se aspiró el PBS y se agregó medio nuevo (8 mL).

Se escogió los platos aptos para división, se aspiró el medio antiguo de estos y se agregó 8 mL PSB (para enjuagar las células), posteriormente se aspiró el PBS y se agregó 1 mL de tripsina al 0.25% el plato se incubó por cinco minutos, durante esto la tripsina actuó desnaturalizando las proteínas, posteriormente se observó el plato bajo el microscopio asegurándonos que las células se desprendieron, posteriormente se agregó 8 mL de FBS para inhibir la acción de la tripsina y se transfirió con la ayuda de una pipeta a un tubo tipo Falcon de 50 mL, con mucho cuidado de no dejar células adheridas al plato, posteriormente se centrifugó a 1,200 rpm por dos minutos a 25 °C en la Jovan CR3: Centrífuga multifunción, Thermo Electron Corporation. La centrifugación sedimentó las células al fondo del tubo tipo Falcon, del cual cuidadosamente se aspiró la solución flotante y se agregó 2 mL de medio por cada plato utilizado, se mezcló cuidadosamente. Se rotuló los platos nuevos, con la ayuda de una pipeta se tomó del tubo tipo Falcon 1 mL de células y se agregó al nuevo plato, también se le agregó 8 mL de medio se mezcló bien y se incubó por 48 horas a 37 °C y 5% de CO₂ en incubadora de CO₂, Hepa class 100 forma series II, Thermo Electron Corporation, se tomó en cuenta que cada plato con 85-90% de confluencia que se dividió, se obtuvo dos platos más, con un pasaje superior al anterior.

Células para ensayos realizados. Se tomó de la incubadora la cantidad de platos necesarios dependiendo de su confluencia. Se aspiró el medio antiguo y se agregó 8 mL PBS (para enjuagar las células), este se aspiró y se agregó 1 mL de tripsina al 0.25% se incubó el plato por cinco minutos, donde la tripsina hidrolizó los péptidos, una vez terminado los cinco minutos, se observó el plato bajo el microscopio asegurándonos que las células se desprendieron, posteriormente se agregó 8 mL de FBS, así se inhibió la acción de la tripsina y con la ayuda de una pipeta se transfirió todo el contenido del plato a un tubo tipo Falcon de 50 mL con mucho cuidado de no dejar células adheridas al plato, el tubo se centrifugó a 1,200 rpm por dos minutos a 25 °C en la Jovan CR3: Centrífuga multifunción, Thermo Electron Corporation. La centrifugación sedimentó las células al fondo del tubo tipo Falcon, del cual cuidadosamente se aspiró la solución flotante y se agregó 1 mL de medio por cada plato utilizado, se mezcló cuidadosamente.

Para la siembra de platos primero se realizó el conteo de células. Para ello, se tomó una cubeta de 10 mL de solución isotónica y 50 µL de suspensión de células se mezcló y se llevó al contador de células (Z2 Contador y Analizador de Células. Beckman Coulter). Con el número de células obtenidas se calculó la cantidad de medio y de suspensión

celular que se utilizó para la posterior siembra. Para cada ensayo se usó diferentes cantidades de células.

Proliferación celular. Este ensayo se realizó con CellTiter 96® Aqueous One Solution (Promega, Madison, WI). Se sembró células a una densidad de 3,000 a 5,000 células por pocillo, en un plato de 96 pocillos en el cual se colocó 100 µL de mezcla en cada pocillo, se incubó el plato por 24 horas hasta ser adheridas en el fondo del plato. Al día siguiente se agregó los extractos, cada uno con tres diferentes concentraciones previamente calculadas (10, 25, 50 µL). Se aspiró el medio antiguo y se agregó el medio con las concentraciones antes provistas, se colocó 100 µL en cada pocillo de la nueva mezcla. El radio de absorbancia entre los cultivos de células tratados y no tratados con el extracto fueron los controles. El conteo celular se realizó dos días posteriores, se aspiró el medio de cada pocillo y se añadió 100 µL PBS y se aspiró. Se agregó 30 µL sustancia de Alamar Blue en cada pocillo, se incubó por tres horas. Para su posterior lectura a una absorbancia de 490 nm (BMG Labtech Inc., Durham, NC). El conteo de células se efectuó con un contador de partículas electrónico FLUOstar Omega microplate reader (BMG Labtech Inc, Durhan, NC) el cual otorgó un conteo de crecimiento celular mayor al control, ya que el crecimiento no debió ser inhibido, las células normales del miofibroblasto debieron continuar con un crecimiento normal similar al del cuerpo humano, caso contrario el extracto mató a las células.

Extracción de ácido ribonucleico (ARN). Para este ensayo se utilizó platos de 12 pocillos a una densidad de 100,000 células/pocillo, en cada pocillo se colocó un volumen de 1 mL de mezcla, el cual se incubó por 24 horas hasta que las células se adhirieran al plato. Pasadas las 24 horas, se aspiró el medio con el que se sembró las células y se agregó el medio con extracto en las tres concentraciones (0.5 mL) en cada pocillo, el plato se colocó en incubación Hepa class 100 forma series II. Thermo Electron Corporation a 37 °C y 5% de CO₂, por 1 hora, y posteriormente se agregó extractos con factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) para inducir inflamación en las células, el contenido de esta mezcla fue TNF-α con medio y diferentes concentraciones del extracto. No se aspiró en medio antiguo sino que se agregó 0.5 mL de esta nueva mezcla y se incubó por tres horas. Después de las tres horas se aspiró la mezcla y se agregó 0.5 mL de solución de PBS para lavar las células, luego se aspiró la solución y se agregó 350 µL de RLT Lysis Buffer posteriormente se congeló a -80 °C por 24 horas.

Utilizando el Mini Kit RNeasy, QIAGEN Sample & Assays technology, Cat. # 74104, se raspó cada pocillo tratando de extraer todas las células que estaban adheridas al fondo del pocillo, se transfirió a columnas Qia Shredder spin, para su centrifugación utilizando Micro centrífuga, (Accuspin Micro 17R Fisher Scientist), a 8,000 g por dos minutos. Se descartó el sobrenadante y se agregó 250 µl de etanol al 70% a cada columna RNeasy mini spin se centrifugó a 8,000 g durante 15 segundos y se descartó el fluido. Se agregó 700 µL de buffer RW1 en cada columna, se centrifugó a 8,000 g durante 15 segundos y se descartó el fluido. Se agregó 500 µL de Buffer RPE, se centrifugó a 8,000 g durante 15 segundos y se descartó el fluido. Se agregó nuevamente 500 µL de Buffer RPE se centrifugó a 8,000 g durante 15 segundos, posterior a esto se cambió los tubos de colección por otros para ser centrifugado a 13,000 rpm durante un minuto para eliminar cualquier residuo de las soluciones. Se colocó nuevos tubos de colección de 1.5 mL, en la

mini centrífuga previamente utilizada y se agregó a cada uno de los tubos 30 μL de agua libre de nucleasas, se centrifugó a 8,000 g durante 1 minuto para así finalmente obtener en los tubos de 1.5 mL el ARN extraído de las células, el cual se colocó en hielo y se descartó las columnas RNeasy Mini spin.

Posterior a esto se midió la calidad y concentración del ARN obtenido de cada muestra, para esto se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 Thermo Scientific. El ARN obtenido se utilizó para el análisis de reacción en cadena de polimerasa (PCR) en tiempo real.

Reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (RT PCR). Con las concentraciones y la calidad de ARN que se obtuvo, se calculó la cantidad de agua y ARN (10 μL en total de toda la mezcla) necesarios a utilizar para realizar la reacción en cadena de polimerasa.

Se preparó los mini tubos de RT-PCR previamente rotulados con el número de muestra y se agregó la cantidad de agua y ARN necesarias, se preparó dos mezclas maestras (I, II) provenientes de Applied Biosystems (Foster City, Ca) y se agregó 2 μL de la mezcla maestra I a cada tubo, se colocó en incubación durante cinco minutos a 65 °C. Luego se agregó 7.8 μL de mezcla maestra II a cada tubo, se incubó durante una hora a 50 °C, una vez concluido esto, se agregó 100 μL de agua a las muestras, para tener suficiente muestra, se colocó las muestras en hielo para prevenir la degradación.

Durante la incubación de las muestras, se preparó las mezclas de los primers o cebadores en el plato para PCR con 8 μL cada pocillo y 2 μL de la muestra para un total de 10 μL , se escogió cinco primers (Integrated DNA Technologies, Inc. San Diego, CA) a utilizar, cada uno diseñado con un objetivo en específico para la transcripción del mRNA. Cada primer (en pares) por lo cual se tiene el anterior y el posterior, estos fueron mezclados de la siguiente forma: 10 μL de anterior, 10 μL del posterior y 80 μL de agua.

El plato para PCR con 10 μL con la mezcla de muestra y primers en cada pocillo se centrifugó a 3,000 \times g por cinco minutos a 22 °C, para su posterior lectura de PCR utilizando 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 y se basó los datos reportados en la relación de microARN de un gen específico respecto a la cantidad de otro gen (control) que en este caso fue TBP, la presencia de este gen en comparación con los primers anteriormente nombrados, indican la cantidad de inflamación que se tiene es decir si fue inducida o reducida.

