

## **Propiedades Fitoquímicas del Mango que Contribuyen a Beneficios en la Salud.**

### **Reporte Final de la Investigación para el Consejo Nacional del Mango**

November, 2009

Dr. Stephen Talcott y Dr. Susanne Talcott

Texas A&M University, Department of Nutrition and Food Science

1500 Research Parkway A, Centeq Research Plaza, Room 220F

College Station, TX 77843-2253

Traducción: Ing. Daniel Camarena

### **Caracterización por Espectroscopia de Masas y Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) del Mango (*Mangifera Indica L.*) después de una Hidrólisis Enzimática**

#### **Resumen del proyecto:**

Los mangos contienen numerosos compuestos que han demostrado tener propiedades antioxidantes. Estos compuestos, en su mayoría polifenoles, están ligados a una actividad anticancerígena y antiinflamatoria en el cuerpo. Presumiblemente, los mangos contienen una gran cantidad de compuestos de alto peso molecular llamados galotaninos. Estos están compuestos de unidades de ácido gálico unido a glucosa por medio de un enlace glicosídico. Se desconoce si estos compuestos son degradados en moléculas más pequeñas al pasar por el tracto digestivo, o si operaciones de procesamiento de alimentos tales como la adición de galotanino-hidrolasas pudieran ser más efectivas en reducir el tamaño de estas moléculas para incrementar su absorción y potencial bioactividad. Estos estudios comenzarán por entender los cambios químicos que les ocurren a los galotaninos derivados de mangos después de una hidrólisis enzimática y tratarán de inferir los beneficios en la salud humana asociados a su consumo. Los polifenoles en mangos, cv. Ataulfo, fueron extraídos usando una mezcla 1:1:1 de acetona:etanol:metanol, y posteriormente fueron concentrados y clarificados usando un cartucho Sep-Pak C-18 en fase reversa. Los extractos de mango fueron tratados con 20,000 U/ml y 13,000 U/ml de  $\beta$ -glucosidasa con tiempos de 2, 4, 6 y 8 horas en un buffer óptimo de ácido cítrico pH 5.0, y a una temperatura constante de 35°C. Los cambios en los polifenoles del mango después de la hidrólisis enzimática fueron monitoreados usando un espectrómetro de masas con trampa de iones (Thermo Finnigan LCQ Deca XP Max MSn) equipado con una fuente de iones de electrospray (ESI). La  $\beta$ -glucosidasa demostró ser efectiva en la hidrólisis de algunos galotaninos, pero fue incapaz de hidrolizar todos los galotaninos en ácido gálico libre. Esto fue ilustrado por la observación de un incremento en penta, heza, hepta-O- y un decremento subsecuente en compuestos de alto peso

molecular. Las limitaciones para una hidrólisis completa pueden ser explicadas por la incapacidad de la  $\beta$ -glucosidasa para romper los enlaces glicosídicos debido a las restricciones esteéricas creadas por tener hasta cinco moléculas de ácido gálico unidas a la glucosa, o por la inhabilidad de la enzima para romper enlaces tipo “m-dipside” (enlace tipo ester) entre dos o más grupos galoil. La incubación de extracto de mango ya sea con 20,000 U/ml o 10,00 U/ml resultó en un incremento de ácido gálico libre equivalente a ocho veces el original. La concentración de la enzima no fue un factor limitante en la reacción hidrolítica. Además, el tiempo de reacción no tuvo un papel significativo en la velocidad de hidrólisis, ya que la cantidad de ácido gálico libre permaneció relativamente constante de las 2 a las 8 hrs. Estos hallazgos indican que fue posible incrementar especies de galotaninos de bajo peso molecular después de la hidrólisis enzimática y ayudará en futuros estudios a entender la digestión y biodisponibilidad de los fenólicos del mango.

## **Introducción**

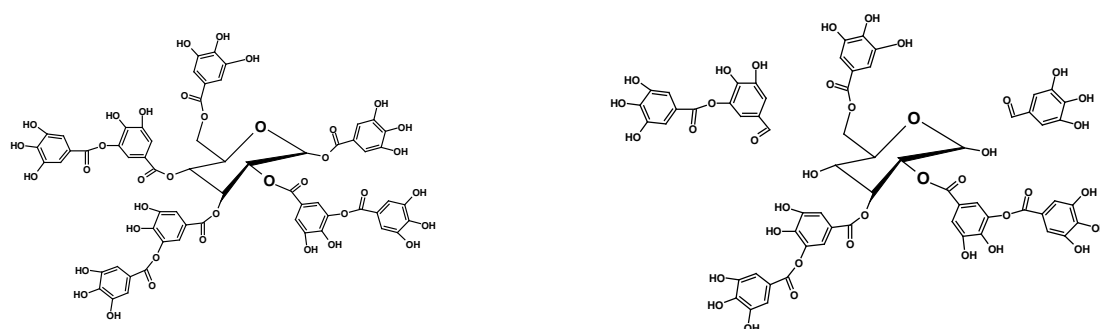
El mango (*Mangifera indica* L.) es una fruta tropical popular debido a su sabor único, precio accesible y cualidades nutrimentales. El mango es miembro de la familia Anacardiaceae y crece predominantemente en climas cálidos tropicales y subtropicales tales como Asia, África y América. Existen alrededor de mil diferentes cultivos de mangos alrededor del mundo y esta fruta esta considerada una de las mas consumidas en el mundo. El mango es conocido por ser una excelente fuente de vitaminas tales como ácido ascórbico, tiamina, riboflavina, niacina y beta-caroteno. Y no solo son ricos en estos nutrientes, sino que además tienen altos contenidos de otros fitoquímicos que no son nutrientes. Recientemente se ha puesto mucha atención en los fitoquímicos y sus distintivas propiedades antiinflamatorias y anticancerígenas, relacionadas al consumo de frutas y vegetales. Existe una necesidad por identificar químicamente a los productos hidrolíticos derivados de los polifenoles del mango, en un esfuerzo por relacionar eventualmente a estos compuestos con la absorción después del consumo humano.

## **Fitoquímicos del Mango**

Los mangos contienen una gran cantidad de galotaninos de alto peso molecular que varían en tamaño desde 332 uma (mono-*O*-galloglucosa) hasta más de 1,852 uma (undeca-*O*-galloglucosa), y posiblemente más grandes (Figura 1). Los galotaninos están compuestos de unidades de ácido gálico unidas a una molécula de glucosa por medio de un enlace glicosídico o a través de un enlace “m-dipside” entre grupos galoil. Una revisión de la literatura muestra que un compuesto proveniente de la granada (punicalagin), con un peso molecular de 1,084, ha sido la molécula biológica más grande en

absorberse intacta usando un modelo de rata ello. Las pequeñas células epiteliales del intestino contienen a la enzima  $\beta$ -glucosidasa, con la capacidad de hidrolizar galotaninos en vivo. Se desconoce si los galotaninos del mango son hidrolizados en moléculas más pequeñas a través de su curso en la digestión humana, o si las operaciones de procesamiento de alimentos como la adición de hidrolasas activas contra taninos pudieran ser una forma efectiva en reducir el tamaño de estas moléculas para incrementar su potencial de absorción. Este estudio inicial empezará con el proceso de entender los cambios químicos que ocurren a los galotaninos del mango, al tratar de caracterizar los productos finales de la hidrólisis y así proponer inferencias relacionadas a la salud humana.

**Figura 1. Galotanino típico y productos de la hidrólisis de enzimas activas contra taninos.**



Se ha llevado a cabo investigación para cuantificar y caracterizar compuestos del hueso, cáscara y hojas del mango (Barreto y otros 2008; Berardini y otros 2004). Sin embargo, la pulpa del mango ha demostrado ser un poco más difícil de estudiar. Estudios se están realizando para tratar de identificar compuestos con características ambiguas en la pulpa. Los reportes sugieren que el contenido fitoquímico de la pulpa del mango consiste en ácido gálico, mangiferina, glicósidos de quercetina y muchos taninos hidrolizables que han sido identificados pero no caracterizados (Schieber y otros 2000).

Otros compuestos encontrados en menor concentración son el ácido *p*-OH-benzoico, ácido *m*-cumárico, ácido *p*-cumárico y el ácido ferúlico (Kim y otros 2007). En la mayoría de las variedades del mango, el ácido gálico libre (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico), es el compuesto presente más predominante y ha demostrado poseer una alta capacidad antioxidante con numerosas implicaciones para la salud humana (Shahrzad y Bitsch 1998). Las unidades de ácido gálico poseen tres grupos hidroxilos y un grupo ácido que le permiten unirse con otra molécula de ácido gálico para formar un ester: ácido digálico (Masibo y He 2008). El ácido gálico es un componente esencial de un grupo de compuestos presentes en la pulpa del mango llamados galotaninos.

## **Taninos**

Los taninos son, en general, fenólicos solubles en agua considerados como metabolitos secundarios que varían en tamaño desde las 300 hasta las 3000 uma (unidades de masa atómica), y están clasificados en cuatro grupos diferentes basados en su similitud estructural. Estos grupos son: galotaninos, elagitaninos, taninos complejos y taninos condensados (Mingshu y otros 2006). Los taninos son conocidos por su habilidad de ligar proteínas y formar complejos solubles o insolubles (Hangerman y otros 1989). Los galotaninos son la principal clase de taninos identificados en la pulpa del mango y varían en tamaño de los 787 hasta los 1243 uma (Berardini y otros 2004). Los galotaninos están compuestos de azúcar, principalmente glucosa, rodeada de varias unidades de ácido gálico que pueden además estar unidas a otras unidades de ácido gálico por medio de enlaces “m-dipside” (Mueller-Harvey 2001). La investigación ha sugerido que entre más grande es un compuesto polifenólico, menor es la probabilidad de que este sea absorbido y se encuentre biodisponible. Por lo tanto, una importante área de investigación es el entender los productos de la hidrólisis de los galotaninos para así entender el proceso de absorción y la bioactividad del mango en su totalidad.

### ***Enzimas activas contra los taninos***

Solamente si primero se evalúan las técnicas de hidrólisis enzimática y se entiende como estos procesos están relacionados al tamaño y la composición química de las moléculas resultantes se podrá después hacer una evaluación de las moléculas de bajo peso molecular y los potenciales beneficios en salud humana del mango. Se sabe que ciertas bacterias, hongos y levaduras producen enzimas capaces de romper a los galotaninos (Mingshu y otros 2006). Las  $\beta$ -glucosidasas también se pueden encontrar en las células epiteliales del intestino delgado, donde se piensa que las moléculas ligadas al azúcar se hidrolizan en unidades más pequeñas que son subsecuentemente absorbidas por éstas células (Nemeth and others 2003). Tanto la  $\beta$ -glucosidasa como la taninoasa se ha usado para la hidrólisis de taninos, pero se requieren más estudios en esta área para poder determinar la enzima más efectiva, o si una combinación de estas dos podría ser más efectiva (Kikuzaki and others 2000). Por tanto se hipotetiza que la hidrólisis de los galotaninos por la adición de  $\beta$ -glucosidasa incrementará la concentración ácido gálico libre, así como la de los polifenoles de bajo peso molecular y podrá potencialmente mejorar la biodisponibilidad de los polifenoles del mango. Cuantificar y caracterizar los galotaninos y los productos secundarios de la hidrólisis ayudará en el futuro a mejorar las técnicas de procesamiento industrial de alimentos y por tanto, ayudara a aprovechar de mejor manera un alimento nutricionalmente denso como lo es el mango.

## **Materiales y Métodos**

### *Extracción de polifenoles*

Para extraer los polifenoles de la pulpa de mango, 200 gr de pulpa de mango se colocaron en un recipiente con 600 ml de una solución 1:1:1 acetona, metanol y etanol (v/v/v). El extracto se filtro inicialmente con una tela para remover las partículas grandes y posteriormente fue filtrado en tierra de diatomeas. Este proceso se repitió dos veces, usando la pulpa restante en la tela y las extracciones se repitieron con 400 y 200 mL, consecutivamente. Los solventes de la extracción se retiraron y evaporaron bajo presión reducida a <45°C usando un rotavapor. Se agregó metanol al extracto y el mismo fue centrifugado par precipitar la pectina. El sobrenadante fue recolectado, el precipitado se volvió a extraer, y el metanol volvió a ser evaporado a baja presión a <45°C. El extracto de mango se lavó usando una columna C18 (Waters Sep-Pak® Vac 35cc 10g C18) para remover azúcares, pectina soluble residual y para concentrar los fenólicos. Los compuestos fenólicos en conjunto fueron fraccionados usando primero metanol al 25% y luego metanol al 100% para separar aquellos de bajo peso molecular de los de alto peso molecular, basándose en su afinidad a C18. Cada extracto fue llevado a un volumen total de 100 mL en una solución buffer de pH 5.0.

### **Hidrólisis enzimática**

La enzima  $\beta$ -glucosidasa se compró con MP Biomedicals y fue almacenada a -20°C. Una solución enzimática fue preparada inmediatamente antes de la incubación en buffer pH 5.0 con una concentración de 13,000 U/mL y 20,000 U/ml. Una unidad (U) de  $\beta$ -glucosidasa es aquella que libera 1.0  $\mu$ mol de glucosa por minuto a 35°C. Las fracciones de mango Ataulfo (stock, L.M.W., H.M.W) en un volumen de 2.0 mL fueron tratadas con 200 uL de la solución enzimática de  $\beta$ -glucosidasa. Las muestras se incubaron a 35°C siguiendo la cinética, tomando muestras a los 30 min, 1,2 y 4 hrs. Después de la incubación, las muestras fueron acidificadas a un pH de 3.0 para inactivar a la  $\beta$ -glucosidasa.

### **Análisis Químico**

Los cambios en los polifenoles del mango después de la hidrólisis enzimática fueron monitoreados usando un espectrómetro de masas con trampa de iones (Thermo Finnigan LCQ Deca XP Max MS $n$ ) equipado con una fuente de iones de electrospray (ThermoFisher, San Jose, CA). La separación de los compuestos se completó con una columna Dionex (Sunnydale, CA) Acclaim® 120 A, (4.6 X 250 mm; 5 $\mu$ M). La fase móvil estuvo compuesta por ácido fórmico al 0.5% en agua (solvente A) y ácido fórmico al 0.5% en acetonitrilo (solvente B) a un flujo de 0.4 mL/min. Las fases móviles fueron

corridas con un gradiente programado, empezando con 100% A por cinco minutos. El solvente B cambió de 0 a 30% en 25 minutos, a 50% en 15 minutos, a 100% en 25 minutos, y de regreso a 0% en 2 minutos. El gradiente terminó con 100% A por 8 minutos.

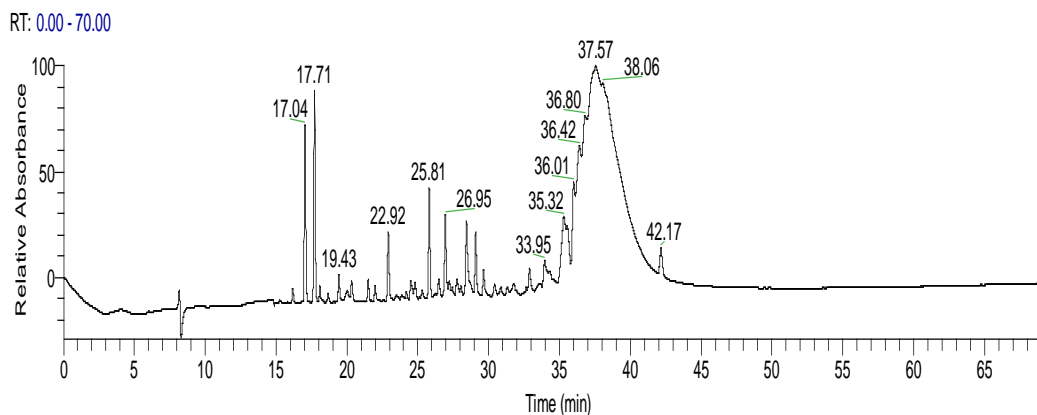
## Resultados y Discusión

Varios compuestos de los extractos de mango fueron específicamente identificados y caracterizados por espectroscopia de masas acopada a ESI (ionización en electrospray) en modo negativo. Por ejemplo, el ácido gálico libre fue identificado en base a su peso molecular, patrón de fragmentación y patrón espectral, y comparado contra un estándar auténtico. Un ión de  $m/z$  169 fue el más abundante y la  $MS^2$  mostró un patrón de fragmentación con un ión predominante a 125  $m/z$ . Este patrón es típico de los derivados de ácido benzoico (Barreto y otros 2008). La mono-galoiil glucosa mostró un ión predominante con  $m/z$  331 y una pérdida de 162 uma en el escaneo de  $MS^2$ . La pérdida de 162 correspondió a la pérdida de una molécula de glucosa menos una molécula de agua. El ion predominante en  $MS^2$  fue 169, el ión molecular del ácido gálico libre. La mangiferina ( $m/z$  421) fue confirmada por su patrón de  $MS^2$  a  $m/z$  301, 331, y 403 como lo reportado por Shieber y otros (2003). Para compuestos de mayor peso molecular tales como la pentagaloiil glucosa, un ion similar de  $m/z$  938 fue encontrado al realizar fragmentación adicional para producir iones de  $m/z$  787 que correspondieron a la tetragaloiil glucosa. A un  $m/z$  de 1242, heptagaloiil glucosa creó fragmentos de  $m/z$  1089, 939, y 787 correspondientes a fragmentos de hexagaloiil glucosa, pentagaloiil glucosa, y tetragaloiil glucosa. Estos fragmentos, creados al inducir colisiones al compuesto padre, fueron de alguna manera análogos a los efectos de las enzimas hidrolíticas (i.e.  $\beta$ -glucosidasa), resultando en un indicador de la fuerza o debilidad de los enlaces químicos presentes en los galotaninos.

La enzima  $\beta$ -glucosidasa demostró ser efectiva en la hidrólisis de ciertos galotaninos, pero no fue efectiva en la hidrólisis completa de todos los galotaninos de mango (Figura 2, Tabla 1). Esto fue ilustrado por un incremento en los galotaninos de moderadamente alto peso molecular (i.e. penta, hexa, hepta-*O*-galoglucosa) y un decremento en compuestos de alto peso molecular. Esto puede ser explicado por la inhabilidad de la  $\beta$ -glucosidasa para romper el enlace beta debido a restricciones esteáricas, creadas al haber cinco unidades de ácido gálico unidas a glucosa. Debido a que el ácido gálico puede formar unidades repetidas consigo mismo a través de enlaces “*m*-dipside” (i.e. ácido digálico), se pueden encontrar cadenas más largas de ácido gálico que son resistentes a la hidrólisis con  $\beta$ -glucosidasa. La ruptura de estas cadenas largas de su molécula base de glucosa es posible, no así para el caso de los enlaces “*m*-dipside”. Se hipotetizó que la  $\beta$ -glucosidasa sería efectiva en hidrolizar

las unidades de ácido gálico unidas a glucosa por medio de un enlace glicosídico, por tanto un incremento en ácido gálico sería observado. La incubación de los polifenoles en el extracto de Ataulfo con 13,000 U/mL de  $\beta$ -glucosidasa resultó en un decremento en la cantidad de monogaloil glucosa presente en el extracto del 90%, y un incremento en ácido gálico, mangiferina y penta/heptagaloil glucosa de 88%, 40%, 50% y 42%, respectivamente. El mismo extracto fue tratado con 20,000 U/MI de  $\beta$ -glucosidasa y presentó resultados similares. Este estudio fue crítico para entender los productos hidrolíticos de los galotaninos del mango en el proceso de absorción que ocurre in vivo.

**Figura 2. Cromatograma típico por HPLC de los polifenoles del mango (cv. Ataulfo), antes de la incubación con  $\beta$ -glucosidasa.**



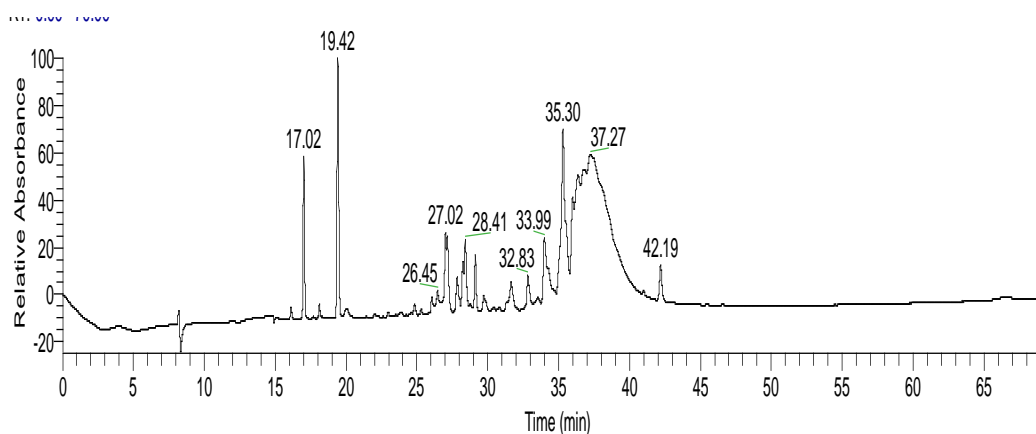
**Tabla 1. Cambio porcentual en los compuestos polifenolicos identificados en el mango después de la hidrolisis enzimática a dos concentraciones diferentes de enzima. Los picos corresponden al cromatograma de la Figura 2 y 3.**

Tiempo de retención	Identidad del compuesto	% de Cambio 13,000 U/mL	% Cambio 20,000 U/mL
17.71	Mono-galloil glucosido	-90	-94
19.43	Ácido gálico	+88	+88
28.44	Mangiferina	+40	+6
32.88	Penta-galloil-glucosido	+50	+35
35.31	Hepta-galloil glucosido	+42	+32

Entre los polifenoles extraídos de la pulpa de mango, el ácido gálico libre estuvo presente en relativamente bajas concentraciones comparado con la cantidad de galotaninos. Mono-galoil glucosa fue considerablemente más abundante que el ácido gálico libre (6 veces más) y representa al compuesto de menor peso molecular presente en el mango. Antes de la hidrólisis enzimática, los picos de galotaninos eran dominantes y representaban varios galotaninos que iban desde 939 a 1,852 uma. El

tamaño de estos compuestos es exageradamente grande para su absorción intestinal, y por tanto se puede predecir que no serán absorbidos en su actual estado sin una hidrólisis durante la digestión. Sin embargo, después de la hidrólisis con  $\beta$ -glucosidasa, estos compuestos fueron alterados significativamente y su tamaño promedio se redujo a un punto donde muchos de estos compuestos pueden ser considerados candidatos para ser absorbidos (Figura 3; Tabla 2). Después de la hidrólisis enzimática, los polifenoles del mango fueron considerablemente afectados con de tal modo que los picos correspondientes a compuestos de alto peso decrecieron para dar lugar a una mayor concentración de polifenoles de bajo peso molecular. Con el resultante incremento en ácido gálico y mono-galoil glucosa, se pensó que estos compuestos son los principales subproductos de la hidrólisis y se presume que en esta forma son mas propensos a ser absorbidos por el intestino. También fueron observados incrementos en los penta-galoil y hepta-galoil glucósidos, pero al parecer esto es debido a una hidrólisis incompleta de galotaninos por la enzima bajo las condiciones evaluadas. También se observó que los galotaninos de mayor peso molecular se unían a la  $\beta$ -glucosidasa reduciendo o eliminando su actividad. Por tanto, se tomó la precaución de usar una solución concentrada o un mayor número de soluciones diluidas para hacer las pruebas de incubación con la enzima.