Generación de especies reactivas a oxígeno (ROS). Se sembró células a una densidad de 3,000 a 5,000 por pocillo, en un plato de 96 pocillos en el cual se colocó 100 μL de mezcla en cada pocillo, se incubó por 24 horas hasta ser adheridas en el fondo del plato. Al día siguiente se absorbió el medio antiguo y se le agregó 100 μL de los extractos con tres concentraciones previamente calculadas (10, 25, 50 μL). Se incubó durante una hora y posteriormente, se aspiró el medio y se agregó 100 μL de extracto con factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α 10ng/ml) para inducir inflamación, se colocó en incubación a 37 °C durante tres horas, se retiró de incubación, se enjuagó con 100 μL de PBS, se aspiró el PBS y se agregó 10 μL 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) se incubó durante

30 minutos a 37 °C, para su posterior lectura a 520 nm de emisión y 480 nm de excitación en el FLUOstar Omega microplate reader (BMG Labtech Inc, Durhan, NC).

Al finalizar la lectura, se obtuvo una cuantificación relativa de la cantidad de células dentro de cada pocillo, las cuales se encontró en el rango del control positivo y negativo.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación y cualificación de antocianinas. Se realizó análisis cromatográficos en HPLC para cualificar el contenido de antocianinas en los extractos no hidrolizados, en este caso se analizó dos extractos: zanahoria negra (ZN) y camote morado (PSP), extractos usados en el experimento.

Entre el grupo de flavonoides se encuentran las antocianinas, estas son consideradas la categoría más importante dentro de este grupo (Li *et al.* 2012). La estructura básica de una antocianina es una antocianidina (o aglicona) glucosilada la cual consiste en tres anillos aromáticos (C6-C3-C6) (Harborne 1998). Las seis antocianidinas identificadas en la naturaleza son cianidina, peonidina, pelargonidina, malvidina, delpinidina y petunidina (Eder 2000, Kong *et al.* 2003). Los grupos hidroxilo en la aglicona unen el azúcar, que puede a su vez estar vinculado a otros azúcares a través de enlaces glucosídicos o puede acilarse mediante compuestos orgánicos aromáticos o ácidos alifáticos (ácido cinámico, ácido malónico, y ácido acético, para nombrar unos pocos) a través de enlaces éster (He y Giusti 2010).

El camote morado y la zanahoria negra son compuestos ricos en antocianinas aciladas, las cuales contienen un alto potencial anti-inflamatorio a comparación a las antocianinas no aciladas (Konczak *et al.* 2005). Sin embargo, Arbizu (2013) indicó que extractos no acilados de mango a concentraciones en el rango de 2.5 – 10 µg GAE/ml, no inhibieron el crecimiento en células mamarias MCF-12, otros resultados del estudio mostraron que concentraciones mayores a 10 µg GAE/ml causaron toxicidad. Es por esto que se realizó hidrólisis básica de los extractos, con la hipótesis de si extractos de mango no acilados obtuvieron los mismos resultados a menores concentraciones, podría suceder que extractos hidrolizados se comportarían de la misma manera.

En el caso de zanahoria negra la cualificación de los picos se basó en el método de Kammerer (2004), el cual las antocianinas encontradas fueron eluidas desde el minuto tres hasta el minuto 11 (Figura 1), las cuales coinciden con seis de las siete antocianinas encontradas por Kammerer (2004). Cia 3- ρ -coumaril -xilglcgal es la antocianina acilada que se encontró en mayor cantidad.

Se utilizó un método de separación basado en Kammerer (2004). Asignación de picos: (1) cianidina 3-xilosilglucosilgalactosida (cia 3-xilglcgal), (2) cia 3-xilgal, (3) cia 3- ρ -hidroxibenzoil-xilglcgal, (4) cia 3 sinápico-xilglcgal, (5) cia 3ferruloil-xilglcgal, (6) cia 3- ρ -coumaril-xilglcgal.

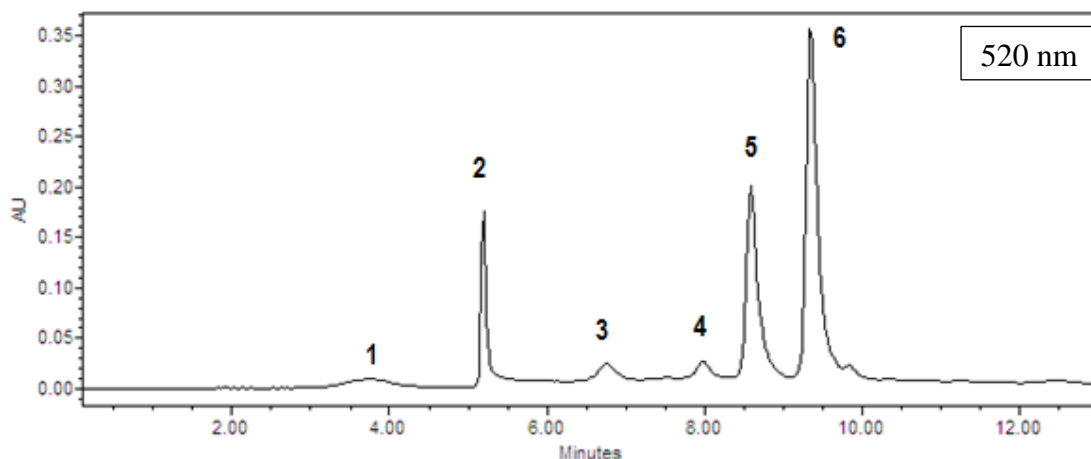


Figura 1. Cromatograma de separación de antocianinas de extracto de zanahoria negra analizada en el HPLC (520 nm).

La cualificación de los picos para camote morado es basada en Cipriano *et al.* 2014, por publicar. Las muestras inyectadas al HPLC fueron eluidas desde el minuto 4 hasta el minuto 18 (Figura 2), las cuales indican una clara separación de antocianinas, mostrando 9 picos, principalmente formados de cianidina y peonidina. Cianidina 3-cafeoil- p -hidroxibenzoil soforosa-5-Glucosida es la antocianina acilada que se encontró en mayor cantidad.

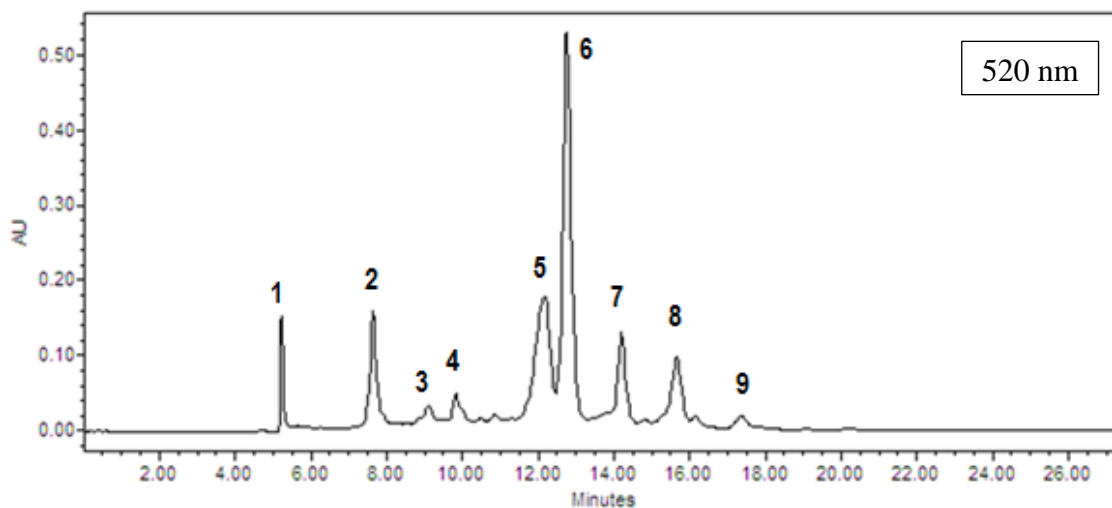


Figura 2. Cromatograma de separación de antocianinas de extracto de camote morado analizado en HPLC (520 nm) (Cipriano *et al.* 2014 por publicar).

La cualificación de los picos se tomaron de Cipriano *et al.* 2014, por publicar. Cualificación de picos: (1) cianidina 3-soforosa 5-Glucosida, (2) peonidina 3-soforosa 5-Glucosida, (3) cianidina 3-cafeoil soforosa-5-Glucosida, (4) cianidina 3 p -hidroxibenzoil

soforosa-5-Glucosida, (5) peonidina 3- ρ -hidroxibenzoil soforosa-5-Glucosida, (6) cianidina 3-cafeoil- ρ -hidroxibenzoil soforosa-5-Glucosida, (7) cianidina 3-(6"-cafeoil-6"-ferruloil soforosa)-5-Glucosida, (8) peonidina 3-cafeoil- ρ -hidroxibenzoil soforosa-5-Glucosida, (9) peonidina 3- ρ -hidroxibenzoil soforosa-5-Glucosida.

Proliferación celular. No se encontraron diferencias estadísticas significativas ya que existió una probabilidad $P > 0.05$ de la viabilidad de las células en presencia de los extractos a diferentes concentraciones. En los resultados obtenidos no se encontró mayor variación entre repeticiones, lo cual indica que se realizó un buen control de los diferentes factores como tiempo de incubación, medio utilizado y pipeteo.

El crecimiento de células del miofibroblasto del intestino CCD-18Co tratadas con extractos de Camote morado (C), Zanahoria negra (ZN) e hidrolizados (CH y ZNH), fue investigado. El ensayo fue realizado durante 48 horas a diferentes concentraciones (10, 25, 50 $\mu\text{g/mL}$), se indujo las células a inflamación mediante un gen específico para determinar la potencial toxicidad en las células. Los resultados indicaron que ningún extracto con la dosis antes mencionada inhibió significativamente el crecimiento celular. Sin embargo, mostró que mediante la dosis aumentó la cantidad de células disminuyó (Figura 3), esto se puede observar principalmente en el extracto de ZN y ZNH, con disminución del 10% en comparación con los demás extractos, lo cual pudo deberse al contenido total de antocianinas presentes en estos extractos y la variedad utilizada (Kammerer *et al.* 2004).

El contenido total de antocianinas está dado principalmente por el tiempo de cosecha, debido a que los pigmentos en zanahoria negra pueden presentar diferencias a través de los periodos. El promedio de compuestos acilados se encuentran en el rango de 80.2% en cosechas de finales de agosto en comparación a 84.8% en cosechas de mediados de octubre, siendo el componente predominante cianidina feruloilxilosilglucosilgalactosida (Kammerer *et al.* 2004).

Reportes sobre polifenoles en camote morado han mostrado protección contra estrés oxidativo y viabilidad de células del peocromocitoma (Ye *et al.* 2009), debido a la capacidad antioxidante que posee y su alta capacidad de absorción en el cuerpo que puede ser detectada en la sangre y rápidamente excretada en la orina. Más de 8000 polifenoles, incluyen más de 4000 flavonoides (Harborne *et al.* 1999). Propiedades antioxidantes de las antocianinas son dependientes de su estructura molecular (Koczak *et al.* 2005).

Antocianinas, así como otros compuestos fenólicos pueden actuar como antioxidantes donando hidrógenos a radicales libres, para prevenir futura formación de radicales libres (Iversen 1999). Estudio realizado por Ye *et al.* (2009), mostró que los tratamientos con concentraciones en el rango de 5 $\mu\text{g/mL}$ a 20 $\mu\text{g/mL}$ de camote morado en el cual aumenta la viabilidad de células del PC12 contra 20 μM $A\beta$ beta amiloide, compuesto usado para inducir toxicidad, sin embargo indica que tratamientos con concentraciones mayores a 50 $\mu\text{g/mL}$ podrían incrementar la toxicidad del $A\beta$ inducido.

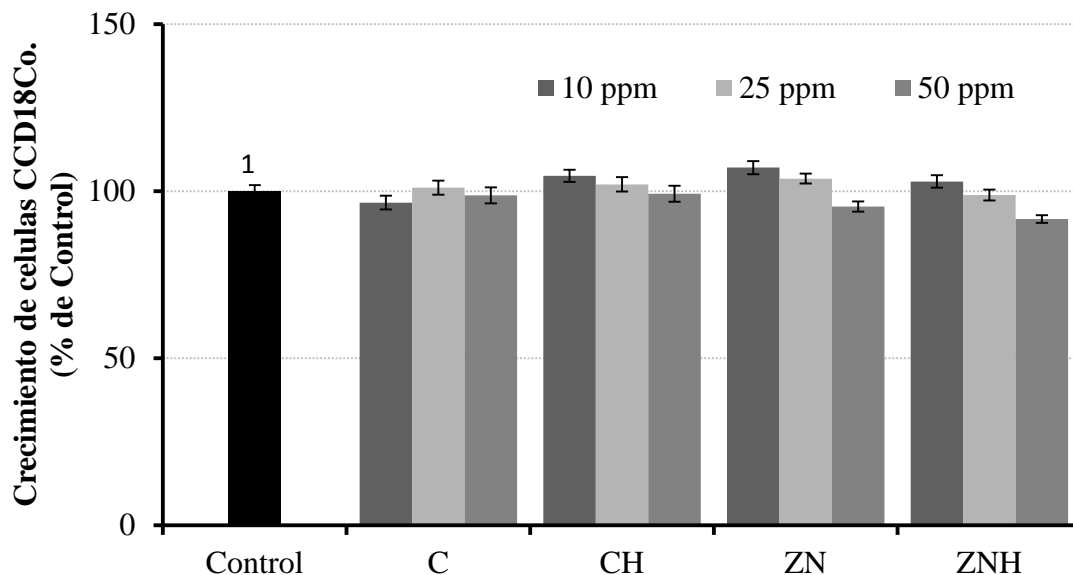


Figura 3. Proliferación celular de células CCD-18Co células del miofibroblasto en presencia de extractos de camote morado, zanahoria negra y extractos hidrolizado. H: Extractos hidrolizados. 1: Sin presencia de letras, no diferencias significativas.

Especies Reactivas a Oxígeno (ROS). Son especies químicas intracelulares que contienen oxígeno (O_2) y son reactivas en presencia de lípidos proteínas y ADN (Glasauer y Chandel s.f.). ROS es producido como un metabolismo natural del oxígeno y usualmente se encuentran presente en células aerobias en balance con antioxidantes bioquímicos y se ha mostrado como una de las mayores causas de cáncer (Waris y Ahsan 2007). En base a esto, la generación de especies reactivas a oxígeno fue investigada en CCD-18Co células no cancerígenas del miofibroblasto del intestino fueron inducidas a estrés oxidativo mediante el factor de necrosis tumoral alfa ($TNF-\alpha$), mostrando que los extractos utilizados en este estudio reducen la generación de ROS comparado con el control positivo, donde las células se indujeron a inflamación sin la aplicación de extractos. Se encontró diferencias significativas en los tratamientos (Figura 4 y 5) ya que los tratamientos con camote morado y zanahoria negra tuvieron una probabilidad de 0.02 y 0.05 respectivamente. Resultados similares fueron encontrados en un estudio por Arbizu (2013), en el cual se evaluó extractos fenólicos de mango en células cancerígenas y no cancerígenas del fibroblasto de mamas in vitro.

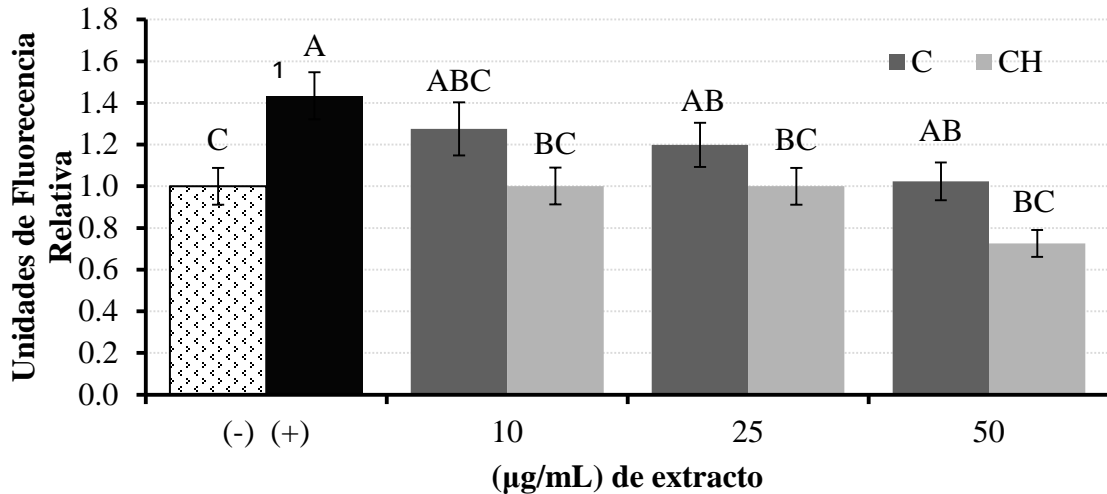


Figura 4. Generación de especies reactivas a oxígeno (ROS) en células del miofibroblasto CCD-18Co, tratadas con extracto de camote morado y camote morado hidrolizado. (-) Control negativo: crecimiento de células no inflamadas con TNF- α (10 ng/ml) y ausencia de extractos. (+) Control positivo: crecimiento de células inflamadas con TNF- α (10 ng/ml) ausencia de extractos. H: Extractos hidrolizados. 1: Diferentes letras indican diferencias entre tratamientos ($P < 0.05$).

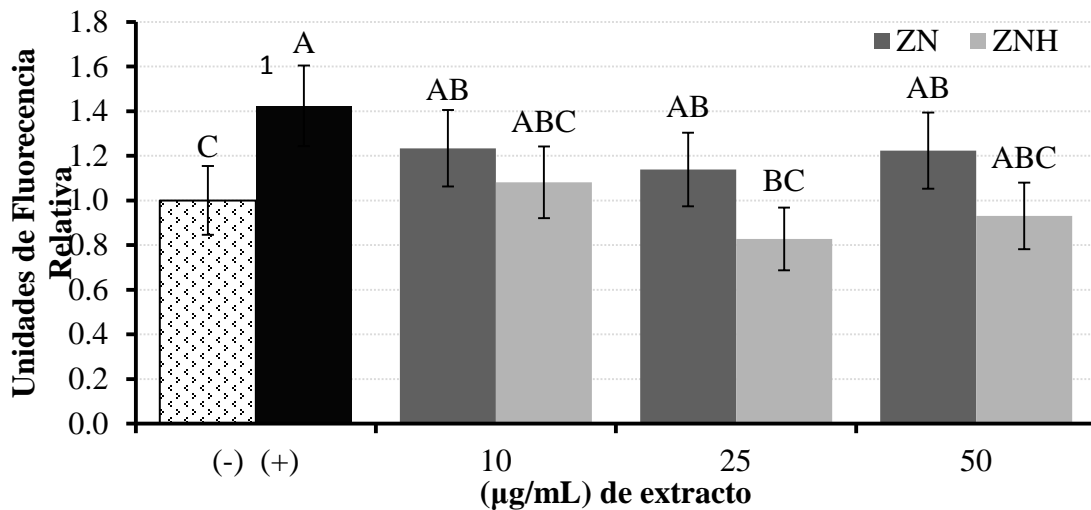


Figura 5. Generación de especies reactivas a oxígeno (ROS) en células del miofibroblasto CCD-18Co, tratadas con extracto de zanahoria y zanahoria negra hidrolizada. (-) Control negativo: crecimiento de células no inflamadas con TNF- α (10 ng/ml). (+) Control positivo: crecimiento de células inflamadas con TNF- α (10 ng/ml) ausencia de extractos. H: Extractos hidrolizados. 1: Diferentes letras indican diferencias entre tratamientos ($P < 0.05$).