**Figura 3. Cromatograma típico de HPLC de los polifenoles de pulpa de mango (cv. Ataulfo), después de la incubación con 13,000 U/ml  $\beta$ -glucosidasa.**





**Tabla 2. Los picos corresponden con el cromatograma de la Figura 3.**

<b>Tiempo de retención</b>	<b>Identidad del compuesto</b>
17.02	Mono-galloil glucosido
19.42	Ácido gálico
28.41	Mangiferina
32.82	Penta-galloil-glucosido
35.30	Hepta-galloil glucosido

### **Conclusiones**

La enzima hidrolítica  $\beta$ -glucosidasa demostró ser efectiva en la hidrólisis de algunos galotaninos, pero la reacción hidrolítica no fue lograda por completo. Esto se demostró por un incremento en los galotaninos de mediano peso molecular (penta, hexa, hepta-galotaninos) y un decremento en los compuestos de alto peso molecular. Las limitaciones para la hidrólisis completa pueden ser explicadas por la inhabilidad de la  $\beta$ -glucosidasa para romper los enlaces tipo beta debido a las restricciones esteéricas creadas al haber cinco unidades de ácido gálico unidas a la glucosa. La incubación del extracto de mango con 20,000 U/mL y 13,000 U/mL resultó en un incremento de 8 veces la concentración de ácido gálico. Por tanto, la concentración de la enzima no tuvo un efecto en la hidrólisis de galotaninos cuando la diferencia no era de más de 10,000 U/mL. El efecto del tiempo tampoco fue importante, ya que la cantidad de ácido gálico se mantuvo relativamente estable desde las 2 hasta las 8 hrs. Estos descubrimientos demostraron un incremento en las especies de bajo peso molecular después de la hidrólisis enzimática y ayudaran en futuros estudios a entender el proceso de digestión y biodisponibilidad de los fenólicos del mango.

## **Polifenoles del Mango Inhiben el Crecimiento de Células de Cáncer Humanas In Vitro**

### **Propiedades Anti-cancerígenas del Mango**

**Resumen del proyecto:** Los polifenoles encontrados en cinco diferentes variedades de pulpa de mango incluyen una amplia variedad de galol glucósidos de diferentes pesos moleculares, flavonol glucósidos, ácido gálico libre y mangiferina. La mayoría de estos compuestos mostraron una potencial actividad anticancerígena. El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad anti-proliferativa de los fenólicos del mango en diferentes líneas celulares de cáncer. Las variedades Haden y Ataulfo fueron seleccionadas para pruebas adicionales en base en su contenido de fenólicos y su actividad antioxidante.

Las variedades Haden y Ataulfo fueron seleccionadas para pruebas adicionales en base a su contenido de polifenoles y actividad antioxidante. La capacidad anti-proliferativa y pro-apoptótica de los polifenoles (mg equivalente de ácido gálico (GAE/L) fueron probadas en las siguientes líneas celulares humanas: Molt-4 (leucemia), A-549 cáncer de pulmón, MDA-MB-231 cáncer de mama, LnCap cáncer de próstata, y SW-480 cáncer de colon. Además, se estudio la expresión de genes por medio de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tiempo real y la cinética del ciclo celular por medio de citometría de flujo.

Los polifenoles de las variedades Ataulfo y Haden inhibieron el crecimiento de células de cáncer humanas con un orden de potencia: SW-480 = Molt-4  $\geq$  MDA-MB-231 > A-549  $\geq$  LnCap, como lo determinaron los conteos celulares realizados a las 72 h. A las dosis más altas (5 mg GAE/L), Ataulfo inhibió el crecimiento de las células de cáncer de colon SW-480 en aproximadamente un 72%, sin inhibir el crecimiento de células de miofibroblastos de colon (CCD-18Co) no cancerígenas (su IC<sub>50</sub> fue 8 veces más alto), que fueron usadas como control. Los carotenoides extraídos de Ataulfo también inhibieron el crecimiento de células SW-480, pero a una concentración relativamente más alta. La inhibición del crecimiento ejercida por los polifenoles de Ataulfo y Haden en SW-480 fue asociada a un incremento en la expresión de los genes pro-apoptóticos caspasa-8, Bax y Bim de ~2, 1.3 y 1.7 veces, respectivamente; y en un aumento de los reguladores del ciclo celular p21 y PKMYT1 de ~1.3 y 1.4 veces, respectivamente, en comparación con células no tratadas. Además, los polifenoles de Ataulfo (en una concentración de hasta 10 mg GAE/L) indujeron arresto del ciclo celular en la fase G2/M dentro de 24 hrs y esto fue asociado con un incremento en la expresión de PKMYT1, un gen que ha mostrado regular negativamente la transición del ciclo celular G2/M. La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) inducidas por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue también inhibida por los polifenoles de Ataulfo y Haden en células de cáncer SW-480 y CCD-18Co no-cancerígenas, y el

umbral para la inducción de daño oxidativo fue más bajo en SW-480 demostrando así un efecto protector selectivo para las CCD-18Co. En general, los polifenoles del mango pueden poseer actividad quimiopreventiva con gran potencial de tratar cáncer de colon, ya que ellos llegan por si mismos al colon y están disponibles para actuar sobre las células.

### **Antecedentes e Introducción**

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo provocando aproximadamente 13% de las muertes mundiales en 2004 (1). Entre los tipos de cáncer, el colorectal es el tercero en el índice de muertes provocadas por cáncer en el mundo (2). Aunque las tasas de mortalidad por cáncer colorectal han disminuido en los EUA en las últimas dos décadas, este tipo de cáncer aún es el tercer tipo de cáncer más común tanto en hombres como en mujeres, con un estimado de 108,070 casos de cáncer de colon y 40,740 casos de cáncer rectal diagnosticados en 2008 (3). En general, las estadísticas de mortalidad podrían continuar decreciendo al controlar los principales factores de riesgo asociados al colon de cáncer. Entre estos factores de riesgo, la dieta es un factor modificable que puede incrementar el riesgo de desarrollar cáncer de colon debido a un alto consumo de carne roja y/o procesada, y a una ingesta inadecuada de frutas y vegetales (3). Una dieta rica en fruta y vegetales ha sido asociada a un menor riesgo de desarrollar cáncer (4,5). Esto está sustentado por estudios epidemiológicos que asocian un efecto protector en el consumo de frutas y vegetales con una reducida incidencia de cáncer (6). Específicamente, se ha visto un efecto protector por el consumo de vegetales crudos para el cáncer de colon (7,8). Este hecho ha sido considerado un enfoque adicional para la prevención del cáncer (9) y como terapia, mejorando la efectividad de las terapias convencionales y reduciendo sus efectos secundarios (9). Los polifenoles de las plantas, por su seguridad y el hecho de que no son percibidos como “medicina”, son considerados cada vez más como una fuente de compuestos quimiopreventivos para el cáncer de colon (10). La parte comestible del mango consiste en una mezcla de fitoquímicos incluyendo polifenoles, ácido ascórbico y carotenoides que pueden ayudar a proteger contra el cáncer. Los polifenoles identificados en la parte comestible del mango han sido previamente caracterizados e incluyen flavonoides como la quercetina y glicósidos de kaempferol, ácidos fenólicos (predominantemente ácido gálico), galoil-glicósidos de diferentes grados de polimerización, y mangiferina (11, 12), la cual esta más asociada a la piel del mango. Los galotaninos de bajo peso molecular, sus productos hidrolíticos y otros polifenoles están muy probablemente disponibles para el colon (13-16) y han mostrado proteger en las diferentes etapas de carcinogénesis in vitro (13). El mango también podría ser considerado una buena fuente de carotenoides totales, principalmente violaxantina y  $\beta$ -caroteno (17-19), aunque este contenido puede cambiar entre variedades y el lugar de

origen (20). De cualquier manera, la protección quimiopreventiva ejercida por los carotenoides es menos relevante que aquella ejercida por los polifenoles e incluso es controversial (21-24).

El razonamiento en la explicación de porque los polifenoles del mango pueden ejercer beneficios potenciales en la salud está basado en que un incremento en la ingesta de antioxidantes puede potenciar la capacidad de defensa de las células y modular rutas metabólicas en las células blanco. Como antioxidantes, estos compuestos pueden proteger las células normales contra las especies reactivas de oxígeno (ROS) y las ocurrencias carcinogénicas que ocurren a diario como parte del estilo de vida (25). Una vez que las células pre-neoplásicas han sido formadas, estos compuestos pueden inhibir la progresión de las etapas del cáncer al interferir con la regulación de ciclos celulares, regulación de rutas de transducción de señales (26), transcripción y apoptosis (activación de genes y proteínas pro-apoptóticas) (27, 26). Esto es considerado una forma razonable de prevenir el cáncer y aumentar la expectativa de vida, más que un tratamiento en las etapas finales (28). En este estudio investigamos el potencial anticancerígeno preventivo de los polifenoles extraídos de diferentes variedades de mango. Nuestro objetivo fue identificar la variedad con la mayor capacidad de suprimir el crecimiento de tumores y de apuntar líneas celulares humanas de cáncer. Algunos de los mecanismos moleculares detrás de la actividad anticancerígena también fueron evaluados. Este tipo de investigación es de relevancia para la salud humana con un énfasis en el cáncer de colon.

## **Materiales y Métodos**

### **1. Material vegetal**

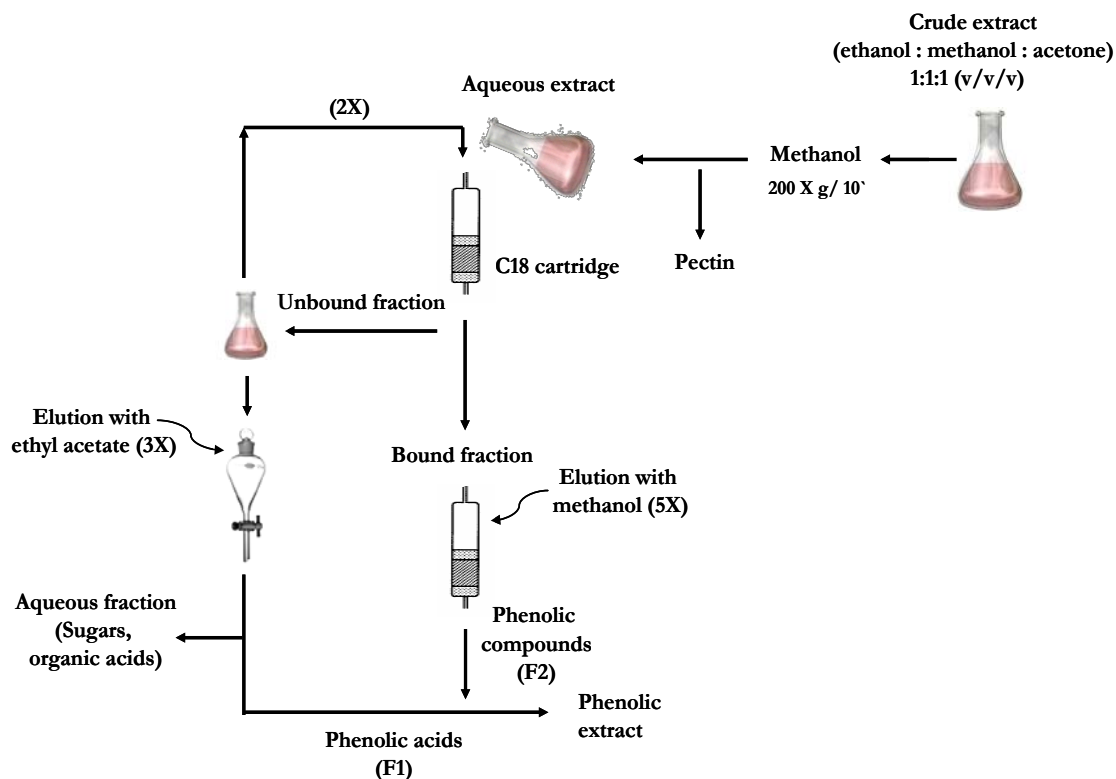
Variedades comerciales de mango (*Mangifera indica* L) fueron amablemente donadas por el Consejo Nacional del Mango, EUA. Las variedades Francis, Kent, Ataulfo, Tommy Atkins y Haden fueron recolectadas en un estado maduro y firme. A su llegada a Texas A&M University, las cajas de fruta fueron abiertas a la atmósfera y se dejaron madurar completamente hasta alcanzar un color amarillo claro y una textura suave (evaluación subjetiva). La piel y semillas fueron removidas manualmente, la pulpa fue homogeneizada y el material fue almacenado congelado a -20°C hasta su posterior análisis.