Sin embargo, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos en comparación con el control positivo (Figura 4 y 5), pero no se encontró diferencias entre extractos de camote morado hidrolizados a diferentes concentraciones, a diferencia de los extractos no hidrolizados, en el cual se mostró una menor reducción en inflamación para la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 4). Sin embargo, el extracto de CH fue el que presentó una mayor reducción del estrés oxidativo. En el caso de los extractos de zanahoria negra se observó diferencias significativas en comparación con el control positivo, extractos hidrolizados de zanahoria negra al igual que el hidrolizado de camote morado mostró una mayor reducción de inflamación, a diferencia que en este caso no se necesitó una concentración tan alta (25 $\mu\text{g/mL}$) y se observó diferencias significativas entre las diferentes concentraciones (Figura 5), Sin embargo, los extractos no hidrolizados de zanahoria negra mostraron reducción en inflamación pero sin diferencias entre estos. Resultados similares fueron encontrados en un estudio por Noratto *et al.* (2011) de extractos fenólicos de hojas de holly con capacidades antiinflamatorias y quimiopreventivas en células del miofibroblasto CCD-18Co en el cual las dosis de polifenoles (5 -40 mg GAE/L) disminuyeron la producción de ROS en un 26%.

Efectos de los extractos en general presentaron una reducción de ROS (Figura 4 y 5) esto se pudo atribuir a la habilidad de los antioxidantes de eliminar los radicales libres (Glasauer y Chandel s.f.). Por otro lado, se mostró una mayor reducción en inflamación en los compuestos hidrolizados, contrario a lo que indica Konczak *et al.* (2005), los compuestos no hidrolizados muestran mayor actividad antioxidante que sus formas hidrolizadas.

Estudios sobre antocianinas de camote morado y sus efectos en suprimir el desarrollo de las lesiones en arterosclerosis ligada al estrés oxidativo en células vasculares en poliproteína deficiente en ratones, muestra que extractos acilados de camote morado contienen una potente protección del LDL contra la oxidación en comparación a otras antocianinas. Ya que la oxidación del LDL desencadena la producción de citoquinas inflamatorias (Miyazaki *et al.* 2008).

Extracción de Ácido Ribonucleico (ARN) y reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR) inducidas a inflamación. Datos obtenidos en extracción de ARN fueron variables, debido a la cantidad de ARN analizada, esta pudo variar debido a mala extracción, desinfección deficiente, calidad de agua, pipetas y pipeteo. Razones que influenciaron en la cantidad de ARN utilizada. Sin embargo, lo importante fue la calidad de ARN obtenido durante la extracción, el cual se determinó por la relación de absorbancia 260/280, la cual se debe encontrar arriba de 2.0, indicando pureza o carencia de polisacáridos (Garrido *et al.*s.f. y FBMC), sin embargo, generalmente la calidad del ARN está determinada por su aplicación (Armijos *et al.* 2013).

MicroARN (miARN) son pequeñas cadenas de ARN no codificado que controla la expresión de los genes del ARN mensajero (mARN) desencadenando la represión de la traducción y la degradación del ARN, esta expresión puede desencadenar inflamación y posterior a esto diferentes enfermedades incluyendo cáncer (Iorio *et al.* 2005).

El ARN mensajero (mARN) de alta calidad fue usado para la síntesis de cADN, el cual es un ADN de cadena doble, el mismo que posteriormente fue utilizado para realizar RT-

PCR con el uso de los primers o cebadores TNF- α , NF- κ B, IL-6 y IL-1 β , que son los encargados de iniciar la reacción de PCR en cadena (Armijos *et al.* 2013).

Inflamación es una respuesta natural del cuerpo frente a una infección causada por un factor interno o externo (Arbizu 2013), en este caso el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B) (Armijos *et al.* 2013) es el regulador clave de la inflamación que conduce a la expresión de citoquinas y enzimas como TNF- α , IL6 y IL-1 β , entre otros, los cuales están involucrados en el desarrollo de carcinogénesis (Arbizu 2013). Especies reactivas a oxígeno contribuyen a la inflamación, cuando la activación de NF- κ B ocurre, causando inflamación en la mucosa intestinal y provocando inflamación del intestino (Kaplan *et al.* 2007).

Basándonos en esto, se analizó los efectos de los extractos utilizados, inducidos a inflamación mediante el Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en células del miofibroblasto (CCD-18Co). Se utilizó TNF- α debido a que es considerado uno de los mayores mediadores de inflamación, desencadenando la expresión de diferentes citoquinas pro-inflamatorias (Chen y Goeddel 2002) entre estos la activación de NF- κ B (Roman-Blas y Jiménez 2006).

La expresión de NF- κ B no mostró diferencias estadísticas significativas entre los extractos de camote morado y zanahoria negra, sin embargo, extractos en general (25 μ g/mL) presentan una represión del gen al compararlo con el control positivo (Figura 6), lo cual indica que hubo una reducción en la inflamación, por lo tanto, una reducción en la expresión de la proteína NF- κ B (Roman-Blas y Jiménez 2006). Como se puede observar hubo una mayor reducción en los extractos de CH y ZNH con una reducción de 78.78% y 75.15% respectivamente (Figura 6), sin embargo, los extractos de C y ZN tuvieron una reducción de 69.69% y 72.72% respectivamente, lo cual es relativamente menor, sin embargo, sigue presentando efectos antiinflamatorios. Estudios demuestran que los polifenoles presentes en frutas y vegetales modulan la inflamación y la anti inflamación (Ye *et al.* 2010) y pueden actuar como moduladores de producción de enzimas (Iorio *et al.* 2005).

Por otro lado, estudios muestran antocianinas aciladas reducen la activación de NF- κ B en células endoteliales y disminuyen la producción de óxido nítrico (Metzger *et al.* 2008).

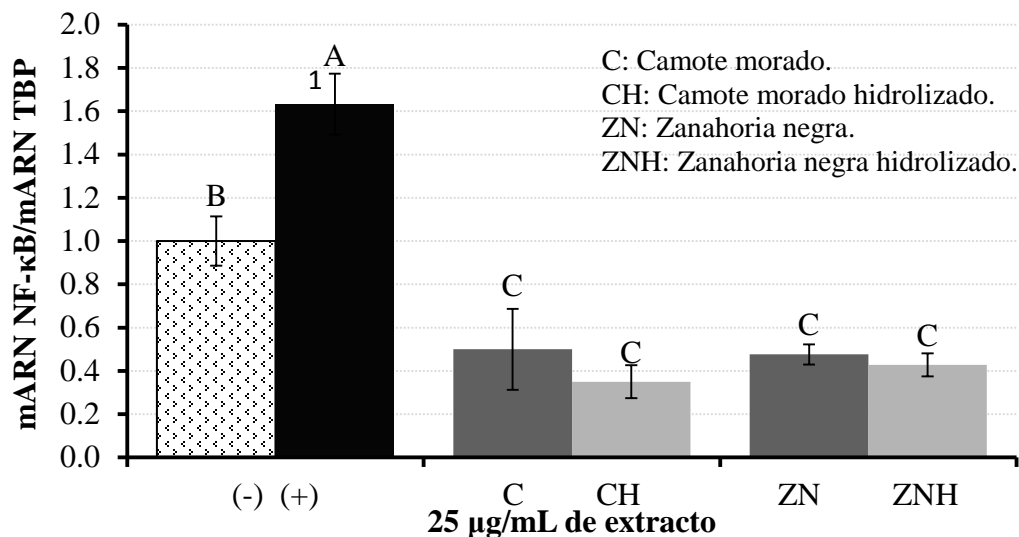


Figura 6. Efecto de diferentes tratamientos en células del miofibroblasto CCD-18Co. En la expresión del primer NF-κB.
 (-) Control negativo: crecimiento de células no inflamadas con TNF-α (10 ng/ml).
 (+) Control positivo: crecimiento de células inflamadas con TNF-α (10 ng/ml) ausencia de extractos.
 H: Extractos hidrolizados.
 1: Diferentes letras indican diferencias entre tratamientos ($P < 0.05$).

Entre los miembros de la familia de TNF-α, se encuentran las citoquinas inflamatorias tales como interleucinas (IL-1β, IL-6, IL-8, IL-18) y quimioquinas (MMP-9, VEGF, COX-2) todas ellas reguladas por la traducción de TNF-α (Balkwill y Mantovani 2001), las cuales se encuentran ligadas a la tumorigenesis (Aggarwal *et al.* 2006). Además de considerarse a IL-6 and IL-1β importantes mediadores de la inflamación (Tamm s.f.)

La interleucina-6 (IL-6) es una citoquina relacionada a la inflamación, lo que indica que cuando el ADN y ARN son atacados por diferentes virus y bacterias, el IL-6 es inducido, aumentando los niveles de esta citoquina rápidamente cuando el cuerpo tiene una infección (Tamm s.f.). Citoquinas juegan papeles esenciales en la patogénesis inmune, y en el incremento o disminución de IL-6 y IL-8 es inducido por la expresión de NF-κB (Noratto *et al.* 2011).

Los extractos de camote morado y de zanahoria negra presentaron supresión de la expresión del gen IL-6 y IL-1β, como se pudo observar (Figura 8) no se encontraron diferencias estadísticas significativa entre tratamientos. Sin embargo (Figura 7) se observó una diferencia significativa al comparar el camote morado con los demás extractos, sin embargo, en ambos casos existió una reducción en la expresión de los genes IL-6 y IL-1β, específicamente se pudo encontrar una mayor reducción en el tratamiento de ZN y ZNH con 56.89% y 60.34% respectivamente en el gen IL-1β (Figura 7). Así mismo en la expresión del gen IL-6 se mostró una reducción en los mismos tratamientos con 72.97% y 78.37% en comparación con el control positivo (Figura 8).

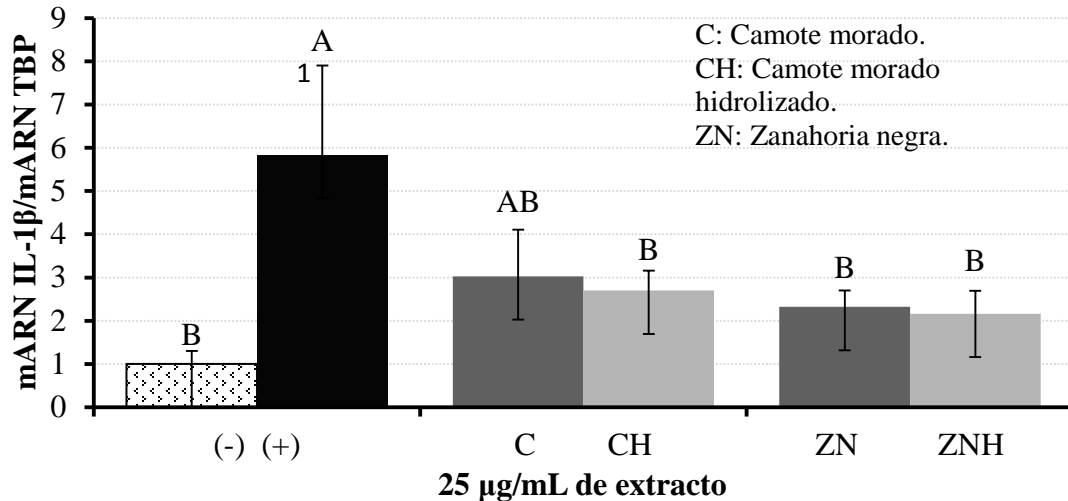


Figura 7. Efecto de diferentes tratamientos en células del miofibroblasto CCD-18Co. En la expresión del primer 1L-1β.
 (-) Control negativo: crecimiento de células no inflamadas con TNF-α (10 ng/ml).
 (+) Control positivo: crecimiento de células inflamadas con TNF-α (10 ng/ml) ausencia de extractos.
 H: Extractos hidrolizados.
 1: Diferentes letras indican diferencias entre tratamientos ($P < 0.05$).

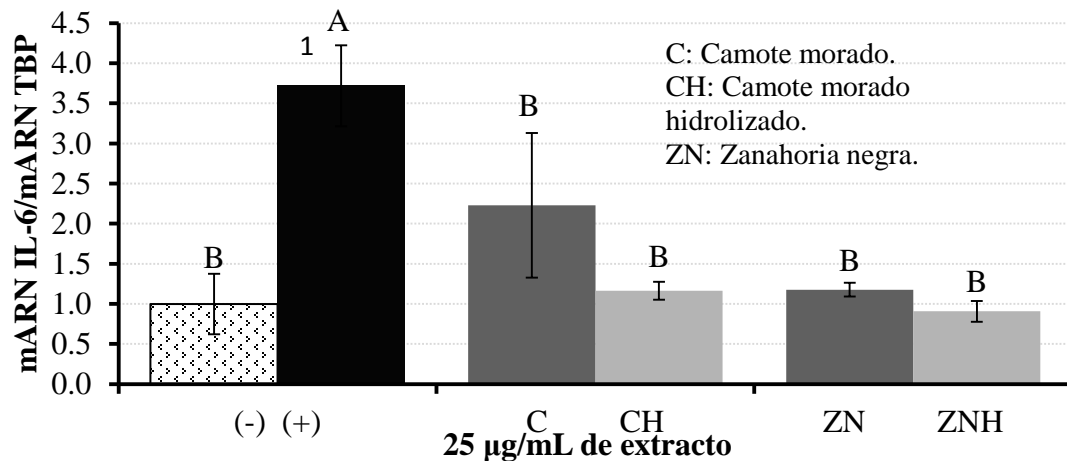


Figura 8. Efecto de diferentes tratamientos en células del miofibroblasto CCD-18Co. En la expresión del primer IL-6.
 (-) Control negativo: crecimiento de células no inflamadas con TNF-α (10 ng/ml).
 (+) Control positivo: crecimiento de células inflamadas con TNF-α (10 ng/ml) ausencia de extractos.
 H: Extractos hidrolizados.
 1: Diferentes letras indican diferencias entre tratamientos ($P < 0.05$).
 El factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) es el regulador de la inflamación y un agente crucial en formación de granuloma, fue nombrado así por su habilidad para destruir

células tumorales y causar necrosis hemorrágica en tumores de ratones (Vargas 2009). Al evaluar la expresión de TNF- α en células CCD18-Co se observó que no existieron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos, sin embargo, mostró una reducción en la expresión del gen en los diferentes tratamientos los cuales se compararon con el control positivo, en este caso se observó (Figura 9) que ZNH tuvo una mayor reducción en la expresión del gen en un 60.56% en comparación a los demás tratamientos.

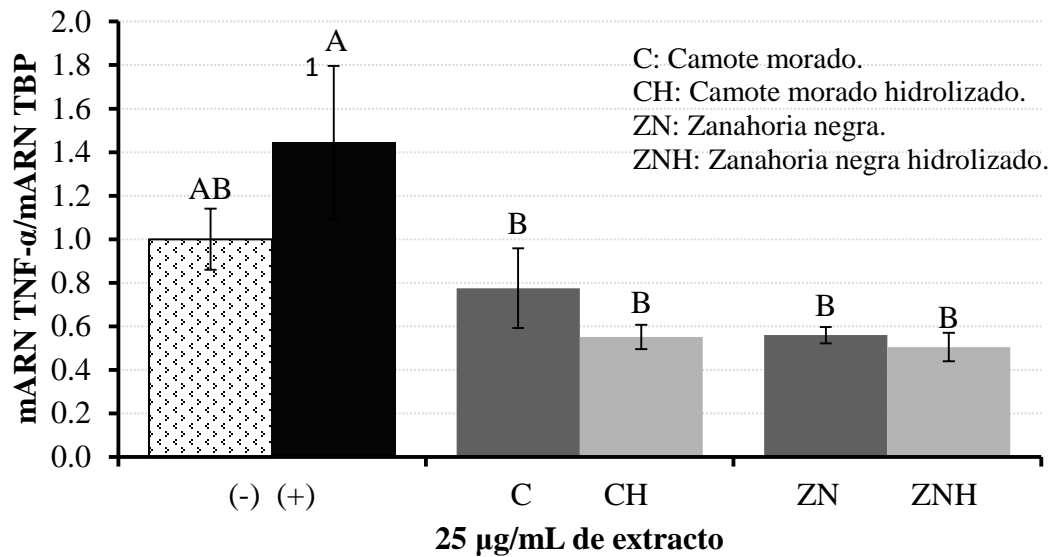


Figura 9. Efecto de diferentes tratamientos en células del miofibroblasto CCD-18Co. En la expresión del primer TNF- α .
 (-) Control negativo: crecimiento de células no inflamadas con TNF- α (10 ng/ml).
 (+) Control positivo: crecimiento de células inflamadas con TNF- α (10 ng/ml) ausencia de extractos.
 H: Extractos hidrolizados.
 1: Diferentes letras indican diferencias entre tratamientos ($P < 0.05$).

4. CONCLUSIONES

- Las antocianinas presentes en los extractos fueron cianidina y peonidina unida a diferentes azúcares y ácidos fenólicos.
- Se encontró aspectos positivos de los extractos y concentraciones utilizadas en el crecimiento de células del miofibroblasto del intestino CCD-18Co, ya que presentaron un crecimiento normal independientemente de los extractos.
- En general los extractos utilizados en este estudio disminuyeron la expresión de los genes TNF- α , IL-6, IL-1 β , NF- κ B, (25 μ g/mL) en células del miofibroblasto del intestino (CCD-18Co).
- Extractos hidrolizados de zanahoria negra y camote morado mostraron una mayor reducción en inflamación en especies reactivas a oxígeno. La mayor reducción en inflamación en extractos hidrolizados de zanahoria negra fue a concentración de 25 μ g/mL y en extractos de camote morado hidrolizado fue independiente a la concentración usada.
- Extractos hidrolizados y no hidrolizados en general mostraron beneficios similares, importantes para la industria de alimentos debido a su uso en bebidas y en productos en general.