### **2. Extracción de polifenoles**

Una muestra representativa de 500 g fue descongelada y mezclada con 1.5 L de una solución 1:1:1 (v/v/v) de etanol/metanol/acetona y filtrada con un paño de queso, seguido de una filtración usando un filtro de papel Whatman #1. Los solventes fueron completamente evaporados a 40°C usando un rotavapor (Büchi, Suiza). El extracto acuoso fue mezclado con metanol (1:1) y la pectina fue removida por centrifugación a 2000×g por 10 min a 7°C. El metanol fue evaporado a 40°C y los polifenoles

fueron concentrados con un cartucho de fase reversa C18 (Waters Corporation, Milford, MA) previamente acondicionado con 50 mL de 100% metanol y 50 mL de agua de grado nanopuro. El extracto acuoso fue cargado en el cartucho C18 y fue lavado con 50 ml de agua. Los polifenoles unidos a la matriz fueron eluidos con 50 mL de 100% metanol. El agua del lavado también fue particionada con acetato de etilo para recuperar cualquier polifenol no retenido. La fase de acetato de etilo se combinó con los fenólicos eluidos con 100% metanol, se evaporó y se re-disolvió en agua nanopura a un volumen conocido (Figura 4). La solución fenólico-acuosa fue congelada a  $-80^{\circ}\text{C}$  y se liofilizó (Labconco Corporation, Kansas City, MO) a  $-50^{\circ}\text{C}$  y a 0.01 mBar de presión. Estos extractos fueron posteriormente usados para los ensayos de cultivo celular al aplicar diferentes dosis basadas en el contenido de fenólicos totales, medido espectrofotométricamente por el ensayo de Folin-Ciocalteu (29) contra una curva estándar de ácido gálico (mg/L). Los valores de absorbancia fueron recopilados en un lector de microplatos FLUOstar Omega (BMG Labtech Inc, Durhan, NC) a 726 nm. Todos los extractos de polifenoles fueron previamente redissueltos en medio de cultivo y esterilizados por filtración antes de ser usados en los experimentos de cultivo celular. Los polifenoles también fueron analizados por HPLC, comparando el perfil de los fenólicos de los extractos liofilizados y los redissueltos en medio de cultivo y filtrados por esterilización.

**Figura 4: Extracción de polifenoles**



### 3. Extracción de carotenoides

Los carotenoides totales fueron extraídos con el método reportado por Talcott y Howard, 1999 (30). Brevemente, 5g/25mL fueron extraídos con acetona/etanol (1:1). Después de una filtrarlos en la oscuridad, el volumen se ajustó a 50 mL, y la absorbancia fue medida usando un espectrofotómetro Thermo Electron (Fisher Scientific). Los carotenoides totales (mg/100g de pulpa) fueron calculados usando la ecuación  $(AV \times 10^6)/(A\% \times 1000 G)$ , donde A es la absorbancia a 470 nm, V es el volumen total del extracto, A% es el coeficiente de extinción para una mezcla de solventes arbitrariamente designado con un valor de 2500, y G es el peso de la muestra en gramos. Para los ensayos de cultivo celular, los carotenoides fueron extraídos de la pulpa liofilizada con una solución compuesta de metanol/hexano (1:1). Los carotenoides fueron recuperados de la fase de hexano, evaporados usando un concentración al vacío “speed vac”, redisoluertos en DMSO y esterilizados por filtración con un filtro PVDF de 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore, MA, USA). Los carotenoides totales agregados al medio de cultivo fueron cuantificados espectrofotométricamente (30) y las dosis fueron aplicadas basados en  $\mu\text{M}$  equivalentes de  $\beta$ -caroteno.

### 4. Capacidad Antioxidante

La capacidad antioxidante de los fenólicos extraídos de las diversas variedades de mango fue medida usando el ensayo de capacidad de absorbancia de radicales de oxígeno (ORAC por sus siglas en inglés) tal como lo describió Cao y otros (31, 32) y posteriormente modificado por Ou y otros (33), usando fluoresceína como un marcador fluorescente. Los radicales peróxido fueron generados por medio de dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-amidinopropano), y la pérdida de fluorescencia fue monitoreada en un lector de microplatos FLUOstar Omega (BMG Labtech Inc, Durham, NC) con una longitud de onda de 485 nm de excitación y 538 nm de emisión. Cada extracto fue diluido para estandarizar el contenido de fenólicos totales a una concentración de hasta 10 mg GAE/L en un buffer de fosfatos pH 7.2, antes de pipetearlo en un plato de 96 pozos. Una dilución de un factor de 4 fue usada en los ensayos de ORAC, la cual correspondió a una concentración dentro de los pozos de 6.25  $\mu\text{M}$  de Trolox. Los resultados fueron cuantificados en  $\mu\text{moles}$  equivalentes de Trolox/100g de pulpa.

### 5. Análisis por HPLC-DAD

Los extractos de polifenoles fueron analizados usando un sistema HPLC modelo Waters Alliance 2690 (Milford, MA, USA) acoplado con una columna Dionex Acclaim® 120 C18 de 5  $\mu\text{m}$ , una columna de 4.6 mm x 250mm y una columna de protección de 4.6 x 20 mm. Los fenólicos fueron separados individualmente con un gradiente en la fase móvil de agua nanopura acidificada: ácido acético (98:2,

v/v) (Fase A) y agua nanopura: acetonitrilo: ácido acético (68:30:2, v/v/v) (Fase B) a un flujo de 0.8 mL/min con un detector PDA de 210 a 400 nm. Los compuestos fenólicos fueron separados con un gradiente programado que corrió la fase A por 3 min, luego de 100-70% en 17 min; de 70-50% en 10 min; 50-30% en 20 min; y 30-0% en 10 min, 0% en 5 min, de 0-100% en 0.5 min y regresando a la composición original en 2 min para equilibrar la columna.

El monitoreo se realizó a 280 nm (taninos hidrolizables), 250 nm (ácido p-hidroxibenzoico y derivados), 340 nm (ácidos hidroxicinámicos), 366 nm (mangiferina) y 370 nm (flavonoles). La identificación de compuestos fenólicos se realizó por comparación del tiempo de retención con el de los estándares obtenidos de Sigma-Aldrich (St Louis, MO) y las características de su espectro UV.

## **6. Líneas celulares**

Las líneas celulares usadas para este estudio fueron obtenidas de American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) y fueron crecidas de acuerdo a las recomendaciones del mismo. Las células estrógeno-dependientes de cáncer de mama MDA-MB-231 fueron cultivadas usando medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM por sus siglas en inglés) de alta glucosa, con 2 mmol/L de L-glutamina, sin piruvato de sodio y con rojo de fenol. Las células de adenocarcinoma colorectal SW-480 fueron cultivadas usando el medio L-15 de Leibovitz, con L-glutamina, sin piruvato de sodio y con rojo de fenol. Las células de carcinoma de pulmón humanas A-549 fueron cultivadas en medio DMEM/F12. Las células de leucemia humanas Molt-4 fueron cultivadas en medio RPMI-1640. Las células de cáncer c de próstata LnCap con receptor positivo de andrógeno fueron cultivadas en RPMI-1640. Todos los medios de cultivo fueron suplementados con 10% (v/v) de suero bovino fetal (SBF) y 1% de una solución de antibióticos penicilina-estreptomicina para su propagación. Para los experimentos de proliferación celular, se uso medio al 2.5% de suero bovino fetal tratado con carbón activado. Los medios de cultivo fueron suministrados por Invitrogen (Gibco™, Invitrogen Corp., Grand Island, NY). Las células fueron mantenidas a 37°C en una atmósfera humidificada al 5% de CO<sub>2</sub>.

## **7. Generación de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS).**

La producción de ROS se estimó usando el método reportado por (34) con algunas modificaciones. Brevemente, células de adenocarcinoma de colon humanas SW-480 ( $1 \times 10^5$  cells/mL) fueron crecidas en platos de 96 pozos y fueron pre-tratadas con los polifenoles del mango durante 24h. Los polifenoles totales fueron cuantificados por el método de Folin-Ciocalteu (29), y las dosis se basaron en el

contenido de fenólicos cuantificados como mg equivalentes de ácido gálico (GAE/L). Luego de remover el medio de cultivo con los extractos fenólicos, las células fueron expuestas a 200 $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 2h. Después de lavar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, las células fueron teñidas con 10  $\mu$ M de diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) a 37 °C e incubadas por 30 min. La señal de fluorescencia verde fue monitoreada a 520 nm de emisión y 480 nm de excitación con un lector de microplatos FLUOstar Omega (BMG Labtech Inc, Durham, NC). La intensidad de la fluorescencia fue usada como un indicador del nivel de ROS.

## **8. Proliferación celular**

La proliferación celular fue evaluada usando un contador electrónico de partículas (Z1™ Series, Beckman Coulter, Inc). Se sembraron células (15,000 células/pozo) en platos de 24 pozos y fueron incubadas por 24 h para permitir su adherencia a la superficie antes de ser expuestas a diferentes concentraciones de polifenoles (mg GAE/L) o de carotenoides ( $\mu$ M equivalentes de  $\beta$ -caroteno). Se estableció un número de células antes del tratamiento (tiempo igual a cero) y se reemplazó el medio con uno que contenía los extractos de fenólicos. Los extractos de fenólicos fueron redissueltos en el medio de cultivo y prefiltrados antes de su uso. Cada experimento se realizó por triplicado, y los resultados fueron expresados como promedios  $\pm$  DS. La diferencia en el número de células entre el tiempo de incubación final (72h) y el tiempo cero representa el crecimiento neto. LA inhibición celular fue expresada en términos de la concentración de fitoquímicos del mango que inhibieron el crecimiento en un 50% (IC<sub>50</sub>).

## **9. Cinética del Ciclo Celular**

Células crecidas en platos de 12 pozos (7.0 X 10<sup>4</sup>) fueron tratadas con los polifenoles del mango por 24 h. Brevemente, se obtuvieron pellets de células por medio de tripsinación y fueron fijadas con 90% etanol a -20°C por 30 min. Luego las células fueron resuspendidas en una solución de tinción [50  $\mu$ g/mL ioduro de propidio, 30 unidades/mL RNase, 4 mmol/L citrato de sodio, y Triton X-100 (pH 7.8)] y se incubaron por 15 min a 37°C. Una solución de cloruro de sodio fue añadida a una concentración final de 0.15 mol/L. Las células teñidas fueron analizadas en un citofluorímetro de flujo FACS Calibur Flow Cytometer (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) usando el software de adquisición de datos Cell Quest (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) como se describió previamente (35).



## 10. PCR Tiempo-Real Semi-Cuantitativo

Células humanas SW-480 de adenocarcinoma de colon fueron sembradas en platos de 6 pozos (5 X 10<sup>5</sup>), y tratadas con varias concentración de fenólicos de Ataulfo y Haden por 24 h. El RNA total se extrajo usando el RNeasy Mini kit (Qiagen), y 470 ng de RNA fueron usados para sintetizar cDNA usando el Reverse Transcription System (Promega). Reacciones de PCR tiempo-real fueron realizadas usando 2 µL de cDNA como se describió previamente (35). Los primers fueron obtenidos de Integrated DNA Technologies. Las condiciones óptimas para la semi-cuantificación fueron ajustadas para que cayeran en un rango lineal de productos de PCR (datos no mostrados). Como control interno se amplificó la proteína TBP (TATA-box binding protein) en cada muestra de RNA. Las secuencias de los primers usados fueron:

Fas: F: 5'- TGCCTCCTCTTGAGCAGTCA -3',  
R: 5'- TCCTGTAGAGGCTGAGGTGTCA -3'

Caspase 8: F: 5'- GGCTCCCCCTGCATCAC-3',  
R: 5'- CCTGCTAGATAAGGGCATGAATCT-3',

Bax: F: 5'- CCAAGGTGCCGGAAGTGA -3',  
R: 5'- CCCGGAGGAAGTCCAATGT -3'

Bim: F: 5'- TGCCAGGCCTTCAACCA -3',  
R: 5'- GTTCAGCCTGCCTCATGGA-3'

PKMYT1:F: 5'-CCTCTGCACTTTTAACCTTTTATCCT-3',  
R: 5'- GCAGAGAAGACCATGGGAGTTC -3'

p21: F: 5'-GAG CTC TGG GTG GTC ATG GA -3'  
R: 5'- ATC CTG GTG TGG GTG ACG AT -3'

TBP: F:5'-TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA-3',  
R: 5'-CACATCACAGCTCCCCACCA-3'

## 11. Efectos de los polifenoles del mango en el transporte en células Caco-2

### 11.1 Extracción de polifenoles

Pulpa congelada de mango (300g) fue descongelada y mezclada con 1100 mL de una solución 1:1:1 (v/v/v) etanol: metanol: acetona, filtrada con un paño de queso y con un papel filtro Whatman #1. Los solventes fueron evaporados a 40°C usando un rotavapor. El extracto acuoso fue mezclado con 200mL de metanol y particionado con hexano (1:4, v/v) para remover los carotenoides. LA fase de hexano fue

removida y la fase metanólica fue centrifugada a 2000 x g por 10 min a 7°C para precipitar la pectina. El metanol fue completamente evaporado a 40°C y los polifenoles fueron concentrados usando una minicolumna C18 Waters Sep-Pak Vac 35cc 20 cm<sup>3</sup> (Waters Corporation, Milford, MA) previamente acondicionada con 100% metanol y agua nanopura. El extracto acuoso fue cargado en el cartucho C18 y fue lavado con 30 mL de agua. Los polifenoles retenidos en la matriz fueron eluidos con 50 mL de 100% metanol (fracción retenida). El agua del lavado (fracción no retenida) fue eluida en el cartucho C18 una vez más. La fracción no retenida fue particionada dos veces en acetato de etilo para asegurar la completa extracción de todos los compuestos polifenólicos. Las fracciones retenida y no retenida fueron combinadas y evaporadas al vacío a 40°C. Los fenólicos fueron redissueltos en buffer de ácido cítrico 0.1M (pH 5.0) hasta un volumen conocido (50 mL) (Figura 1) y almacenados a -20°C hasta su posterior uso.