5. RECOMENDACIONES

- Cuantificar la capacidad antioxidante de los extractos.
- Evaluar la expresión de otros genes como iNOS y COX-2 en células CCD-18Co.
- Evaluar los extractos en células HT-29 células cancerígenas, con las cuales se podría hacer una comparación en tanto a la capacidad antiinflamatoria.
- Evaluar el efecto de los extractos de camote morado y zanahoria negra en estudio *in vivo*.

6. LITERATURA CITADA

Aggarwal, B., S. Shishodia, S. Sandur, M. Pandey y G. Sethi. 2006. Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochemical Pharmacology* 2006, 72, 1605-1621.

Andersen, M. y M. Jordheim. 2008. Anthocyanins-food applications. Presented at Proc. 5th International Congress. Pigments foods: for quality and health, helsinki, final.

Arbizu, S. 2013. Antiinflammatory and cytotoxic activities of mango (*mangifera indica L.* var. *keit*) polyphenols in cancer and non-cancer breast fibroblast *in vitro*.

Armijos, A., J. Cardona, F. Bueso y S. Mertens-Talcott. 2013. Actividades antiinflamatorias del nopal y la tuna en el crecimiento de células endoteliales (HUVEC). Tegucigalpa, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano.

Arscott S. y S. Tanumihardjo. 2010. Carrots of many colors provide basic nutrition and bioavailable phytochemicals acting as a functional food. *Compr Rev Food Sci. F* 9:223-239.

Balkwill, F. y A. Mantovani. 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow? *The Lancet* 2001, 357, 539-545.

Chen, G. y D. Goeddel. 2002. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science Signaling* 2002, 296, 1634-1635.

Cipriano, P., L. Ekici, R. Barnes, S. Talcott y S. Mertens-Talcott. 2024. Pre-heating and PPO inhibition impacts recovery of anthocyanins and phenolic acids from purple sweet potatoes. Por publicar.

Dillard, C. y J. German. 2000. Phytochemicals: nutraceuticals and human health. *J. Sci. Food Agric.*, 80: 1744–1756.

Eder R. 2000. Pigments. In *food analysis by HPLC*, ed. LML Nollet, Monticello, NY: Marcel. Dekker. 845–80p.

Garrido Gutiérrez, M., R. Ramos Payán, E. Reyes Maldonado y I.C.E. Estrada García. s.f. Aislamiento de ARN de alta calidad a partir de células en cultivo en suspensión de café (*Coffea arabica L.*).

Glasauer, A. y N. Chandel. s.f. ROS: reactive oxygen of species. Quick guide. Department of Medicine, Division of pulmonary and Critical Care Medicine, Department of Cell and Molecular Biology, Northwestern University Feinberg School of Medicine, Chicago, IL 60611, USA. *Current Biology* Vol. 23 No. 3 R100.

- Gould, K., K. Davis y C. Winefield. 2009. Anthocyanins: biosynthesis functions and applications. Springer Sciences + Business Media, LLC. New York, New York, USA. 110-120p.
- Harborne J. 1998. Phenolic compounds. In phytochemical methods-a guide to modern techniques of plant analysis. New York: Chapman & Hall. 3rd ed. 66–74p.
- Harborne, J., H. Baxter y G. Moss. 1999. Phytochemical dictionary: Handbook of bioactive compounds from plants 2nd ed. London: Taylor and Francis.
- He, J. y M. Giusti. 2010. Anthocyanins natural colorants with health promoting properties. The Annual Review of Food Science and Technology. Vol1. 163-187p.
- Iorio, M., M. Ferracin, C. Liu, A. Veronese, R. Spizzo, S. Sabbioni, M. Magri, E. Pedriali, M. Fabbri, M. Campiglio, S. Ménard, J. Palazzo, A. Rosenberg, P. Musiani, S. Volinia, I. Nenci, G. Calin, P. Querzoli, M. Negrini y C. Croce. 2005. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. American Association for Cancer Reserch. 65: (16).
- Iversen, C. K. 1999. Black currant nectar: effect of processing and storage on anthocyanin and ascorbic acid content. Journal of Food Science, 64, 37–41.
- Jaganath, I. B. y A. Crozier. 2011. Flavonoid biosynthesis. plant metabolism and biotechnology, First Edition. Edited by Hiroshi Ashihara, Alan Crozier, and Atsushi Komamine. Published by John Wiley & Sons, Ltd. ISBN: 978-0-470-74703-2
- Kammerer, D., R. Carte y A. Shieber. 2003. Detection of peonidin and pelargonidin glycosides in black carrot (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef) by high performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrum 17:2407-2412.
- Kammerer, D., R. Carle y A. Schieber. 2004. Quantification of anthocyanins in black carrot extracts (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) and evaluation of their color properties. Eur Food Res Technol 219:479-486. Springer-Verlag.
- Kano, M., T. Takayanagi, K. Harada, K. Makino y F. Ishikawa 2005. Antioxidative activity of anthocyanins from purple sweet potato, *Ipomoera batatas* cultivar ayamurasaki, JSBA, Biosci. Biotechnol. Biochem, 69-73p.
- Kaplan M., E. Mutlu, M. Benson, J. Fields, A. Banan y A. Keshavarzian. 2007. Use of herbal preparations in the treatments of antioxidant- mediated inflammatory disorders. Complementary Therapies in Medicine 15 (3): 207-216.
- Kirca, A., M. Ozkan y B. Cemeroglu. 2006. Stability of black carrot anthocyanins in various fruit juices and nectars. Food Chem 97:598-605.
- Konczak, I., N. Terahara, M. Yoshimoto, M. Nakatani y O. Yamakawa. 2005. Regulating the composition of anthocyanins and phenolic acids in a sweetpotato cell culture towards production of polyphenolic complex with enhanced physiological activity. Trends in Food Science & Technology, 16, 377–388.

- Kotecha, P., B. Desai y D. Madhavi. 1998. Chapter 5: Carrot, hand book of vegetable science and technology: production composition storage and processing. Edited by Salunkhe, D. K., S. Kadan, M. Dekker, Inc. New York Editorial. Mahatma Phule Agricultural University, Rahuri, India, University of Illinois, Urbana, Illinois.
- Kong, J. M., L. Chia, S., N. K. Goh, T. F. Chia y R. Brouillard. 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64, 923–933.
- Kusano, S. y H. Abe. 2000. Anti-diabetic activity of white skinned sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) in obese Zucker fatty rats. *Biol. Pharm. Bull.* 23 Vol1. 23–26p.
- Li, H., Z. Deng, H. Zhu, C. Hu, R. Liu, J. Young y R. Tsao. 2012. Highly pigmented vegetables: Anthocyanin compositions and their role in antioxidant activities. Elsevier. *Food Research International* 46: 250–259.
- Lim, S. 2012. Anthocyanin-enriched purple sweet potato for colon cancer prevention. Department of human nutrition, College of human ecology, Manhattan, Kansas, Kansas State University.
- Lu, L. Z., Y. Z. Zhou, Y. Q. Zhang, Y. L. Ma, L. X. Zhou, L. Li, Z. Z. Zhou y T. Z. He. 2010. Anthocyanin extracts from purple sweet potato by means of microwave baking and acidified electrolysed water and their antioxidation *in vitro*. *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 1378-1385.
- Metzger, B., D. Barnes y J. Reed. 2008. Purple carrot (*Daucus carota* L.) polyacetylenes decrease lipopolysaccharide induced expression of inflammatory proteins in macrophage and endothelial cells. *J Agric Food Chem* 56:3554–3560.
- Miyazaki, K., K. Makino, E. Iwadate, Y. Deguchi y F. Ishikawa. 2008. Anthocyanins from purple sweet potato *Ipomoea batatas* cultivar ayamurasaki suppress the development of atherosclerotic lesions and both enhancements of oxidative stress and soluble vascular cell adhesion molecule-1 in apolipoprotein e-deficient mice. *J. Agric. Food Chem.* 56:11485–11492.
- Netzel, M., G. Netzel, D. R. Kammerer, A. Schieber, R. Carte, L. Simons, I. Bitsch, R. Bitsch y I. Konczak. 2007. Cancer cell antiproliferation activity and metabolism of black carrot anthocyanins. *Innov Food Sci Emer* 8:365-372.
- Noratto, G. D., Y. Kim, S. Talcott y S. Mertens-Talcott. 2011. Flavonol-rich fractions of yaupon holly leaves (*Ilex vomitoria*, Aquifoliaceae) induce microRNA-146a and have anti-inflammatory and chemopreventive effects in intestinal myofibroblast CCD-18Co Cells. Elsevier, fitoterapia. College Station, Texas, USA. 557-569p.
- Padmaja, G. 2009. Chapter 11: Uses and nutritional data of sweet potato. The sweetpotato. Central Tuber Crops Research Institute, Thiruvananthapuram, Kerala, India. Springer Science + Business Media, New York, USA. 216-218p.
- Roman-Blas, J.A. y S.M. Jiménez. 2006. Review: NF- κ B as a potential therapeutic target in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 14: 839-848.

Sevimli-Gur, C., B. CetinAkay, S. Gulce-Iz y O. Yesil-Celiktas. 2013. Extracts from black carrot tissue culture as a potent anticancer agents. Springer Science + Business Media, New York, USA, Plant Foods Human Nutrition. Vol 68. 293-298p.

Sun T., P. W. Simon y S. Tanumihardjo. 2009. Antioxidant phytochemicals and antioxidant capacity of biofortified carrots (*Daucus carota L.*) of various colors. J Agric Food Chem 57:4142-4147.

Tamm, I. s.f. IL-6: Current research and new questions. virology laboratory. The Rockefeller University. New York, New York 10021.