### **11.2. Hidrólisis enzimática**

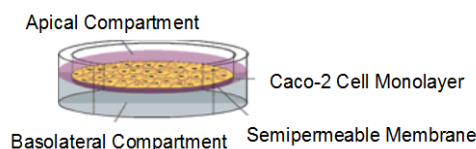
El extracto fenólicos fue completado con un buffer de ácido cítrico 0.1M (pH 5.0) hasta un volumen conocido que corresponde al volumen en la pulpa (300 mL). Los extractos fueron incubados con 0.5 mg de β-glucosidasa (1000 KU /mL de extracto de fenólicos) por 4 hrs a 35°C. El control fue incubado sin añadir enzima y siguiendo el mismo procedimiento explicado anteriormente. Para detener la actividad enzimática, los extractos fenólicos se hirvieron por 5 min y se enfriaron en hielo inmediatamente. Los extractos fueron sonicados y re-eluidos en una mini-columna C18 Waters Sep-Pak Vac 35cc 5 cm<sup>3</sup> mini-columns (Waters Corporation, Milford, MA) siguiendo el mismo procedimiento descrito en la sección 11.1. Las fases retenidas y no retenidas fueron mezcladas, los solventes completamente evaporados al vacío a 40°C y los polifenoles fueron redissueltos en 1 mL de metanol. Los extractos fueron evaporados en un concentrador “speed vac” y almacenados a -20°C hasta su posterior uso. Los fenólicos fueron redissueltos en con el mismo volumen de buffer HBSS pH 6.0 para el ensayo del modelo de transporte trans-epitelial. Las mismas diluciones del extracto fueron usadas (1,000 y 3,000 mg GAE/L) después del procedimiento de hidrólisis.

### **11.3. Modelo de Transporte Trans-epitelial**

Células de carcinoma de colon Caco-2 fueron obtenidas de American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) y cultivadas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> en medio de Eagle modificado por Dulbecco (1X) de alta glucose (DMEM), conteniendo 20% de suero bovino fetal (SBF), 0.4% aminoácidos no-esenciales, 100 unidades/mL de penicilina G, 100 µg/mL estreptomycin, 1.25 µg/mL amfotericina B, y 10 mM de pituvato de sodio (químicos suministrados por Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO). Células de un

número de pase entre 5-15 fueron sembradas a una densidad de 100,000 células por  $\text{cm}^2$  en un plato de cultivo celular Costar Transwell, de 0.4  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro, con un inserto de 12 mm de poliéster transparente (Transwell, Corning Costar Corp., Cambridge, MA), con 0.5 mL de DMEM 15% SBF en el lado apical y 1.5 mL en el lado basolateral (Figura 5). El medio fue cambiado cada 2 días. Las células se dejaron crecer y diferenciar en una monocapa confluyente por 21 días, como lo descrito previamente (Hidalgo, Raub, & Borchardt, 1989). Se midieron los valores de resistencia eléctrica transepitelial (TEER) usando un óhmetro EndOhm Volt equipado con un electrodo STX-2 (World Precision Instruments Inc., Sarasota, FL).

### Figura 5. Sistema de absorción en monocapa de células Caco-2



Para checar la confluencia de las células y la integridad de la monocapa, los valores de TEER fueron medidos con un voltímetro EndOhm equipado con un electrodo STX2 después de 3<sup>o</sup> min de incubación con HBSS y después de 2 horas de incubación con los tratamientos. Un control adicional de la integridad de la monocapa se realizó usando amarillo de lucifera, un marcador muy hidrofílico que puede permear las células solo a través de la ruta paracelular. Este marcador (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) fue añadido al lado apical, incubado por 1 h y el % de paso fue determinado al comparar la fluorescencia obtenida en una solución estándar usando longitudes de onda de excitación y emisión de 485 y 530 nm, respectivamente. Las monocapas con valores de TEER  $>450 \Omega \text{ cm}^2$  al principio y  $>350 \Omega \text{ cm}^2$  al final fueron usadas para los experimentos de transporte. Antes de los experimentos de transporte, las células fueron lavadas con buffer fosfato salino de Dulbecco (DPBS) y el medio de crecimiento fue reemplazado por la solución salina balanceada de Hank (HBSS, Fischer Scientific, Pittsburgh, PA), que contiene 10 mM de ácido 2-(*N*-morpholino)etanesulfónico (MES, Gibco BRL Life Technology, Grand Island, NY) ajustado a pH 6.0 en la lado apical, y HBSS con solución buffer (1M) de *N*-[2-hydroxyethyl]piperazine-*N'*-[2-ethanesulfonic acid] (HEPES, Gibco BRL Life Technology, Grand Island, NY) ajustada a pH 7.4 en el lado basolateral, creando así un gradiente de pH similar al del intestino delgado. Los polifenoles del mango (control y tratados enzimáticamente) fueron diluidos en HBSS pH 6.0 y ajustados a las mismas diluciones usadas (1,000 y 3,000 mg equivalentes de ácido gálico/L) para cultivo celular. Después de una incubación a 37°C por 30 min de ambos lados de la

monocapa, el HBSS ajustado a pH 6.0 del lado apical de la monocapa de células fue reemplazado por 500  $\mu$ L de extractos fenólicos. Alícuotas de 200  $\mu$ L fueron tomadas del compartimento basolateral a los 30, 60, 90 y 120 min, e inmediatamente acidificados con 5  $\mu$ L de HCl 4N, manteniéndolas congeladas (-20°C) y fueron analizadas en un lapso de una semana. Las muestras fueron filtradas por medio de membranas PTFE de 0.45 $\mu$ m (Whatman, Florham Park, NJ) e inyectadas directamente al sistema HPLC-ESI-MS.

## 12. Análisis estadístico

Los datos cuantitativos representan valores promedio con su respectiva desviación estándar (DS) o error estándar del promedio (ES), y son correspondientes a 3 o más réplicas. Los datos fueron analizados por análisis de varianza de un factor (ANOVA) usando el software SPSS versión 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). También se usó el test post hoc de comparaciones múltiples de Tukey ( $p < 0.05$  y  $p < 0.01$ ).

## Resultados y Discusión

**Polifenoles.** Se encontró que la variedad Ataulfo fue la más alta en fenólicos totales ( $56.7 \pm 0.3$  mg GAE/100g), seguida de Haden ( $19.1 \pm 1.8$  mg GAE/100g) (Tabla 3). Estas variaciones en los polifenoles del mango han sido asociadas con el nivel de maduración, la zona geográfica de producción, las condiciones del procesamiento (11, 36), los cambios estacionales o las infecciones microbianas (37). La determinación de los fenólicos totales puede ser relevante al momento de analizar la capacidad antioxidante y anticancerígena de la fruta, ya que ambas han sido atribuidas a los polifenoles.

**Carotenoides.** Ha sido reportado que diferentes variedades de mango son una buena fuente de carotenoides, aunque las cantidades pueden variar de acuerdo al estado de maduración, el origen del cultivo y las condiciones de procesamiento (17, 20). Nuestro estudio de los carotenoides confirmó dicha variabilidad; siendo Haden y Francis las variedades con la mayor concentración de carotenoides ( $14.2 \pm 1.4$  y  $13.7 \pm 0.9$  mg/100g de pulpa, respectivamente), seguida de Francis, Kent, Ataulfo y Tommy Atkins ( $9.6 \pm 0.0$ ,  $6.3 \pm 0.8$ , y  $5.3 \pm 1.1$  mg de carotenoides totales/100g de pulpa, respectivamente) (Tabla 3).

**Tabla 3. Polifenoles totales, carotenoides, y la capacidad antioxidante (ORAC) de diferentes variedades de mango**

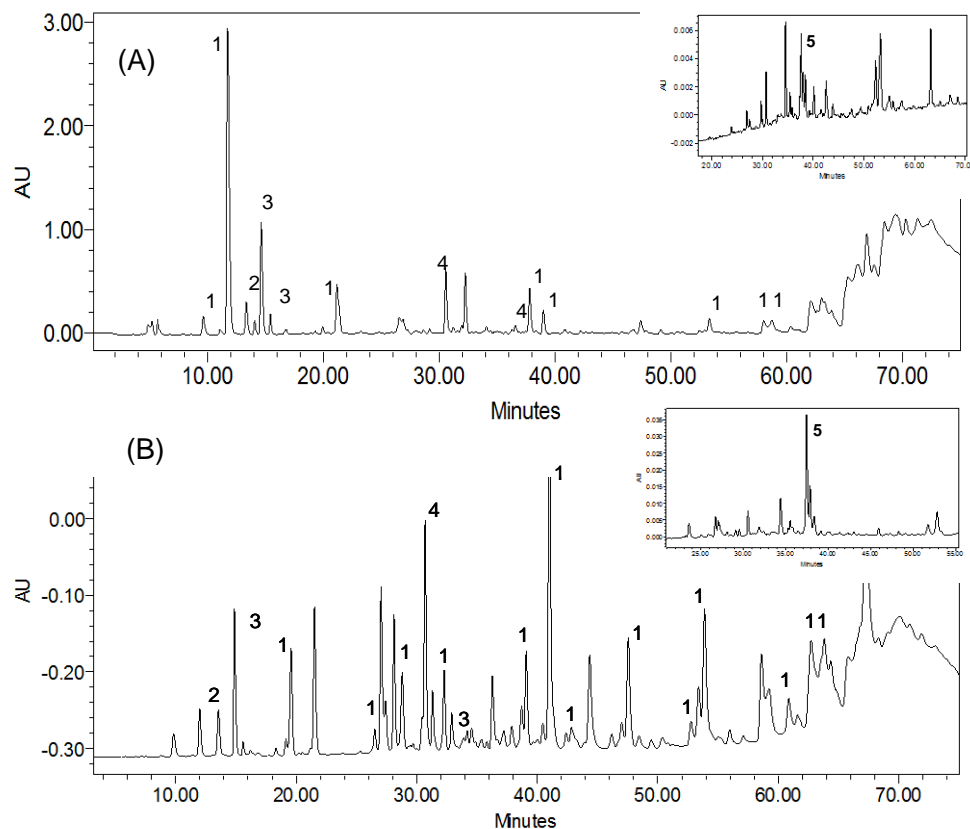
<b>Variedad de Mango</b>	<b>Polifenoles totales (mg GAE/kg pulpa)</b>	<b>Capacidad Antioxidante <math>\mu\text{mol TE/g}</math></b>	<b>Carotenoides Totales (mg /100g pulpa)</b>
Ataulfo	793	8.41	$6.3^c \pm 0.8$
Haden	371	4.01	$14.2^a \pm 1.4$
Francis	604	4.58	$13.7^a \pm 0.9$
Kent	340	2.85	$9.6^b \pm 0.0$
Tommy Atkins	315	1.45	$5.3^c \pm 1.1$

<sup>1</sup>Promedio de tres o más mediciones independientes  $\pm$  DS.

#### **Análisis por HPLC-DAD (Ataulfo y Haden)**

El análisis por HPLC-DAD de los extractos de Ataulfo y Haden mostraron la presencia de ácidos fenólicos tales como ácido gálico y sus glicósidos (galotaninos), xantanos y sus glicósidos (tales como mangiferina), derivados de ácidos hidroxicinámicos (que contienen ácidos p-cumárico, cafeico o ferúlico), derivados de ácido p-OH-benzoico y flavonoides (Figura 6).

**Figura 6: Cromatogramas a 280 y 366 nm los extractos de polifenoles de Ataulfo (A) y Haden (B). Pico 1: Galoil-glucosido, 2: Ácido gálico, 3: derivados de ácido *p*-OH-benzoico, 4: derivados de ácido hidroxi-cinámico, y 5: mangiferina (insertado).**

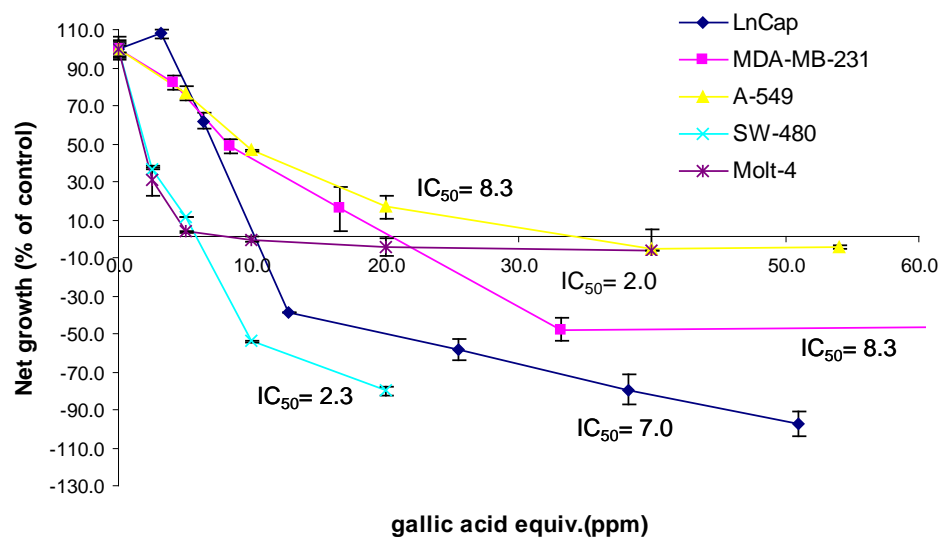


### Actividad de polifenoles de Haden y Ataulfo para suprimir el crecimiento de células de cáncer

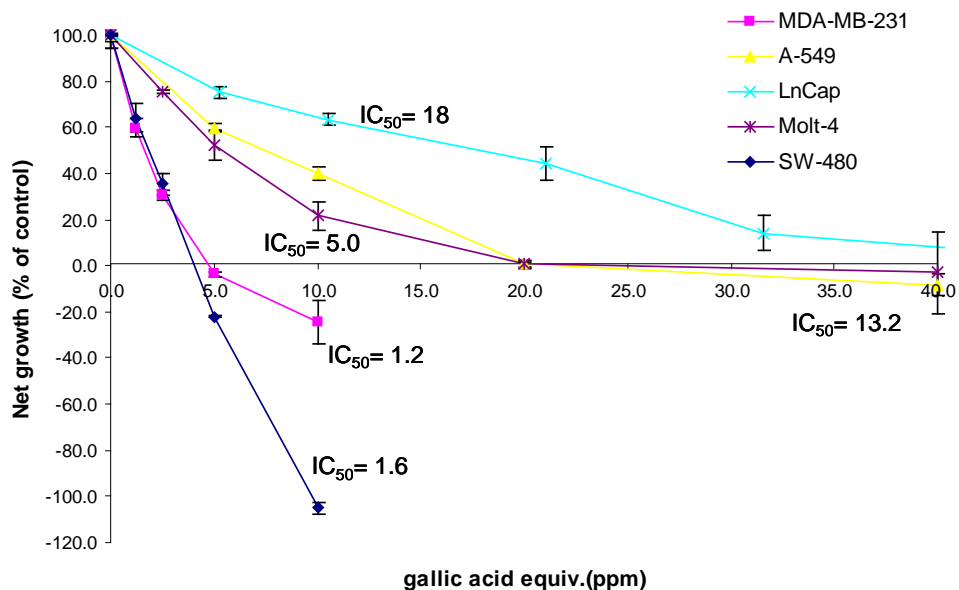
Debido a su alto contenido de fenólicos y actividad antioxidante, las variedades Ataulfo y Haden fueron seleccionadas para evaluar su capacidad de inhibir el crecimiento de ciertas líneas celulares de cáncer usadas en este estudio (Figura 7). En un rango de 0-42 mg GAE/L, los polifenoles del mango Ataulfo suprimieron el crecimiento celular en el siguiente orden de potencia: SW-480 = Molt-4 = MDA-MB-231 > A-549 = LnCap. Todas las líneas celulares mostraron un patrón similar (dosis-dependiente) de supresión del crecimiento celular cuando fueron tratadas con los polifenoles de Haden, aunque MDA-MB-231 resultó ser más resistente.

**Figura 7. Evaluación representativa del impacto de los fenólicos (con un comportamiento dosis-dependiente) extraídos de las variedades comerciales de mango (A) Haden y (B) Ataulfo en el crecimiento neto de células de leucemia Molt-4, cáncer de pulmón A-549, cáncer de mama estrógeno-dependiente (MDA-MB-231), adenocarcinoma colorectal SW-480 y cáncer de próstata humana LnCap (positivas en receptor de andrógeno). Las células fueron incubadas con varias concentraciones de extractos y el crecimiento neto fue medido a los 3 días usando un medidor electrónico de partículas. Los valores reportados representan el promedio de tres réplicas  $\pm$  ES.**

**A. Haden**



**B. Ataulfo**



Los valores de IC<sub>50</sub> (la concentración para inhibir el crecimiento de las células de cáncer en un 50%) están resumidos en la Tabla 4. Estos resultados indican que las células cancerígenas colorectales SW-480 fueron inhibidas tanto por los polifenoles de Haden como de Ataulfo en la misma manera. Por lo tanto, un valor más bajo de IC<sub>50</sub> indica que se necesita una menor concentración del extracto fenólico para tener el mismo efecto (inhibir el crecimiento de las células de cáncer en un 50%).

**Tabla 4. Valores IC<sub>50</sub> de los polifenoles extraídos del mango Ataulfo y Haden en la supresión de diferentes líneas celulares humanas.**

Variedad	IC <sub>50</sub> (mg GAE/L)					
de Mango	SW-480	MDA-MB-231 LnCap	A-549	Molt-4	CCD-18Co	
<b>Ataulfo</b>	1.6 <sup>1</sup> ± 0.2 <sup>b</sup>	1.2 <sup>1</sup> ± 0.5 <sup>b</sup>	18.0 <sup>2</sup> ± 0.0 <sup>a</sup>	13.2 <sup>1</sup> ± 5.5 <sup>a</sup>	5.0 <sup>1</sup> ± 1.0 <sup>b</sup>	9.0 <sup>2</sup> ± 0.4
<b>Haden</b>	2.3 <sup>1</sup> ± 0.2 <sup>b</sup>	8.3 <sup>1</sup> ± 0.4 <sup>a</sup>	7.0 <sup>1</sup> ± 0 <sup>a</sup>	8.3 <sup>2</sup> ± 1.8 <sup>a</sup>	2.0 <sup>1</sup> ± 0.5 <sup>b</sup>	ND

<sup>1</sup>Promedio de tres mediciones independientes ± DS. <sup>2</sup>Promedio de dos mediciones independientes. Indices diferentes indican una diferencia significativa a un nivel de p < 0.05. ND, no determinado.

De los polifenoles identificados en la pulpa de Haden (36), el perfil de HPLC de los extractos redisueltos en medio de cultivo y esterilizados por filtración demostró que los galotaninos de alto peso molecular (tiempo de retención mayor a 60 min) se quedaron en el filtro (eran muy grandes o estaban acomplejados con proteínas). Por lo tanto, solamente los polifenoles de bajo peso molecular disponibles son responsables de la actividad inhibitoria in vitro y cualquier otra respuesta celular mostrada en este estudio. Las interacciones entre fitoquímicos individuales como la manginerina, los 3-O-glucósidos de quercetina y los galoil glicósidos pueden tener un efecto sinérgico o aditivo (52-54). Esto es relevante porque los polifenoles del mango se encuentran probablemente disponibles en el colon (13). Los galotaninos del mango, muy probablemente no absorbidos a lo largo del intestino delgado (16), pueden alcanzar el colon y ser transformados en derivados de galoil glucósidos de bajo peso molecular similares a aquellos identificados en nuestros tratamientos de cultivo celular. Por tanto, la protección quimiopreventiva de los polifenoles del mango contra el cáncer del colon pudiera ser traducida in vivo. La biodisponibilidad de los polifenoles en la dieta varía significativamente entre compuestos de bajo y alto peso molecular. Los ácidos fenólicos como el ácido cafeico y gálico son los polifenoles mejor absorbidos, seguidos de las catequinas, flavanonas y glucósidos de quercetina. Los polifenoles menos absorbidos son los polifenoles de alto peso molecular tales como las proantocianidinas, las galoil catequinas del té y las antocianinas (55). Estos polifenoles son más estables y resistentes a la digestión gastrointestinal y probablemente llegan al colon (13). Más tarde, son metabolizados extensivamente por la microflora del colon en una gran variedad de polifenoles de



bajo peso molecular producto de su rompimiento (56). Los resultados sugieren que las variedades Ataulfo y Haden pudieran ser identificadas como variedades con beneficios especiales para la salud debido a su alto contenido de polifenoles, actividad antioxidante y capacidad de inhibir el crecimiento de células de cáncer.

### **Resumen no técnico:**

Después de la evaluación química inicial, las variedades Ataulfo y Haden fueron seleccionadas basándose en su capacidad antioxidante para ser probadas en diferentes líneas celulares de cáncer. Diferentes tipos de cáncer pueden mostrar diferencias en su respuesta a las propiedades anticancerígenas del mango, por lo tanto varios tipos de cáncer fueron probados. Los ensayos de crecimiento celular mostraron que las células de cáncer de colon SW-480 fueron las más sensibles al tratamiento con ambas variedades de mango, comparadas con otros tipos de cáncer. Los mangos contienen polifenoles tanto pequeños como grandes, siendo estos últimos menos propensos a ser absorbidos, por lo que alcanzan el intestino delgado. Esto significa que las células de colon están expuestas a los compuestos del mango tanto a través de la sangre como en el lumen intestinal.

### **¿Qué cantidad de mango tendríamos que comer para obtener los efectos observados?**

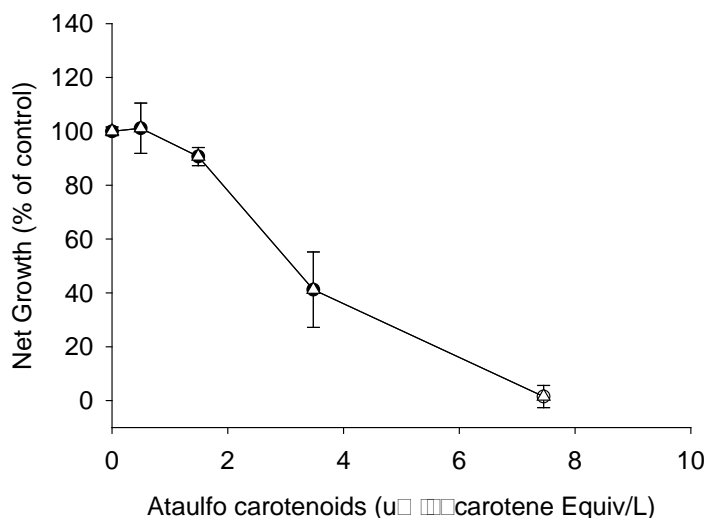
El IC50 al que el crecimiento celular se redujo al 50% es equivalente a 23 mg de pulpa/mL de medio de cultivo para el caso de Ataulfo. Si asumiéramos como modelo que esta misma concentración se necesita en el colon, entonces se requerirían 23 g de pulpa/L de volumen intestinal para reducir en un 50% el crecimiento de las células de cáncer de colon, dentro de un segmento de colon expuesto a dicho volumen (1L). Esto también asume que ninguno de los polifenoles fue absorbido en la parte superior de los intestinos, que el colon solo contiene líquido y que no hay mucosa protectora cubriendo a las células. De acuerdo a este modelo, para obtener esta concentración tendríamos que consumir 23 g de la porción comestible de mango Ataulfo por cada litro de volumen de colón. Dado un volumen intestinal de 2-3 L, esto significaría de 46-69 g de mango. De los experimentos realizados no se puede concluir cual es la cantidad de mango que se debería consumir por día, más aún, en los ensayos con células estas cantidades fueron incubadas por 24h, donde solo el metabolismo de las células cultivadas estaba ocurriendo y nada estaba siendo excretado, como ocurriría normalmente en un sistema vivo\*.