Terahara, N., I. Konczak, H. Ono, M. Yoshimoto y O. Yamakawa. 2004. Characterization of acylated anthocyanins in callus induced from storage root of purple-fleshed sweet potato, *Ipomoea batatas L.* Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2004:5 279–286. PII. S1110724304406056.

Vargas S. y M. A. 2009. El Factor de Necrosis Tumoral (TNF- α) en la patogénesis de la artritis reumatoide y el riesgo de tuberculosis con infliximab (un agente anti TNF- α). Revista médica de Costa Rica y Centro América 67 (590): 345-351.

Villanueva, M. R. 1977. New outlook in nutrition: Purple sweet potato. VISCA review-Visayas State College of Agriculture, 5-7p.

Waris, G. y H. Ahsan. 2007. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. Journal of Carcinogenesis 5- 14p.

Ye, J., X. Meng, C. Yan y C. Wang. 2009. Effect of purple sweet potato anthocyanins on b-amyloid-mediated pc-12 cells death by inhibition of oxidative stress. Neurochem Res (2010) 35:357–365.

Ylonen, K., G. Alfthan y L. Groop. 2003. Dietary intakes and plasma concentrations of carotenoids and tocopherols in relation to glucose metabolism in subjects at high risk of type 2 diabetes: the Botnia Dietary Study. Am. J. Clin. Nut. 77 Vol 6. 1434–1441p.

7. ANEXOS

Anexo 1. Abreviaturas.

cADN: ADN complementario.

COX-2: Ciclooxygenasa.

MMP-9: matrix metaloproteinase.

C: Extracto de camote morado

CH: Extracto de camote morado hidrolizado.

ZN: Extracto de zanahoria negra.

ZNH: Extracto de zanahoria negra hidrolizada.

FBS: Suero Bovino Fetal.

PBS: Buffer Fosfato Salino.

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Presión.

CCD-18Co: Células Endoteliales de la Vena del Condón Umbilical

iNOS: Óxido nítrico sintetasa inducible.

TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral alfa.

mARN: Ácido Ribonucleico mensajero.

microARN: ARN no codificado

NF- κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.

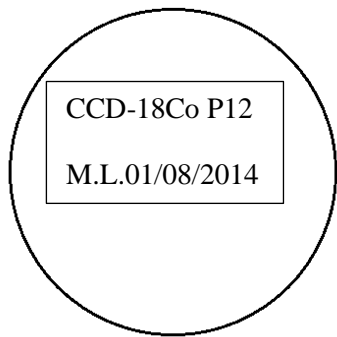
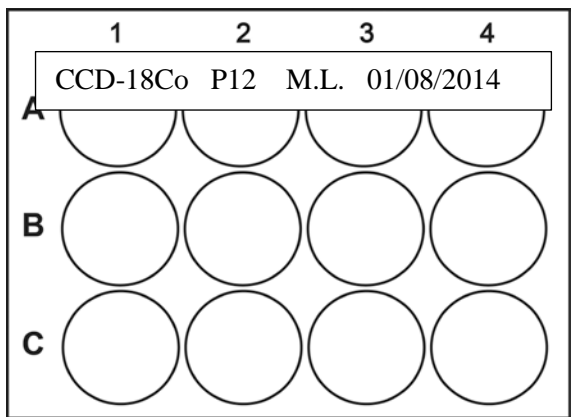
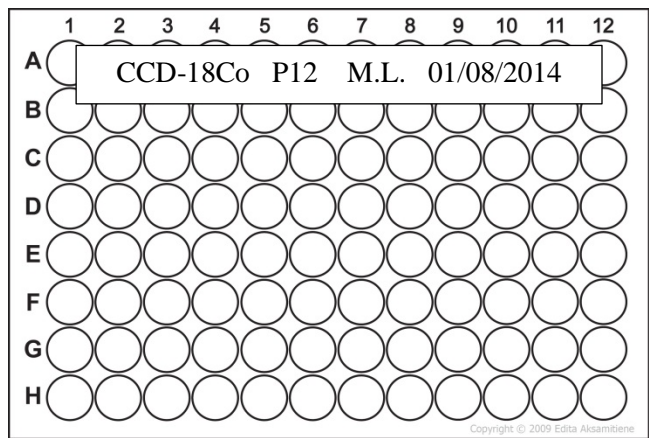
RT-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real.

TBP: proteína de Unión TATA

β - actin: Beta actina.

Anexo 2. Etiquetado de los platos utilizados en los ensayos realizados.

1. Línea celular con el número de pasaje.
2. Fecha.
3. Iniciales del que realiza el ensayo.



Anexo 3. Ejemplo de cálculos para los tres ensayos realizados.

Conteo celular

1.- 870

2.- 900

$$870 + 900 = 1770/2 = 885.$$

$$\frac{885 \times 402}{1000} = 355.77$$

$$100,000/355.77 = 281.08 \mu\text{L}.$$

$$\text{Células: } 281.08 \times 20 = 5621.60 = 5.56 \text{ mL (suspensión celular)}$$

$$\text{Total: } 1000 \times 26 = 26000 = 26 \text{ mL}.$$

20.37 mL (**medio**)

402= Factor de dilución.

Anexo 4. Cálculo de la dilución de los extractos.

Concentración de los extractos de camote morado, zanahoria y extractos hidrolizados
5,000 ppm.

$$10 \text{ ppm} = 5,000 \text{ ppm} \times X = 10 \text{ ppm} \times 1 \text{ mL}$$

$$X = 2 \mu\text{L de extracto. Medio} = 1 \text{ mL}.$$

$$25 \text{ ppm} = 5,000 \text{ ppm} \times X = 25 \text{ ppm} \times 1 \text{ mL}$$

$$X = 5 \mu\text{L de extracto. Medio} = 1 \text{ mL}.$$

$$50 \text{ ppm} = 5,000 \text{ ppm} \times X = 50 \text{ ppm} \times 1 \text{ mL}$$

$$X = 10 \mu\text{L de extracto. Medio} = 1 \text{ mL}.$$

Anexo 5. Cálculo para inducción de inflamación (TNF- α + extracto + medio)

ROS, microARN (usar solo concentración de 25 ppm)

TNF α (1 ng) 1 μL de TNF α por 2 ml de medio

17 μL de TNF- α en 8.5 mL de medio.

$$10 \text{ ppm} = 5,000 \text{ ppm} \times X = 10 \text{ ppm} \times 1.7 \text{ mL}$$

$$X = 3.4 \mu\text{L de extracto. Medio} + \text{TNF-}\alpha = 1.7 \text{ mL}.$$

$$25 \text{ ppm} = 5,000 \text{ ppm} \times X = 25 \text{ ppm} \times 1.7 \text{ mL}$$

$$X = 8.5 \mu\text{L de extracto. Medio} + \text{TNF-}\alpha = 1.7 \text{ mL}.$$

$$50 \text{ ppm} = 5,000 \text{ ppm} \times X = 50 \text{ ppm} \times 1.7 \text{ mL}$$

$$X = 17 \mu\text{L de extracto Medio} + \text{TNF-}\alpha = 1.7 \text{ mL}.$$

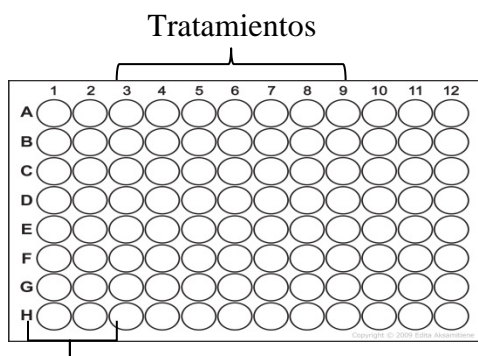
Control - = 1.7 me medio para células CCD-18Co.

Control + = 1.7 medio + TNF- α 27 μL

Anexo 6. Ejemplos de ensayos realizados.

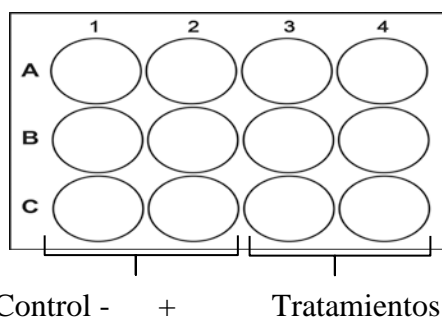
Proliferación celular y Especies reactivas a oxígeno.

*proliferación uso dos controles negativos.



*Controles - +

Extracción de ARN.



Anexo 7. Mezcla maestra I y II para cADN.

Solución	1 muestra	20 muestras
Mezcla I		
50 μ M oligo dT	1 μ L	20 μ L
dNTP	1 μ L	20 μ L
Mezcla II		
RT buffer	2 μ L	40 μ L
MgCL2	2 μ L	40 μ L
DTT	2 μ L	40 μ L
Rnase out	1 μ L	20 μ L
Super script IV	0.8 μ L	16 μ L

Anexo 8. Composición de los primers o cebadores utilizados en el ensayo de PCR.

10 μ L Forward
10 μ L Reverse
180 μ L de agua 28

Anexo 9. Mezcla realizada para PCR.

Solución	1 muestra	20 muestras
SYBR Green	10 μ L	200 μ L
Primer o cebador	0.8 μ L	16 μ L
Agua	5.2 μ L	108 μ L

Anexo 10. Cuadros ANDEVA de los ensayos realizados.

Fuente de variación	Pr>F¹
Proliferación celular	
Bloque	0.9998
Extractos	0.8744
Concentraciones	0.9130
Extractos \times concentraciones	0.9998
microARN	
Bloque	<0.0001
IL-1 β	0.0482
IL-6	0.0007
NF- κ B	<0.0001
TNF- α	0.0071
Especies reactivas a oxígeno	
Bloque	0.0158
Extractos de camote morado	0.8113
Concentraciones de camote morado	0.9602
Extractos \times concentraciones de camote morado	0.9998
Bloque	0.0519
Extractos de zanahoria negra	0.0271
Concentraciones de zanahoria negra	0.9173
Extractos \times concentraciones de camote morado	0.7813

¹PR<F= valores menores a 0.05 tienen interacción entre tratamientos.

Anexo 11. Secuencias de primers o cebadores.

TBP: P: 5'-TGC ACA GGA GCC AAG AGT GAA-3'

TBP: A: 5'-CAC ATC ACA GCT CCC CAC CA-3'

IL-6: P: 5'-AGGGCTCTTCGGCAAATGTA-3'

IL-6: A: 5'-GAAGGAATGCCCATTAACAACAA-3'

NF- κ B: P: 5'-TGGGAATGGTGAGGTCACTCT-3'

NF- κ B: A: 5'-TCCTGAACTCCAGCACTCTCTTC-3'

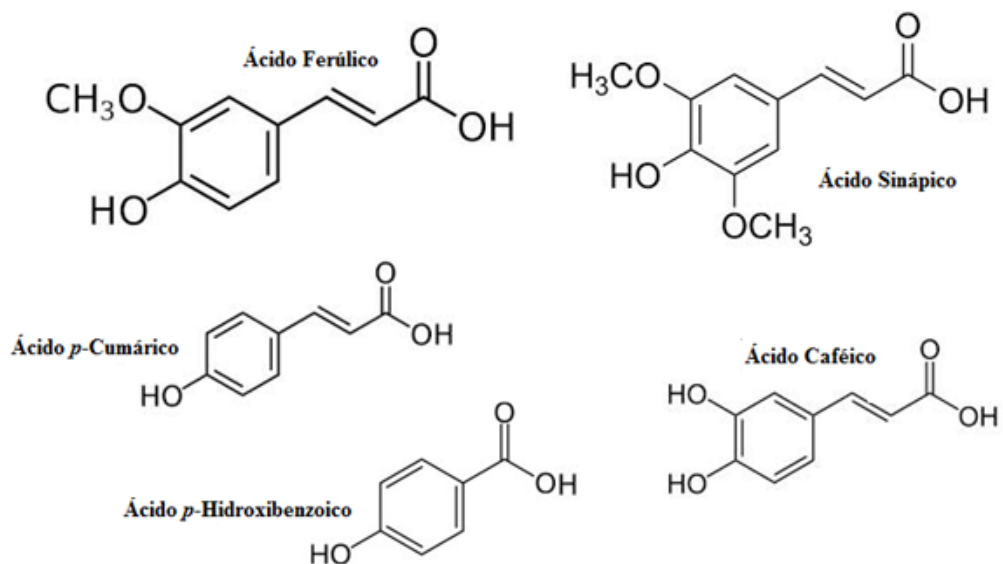
TNF- α : P: 5'-ATCTACCTGGGAGGCGTCTT-3'

TNF- α : A: 5'-GAGTGGCACAAGGAACTGGT-3'

IL-1 β : P: 5'-CTCATCTGGCATTGATCTGG-3'

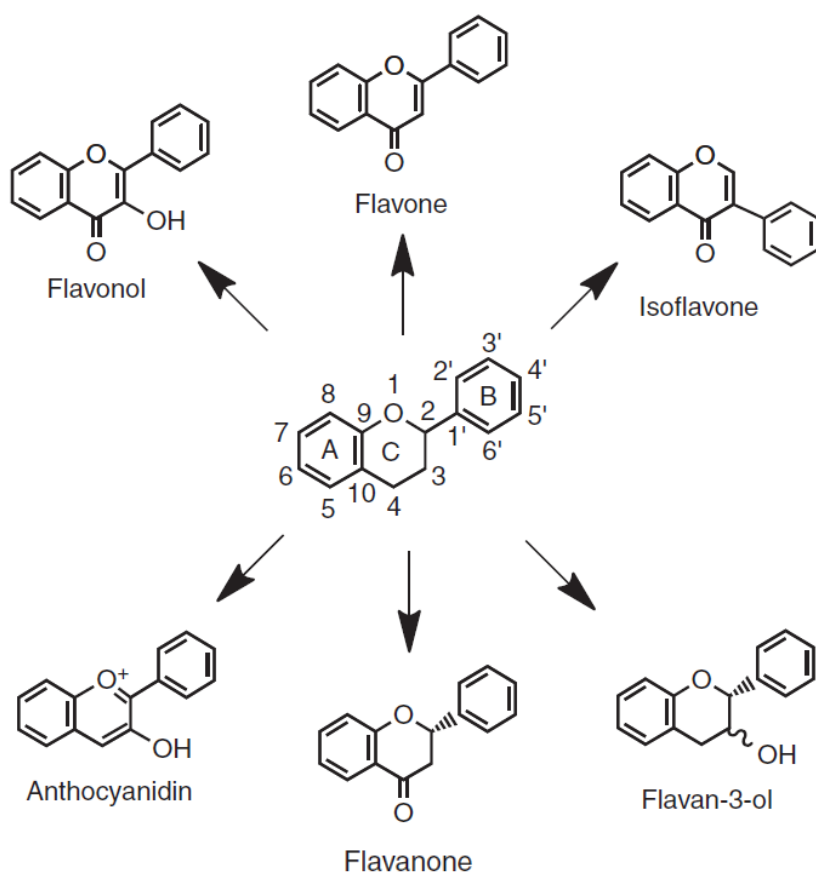
IL-1 β : A: 5'-GGTGCTGTTCTCTGCCTCGA-3'

Anexo 12. Ácidos orgánicos y alifáticos.

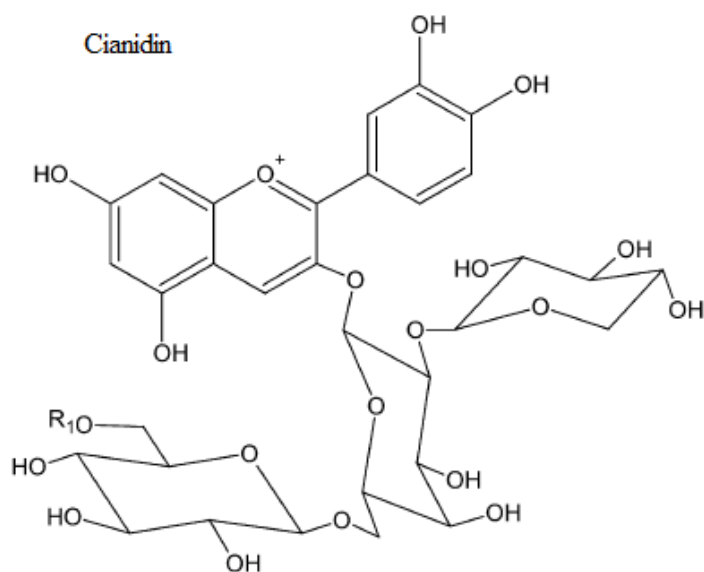


Anexo 13. Esqueleto de los flavonoides.

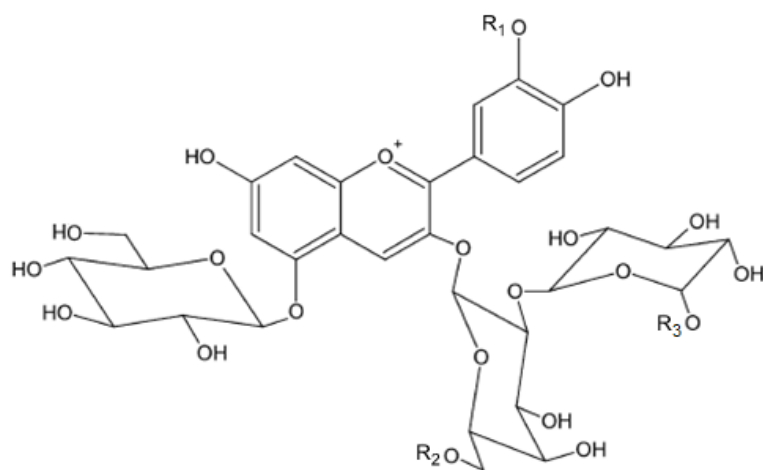
El esqueleto básico de flavonoides comprende 15 átomos de carbono, con dos anillos aromáticos (A y B) conectadas por de tres puente carbonos (C). Se forman Diferentes clases estructurales de los flavonoides C6-C3-C6 debido a diferentes grados de oxidación del anillo A y modificaciones de la central de anillo C. Las principales clases de flavonoides son: flavonoles, flavonas, flavan-3-oles, flavanonas, isoflavones y antocianidinas (Jaganath y Crozier 2011).



Anexo 14. Antocianidinas aciladas en extractos de zanahoria negra y camote morado.



R1
Ácido <i>p</i> -Cumárico
Ácido Ferúlico
Ácido <i>p</i> -Hidroxibenzoico
Ácido Sinápico



Nombre	R1
Cianidina	H
Peonidina	CH ₃

R2 - R3
Ácido <i>p</i> -Cumárico
Ácido Ferúlico
Ácido <i>p</i> -Hidroxibenzoico
Ácido Sinápico
Ácido Caféico