### **Actividad de los carotenoides del mango para inhibir crecimiento de células de cáncer**

La capacidad de los carotenoides extraídos de Ataulfo para suprimir el crecimiento mostró un comportamiento dosis-dependiente en células de cáncer de colon SW-480 dentro de un rango de 0 a 7.5 $\mu$ M equivalentes de  $\beta$ -caroteno (Figura 8). Reportes han mostrado que los carotenoides, a concentraciones posiblemente alcanzadas in vivo (1-10  $\mu$ M) no inhiben el crecimiento de células de cáncer de próstata (57) ni de leucemia (58). Sin embargo, el  $\beta$ -caroteno ha mostrado inhibir el crecimiento e inducir apoptosis en células de cáncer de colon y de próstata positivas en la proteína caveolina-1 (24). La regulación del gen de supresión tumoral caveolina-1 por  $\beta$ -caroteno fue relacionada a la inhibición de la ruta “AKT survival” y la activación de rutas proapoptóticas caspasa-

dependientes (24). Aun así, aunque los carotenoides de Ataulfo fueron efectivos para inhibir el crecimiento de SW-480, el contenido de carotenoides en este cultivo es relativamente bajo (6mg equivalentes de  $\beta$ -caroteno/100 g de pulpa) y se necesitó usar significativamente más material vegetal para extraer suficientes carotenos para los estudios de cultivo celular. Por otra parte, los polifenoles totales fueron más abundantes (57 mg GAE/100g pulpa), y la inhibición del crecimiento celular fue alcanzada a más bajas concentraciones (1.3-5 mg GAE/L) que los carotenoides (268 – 4,026.5 mg  $\beta$ -caroteno equivalentes/L), indicado que los polifenoles del mango fueron más efectivos para el tratamiento del cáncer y la quimioprevención.

**Figura 8. Una evaluación representativa del efecto de los carotenoides de Ataulfo con un comportamiento dependiente de la concentración en el crecimiento neto de células de cáncer de colon (SW-480). Las células fueron incubadas con los carotenoides disueltos en DMSO por 72h y el crecimiento neto fue medido al comparar con un control tratado únicamente con el solvente. Los valores son promedios  $\pm$  ES, n=3.**



### Resumen no técnico:

El mango contiene carotenoides además de polifenoles. Para determinar si dichos carotenoides tienen efectos anti-cancerígenos, relevantes para el consumo de mango, la fracción de carotenoides fue extraída de la variedad Ataulfo y se incubaron células de cáncer de colon con diferentes concentraciones del extracto. Los carotenoides fueron efectivos para inhibir el crecimiento de células de cáncer de colon, sin embargo la concentración total en los mangos es relativamente baja y consecuentemente este compuesto puede no ser un contribuyente importante en los efectos anti-cancerígenos del mango. El IC<sub>50</sub> al cual el crecimiento celular fue reducido en un 50% es equivalente a 894 mg/ml de medio de cultivo.

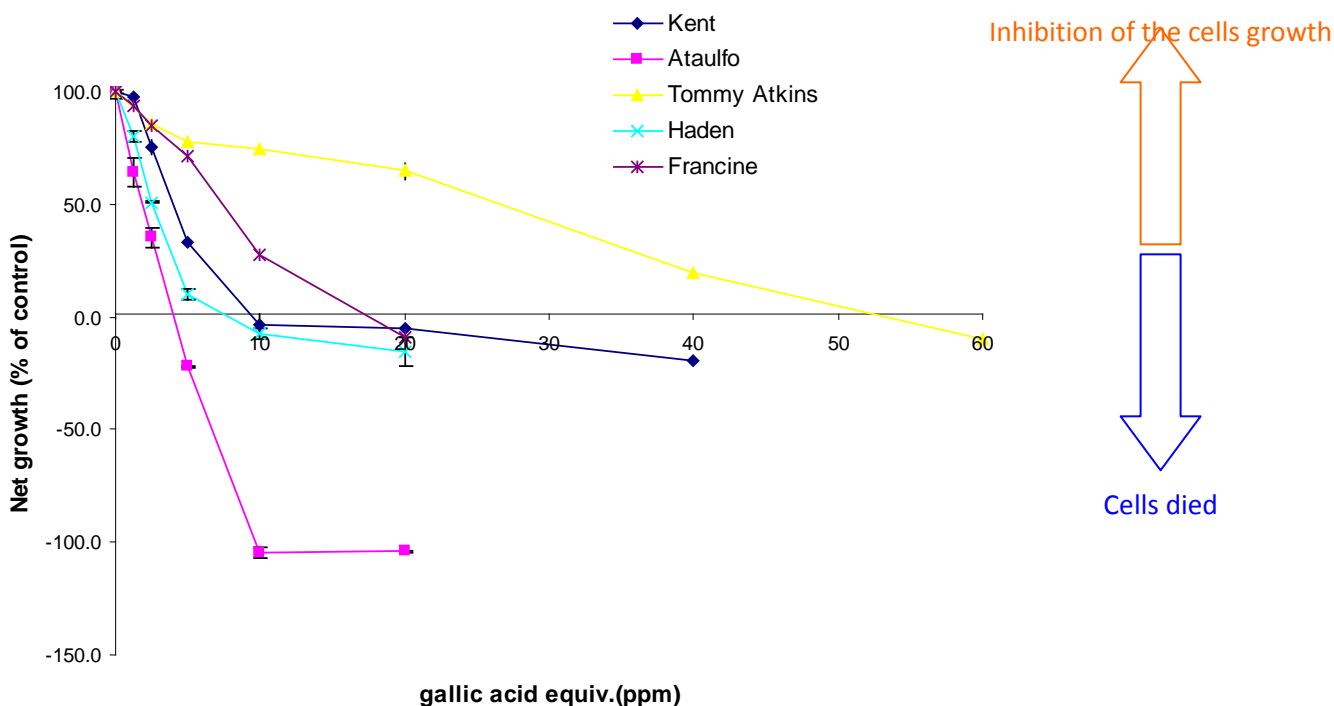
### **¿Qué cantidad de mango tendríamos que consumir para obtener los efectos observados?**

Si asumiéramos como modelo que se requiere la misma concentración en el colon, 894 g/L de volumen intestinal se necesitarían para reducir en un 50% el crecimiento de las células de cáncer dentro de un segmento de colon expuesto a un litro. Esto es asumiendo que solo los carotenoides se encuentran presentes en el mango y no otros compuestos. Esto también asume que ninguno de los carotenoides ha sido absorbido en el intestino superior, que el colon contiene solamente líquido y que no hay mucosa protectora cubriendo las células. En este modelo, para obtener esta concentración necesitaríamos consumir 894 g de la porción comestible de mango Ataulfo por litro de colon para obtener el efecto, lo cual es más de la cantidad necesitada para obtener el mismo efecto con los polifenoles (ver segmento anterior). Dado un volumen intestinal de 2-3 L, esto se traduce en 1788-2682g de mango. De los experimentos realizados no se puede concluir cual es la cantidad de mango que se debería consumir por día, más aún, en los ensayos con células estas cantidades fueron incubadas por 24h, donde solo el metabolismo de las células cultivadas estaba ocurriendo y nada estaba siendo excretado, como ocurriría normalmente en un sistema vivo\*.

### **Inhibición del crecimiento de células de cáncer de colon SW-480 por efecto de los polifenoles de diferentes variedades de mango.**

Los polifenoles extraídos de Ataulfo, Haden, Kent, Francis y Tommy Atkins, con orden de potencia descendiente, indujeron supresión del crecimiento con un comportamiento dosis-dependiente en células humana SW-480 de cáncer de colon (Figura 9). Los polifenoles de Ataulfo y Haden, entre las cinco variedades, mostraron la mayor actividad inhibitoria contra SW-480 (valores más bajos de IC<sub>50</sub>). A una concentración de 1.3 y 2.5 GAE/L, los polifenoles de Ataulfo suprimieron el crecimiento de células SW-480 en un 36% y 65%. Un crecimiento neto de -22% en SW-480 incubadas con 5 mg GAE/L de polifenoles de Ataulfo indica que la población a las 72 hrs era más baja que al tiempo cero, sugiriendo un efecto neto toxico. Mientras tanto, los polifenoles extraídos de Haden tuvieron un efecto menos sustancial pero también dependiente de la concentración, para la inhibición de SW-480, con 20%, 50% y 90% de inhibición alcanzadas a 1.3, 2.5 y 5 mg GAE/L respectivamente. Los índices de IC<sub>50</sub> indican el orden de potencia contra el crecimiento de células SW-480 y fueron de la siguiente manera: Ataulfo = Haden ≥ Kent > Francis > Tommy Atkins (Tabla 5).

**Figura 9.** Una evaluación representativa del impacto (concentración-dependiente) de los compuestos fenolicos extraídos de variedades comerciales de mango (variedades Haden, Ataulfo, Tommy Atkins, Kent y Francis) en el crecimiento neto de células humanas SW-480 de cáncer colorectal. Las células fueron incubadas con varias concentraciones de extractos y el crecimiento neto fue medido a los 3 días usando un contador electrónico de articular. Los valores son promedios  $\pm$  ES.



**Tabla 5.** Valores  $IC_{50}$  de los polifenoles de diferentes variedades de mango extraídos para la supresión del crecimiento de células humanas SW-480 de cáncer de colon.

Variedad de Mango	$IC_{50}$ (mg GAE/L)
Ataulfo	$1.6^1 \pm 0.2^a$
Haden	$2.3^1 \pm 0.2^a$
Kent	$5.0^2 \pm 1.4^{a,b}$
Francis	$8.2^1 \pm 2.6^b$
Tommy Atkins	$27.3^2 \pm 0.4^c$

<sup>1</sup>Promedio de tres mediciones independientes  $\pm$  DS. <sup>2</sup>Promedio de dos mediciones independientes. Índices con letras diferentes indican una diferencia significativa a un nivel de  $p < 0.05$ .

Estudios relacionados han reportado que los polifenoles con grupos galoil son los más efectivos para inhibir la proliferación de células de cáncer de colon (59). Sin embargo, los valores de IC<sub>50</sub> reportados para SW-480 (de 134-190 µM) (60), al compararlos con los valores de IC<sub>50</sub> de los polifenoles de Ataulfo, nos llevan a concluir que es la mezcla de polifenoles en Ataulfo la responsable de la actividad supresora del crecimiento de células de cáncer de colon. Tomando en consideración los resultado de proliferación celular, cuantificación y caracterización de polifenoles, y la actividad antioxidante, las variedades Ataulfo y Haden fueron identificadas como aquellas con mayor potencial para el tratamiento y prevención de cáncer de colon.

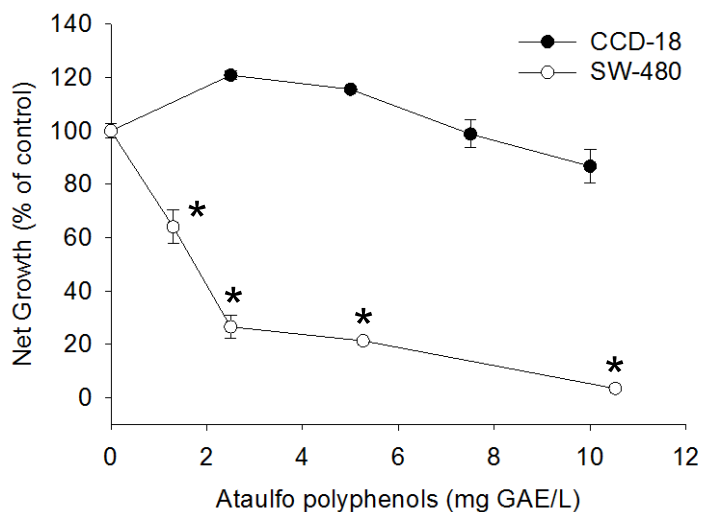
### **Resumen no técnico:**

Después de seleccionar las células de cáncer de colon SW-480 basandonos en su alta sensibilidad a los compuestos de mango, varias variedades de mango fueron probadas en esta línea celular y fue demostrado que la variedad Tommy Atkins es 10 veces menos efectiva que Ataulfo. Los efectos de Kent y Francis fueron menos que Ataulfo y Haden, pero más que Tommy (ver tabla arriba).

### **Actividad inhibitoria de los polifenoles de Ataulfo contra células de miofibroblastos no-cancerígenas (CCD-18Co)**

Las células no-cancerígenas CCD-18Co de miofibroblastos de colon fueron más resistentes al efecto inhibitorio de los polifenoles que las células SW-480. A la dosis más alta (5 mg GAE/L), a la cual los polifenoles de Ataulfo suprimieron el crecimiento de SW-480 en ~ 79 %, el crecimiento de CCD-18Co no fue inhibido. De la misma manera, el valor de IC<sub>50</sub> para CCD-18Co fue de 9.0 ± 0.4 mg GAE/L. Por tanto los polifenoles de Ataulfo tienen una toxicidad relativamente baja en células no cancerígenas de colon ya que la concentración necesaria para inhibir el crecimiento en un 50% es 5.6 veces más alta que la necesaria para inhibir las células SW-480 en la misma proporción (Figura 10).

**Figura 10. Curvas representativas mostrando el efecto concentración dependiente de los polifenoles de Ataulfo para inhibir el crecimiento de células humanas SW-480 de cancer de colon y CCD-18Co miofibroblastos de colon. Las células fueron incubadas con los extractos y el crecimiento neto fue medido a los 3 días. Los valores representan promedios  $\pm$  ES, n=3. Los asteriscos representan una diferencia significativa comparados con el control sin tratamiento (\*)  $p \leq 0.01$ .**



Estos resultados sugieren que los polifenoles presentes en el mango con propiedades bioactivas fueron principalmente galoiol glucósidos, mientras que los flavonol-O-glicósidos (36) mostraron también tener potencial como compuestos naturales quimiopreventivos y quimioterapéuticos contra el cáncer de colon, ya que ellos tienen como blanco preferencialmente las células de cáncer SW-480, con baja toxicidad para las células normales. Estudios previos han reportado la existencia de efectos inhibitorios y citotóxicos de algunos extractos de plantas contra células de cáncer de colon (10, 61-63). Sin embargo, estos estudios han fallado en evaluar la toxicidad de los polifenoles activos en células no cancerígenas. Estos resultados son relevantes por que la dosis efectiva esta cercana al rango reportado para los polifenoles de alto peso molecular que se mantienen que el tracto gastrointestinal y pasan a través del colon (14). Por lo tanto los potenciales efectos preventivos para cáncer colorectal podrían ser traducidos in vivo.

### **Resumen no técnico:**

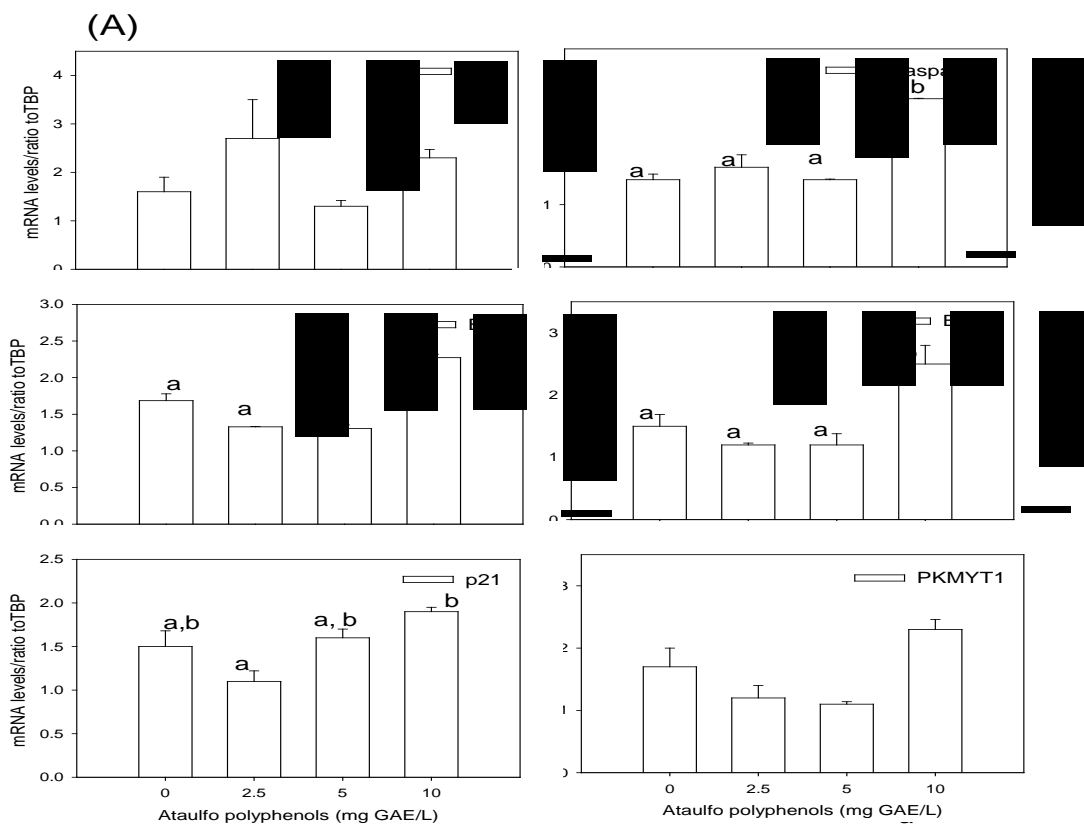
Cuando hemos comparado los efectos de Ataulfo en células no cancerígenas, hemos encontrado que los polifenoles del mango no afectaron negativamente el crecimiento de las células normales, solamente de las células de cáncer. Esto significa que el consumo de mango no debería tener un efecto significativo en las células normales del colon.

### **Regulación a nivel transcripcional en células humanas SW-480 (cáncer de colon) mediada por los polifenoles de las variedades Ataulfo y Haden.**

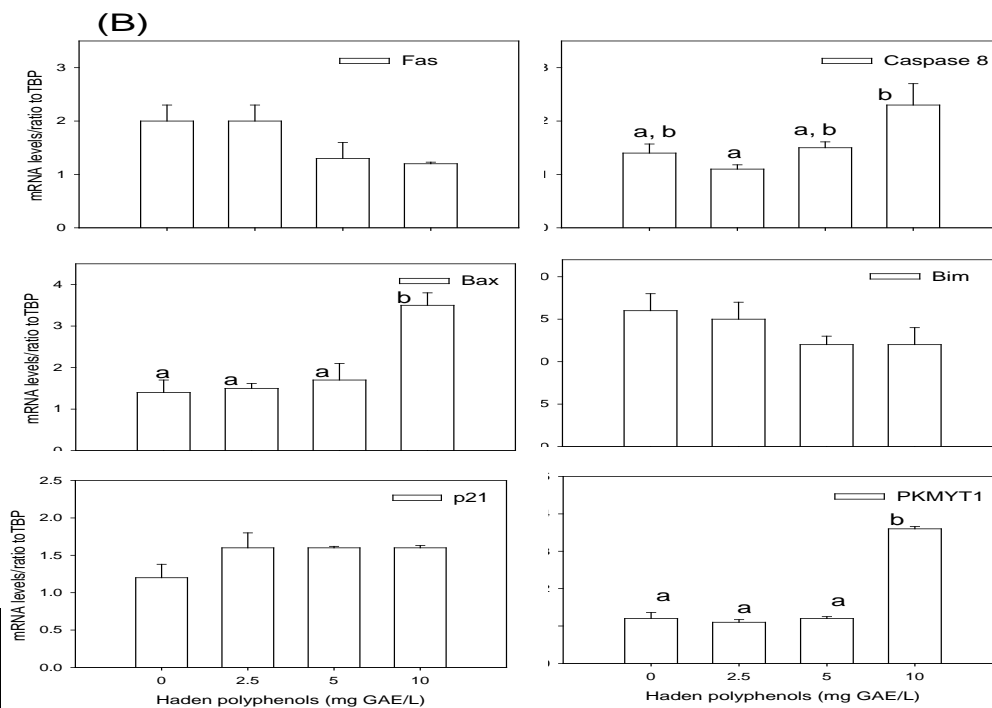
Los polifenoles de Haden y Ataulfo regularon la transcripción de genes relacionados al control del ciclo celular y la apoptosis, en un rango de dosis de 0-10 mg GAE/L (Figura 11). Los resultados indican que tanto el receptor de muerte celular extrínseco como las vías pro-apoptóticas de la mitocondria (intrínseca) están siendo apuntadas al nivel de transcripción por los polifenoles de Ataulfo y Haden. La activación del receptor Fas ocurre a nivel post-translacional, conduciendo a la activación de la caspasa-8, un iniciador de la cascada de las caspasas, resultado en consecuencia en la proteólisis de las proteínas celulares y la muerte por apoptosis o muerte celular programada (45). Por otra parte, los extractos naturales de plantas y sus fitoquímicos aparentemente tienen como blanco la vía mitocondria intrínseca (30). Esta vía puede ser activada por varios estímulos, incluidos el estrés por ROS y compuestos citotóxicos. Los polifenoles de Ataulfo regularon positivamente (hacia arriba) la transcripción de genes de la mitocondria relacionados con la apoptosis: Bax y Bim, mientras que los polifenoles de Haden parecen no ser eficaces en afectar la expresión genética de Bim. Cuando se activa la vía mitocondrial, la proteína pro-apoptótica Bax forma canales y contribuye a regular los canales preexistentes que permeabilizan la membrana mitocondrial externa, lo cual resulta en la liberación de proteínas desde el espacio intermembranal. Estas proteínas, una vez liberadas en el citosol, inducen o promueven la apoptosis (46). Bim, por otra parte, se ha relacionado con la activación de estímulos de muerte y actúa como un "ligando de muerte", que puede neutralizar ciertos miembros de la sub-familia de proteínas pro-supervivencia Bcl-2 (47).

En cuanto a los genes de control del ciclo celular, los resultados muestran que los polifenoles de Ataulfo a dosis bajas (2,5 mg GAE/L) reprimieron la expresión de p21 (Cip1/WAF1) (p21) y este efecto se invirtió a dosis más elevadas; la misma tendencia se encuentra en las células tratadas con polifenoles de Haden. El gen p21 codifica un potente inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina, y funciona como un regulador de la progresión del ciclo celular en la fase G1. Por último, tanto los polifenoles de Ataulfo como de Haden regularon positivamente la expresión genética de la proteína tirosina-quinasa asociada a membrana/treonina 1 (PKMYT1). La proteína codificada por este gen es un miembro de la familia de las quinasas serina/treonina. Esta quinasa preferentemente fosforila e inactiva a la proteína de división celular del ciclo 2 (CDC2), y por lo tanto regula negativamente la transición G2/M del ciclo celular (48).

**Figura 11. Expresión del ARN mensajero (mRNA) de células de cáncer de colon SW-480 tratadas con polifenoles de (A) Ataulfo y (B) Haden durante 24 horas y analizadas por PCR en tiempo real. Datos representados como proporción del mRNA de la proteína de unión a TATA (TBP). Los valores son medias  $\pm$  error estándar (n = 3). Letras diferentes indican diferencia significativa a un valor de  $p < 0,05$**



### Regulación del Ciclo Celular





El ciclo celular, o ciclo de división celular, es la serie de acontecimientos que tienen lugar en una célula que se dirige a su división y duplicación (replicación). El ciclo de la célula incluye cinco etapas: G1, S, G2, (interfase), M (mitosis), C (citocinesis). Sin embargo, el ciclo celular puede dividirse en dos breves periodos: la interfase, durante el cual la célula crece, acumulando nutrientes necesarios para la mitosis y la duplicación del ADN, y la mitosis (M), durante el cual la célula se divide en dos células distintas, a menudo llamadas "células hijas". Hay tres etapas de la interfase, cada fase termina cuando un punto de control asegura la finalización de la etapa anterior antes de proceder a la siguiente. Las etapas de la interfase son:

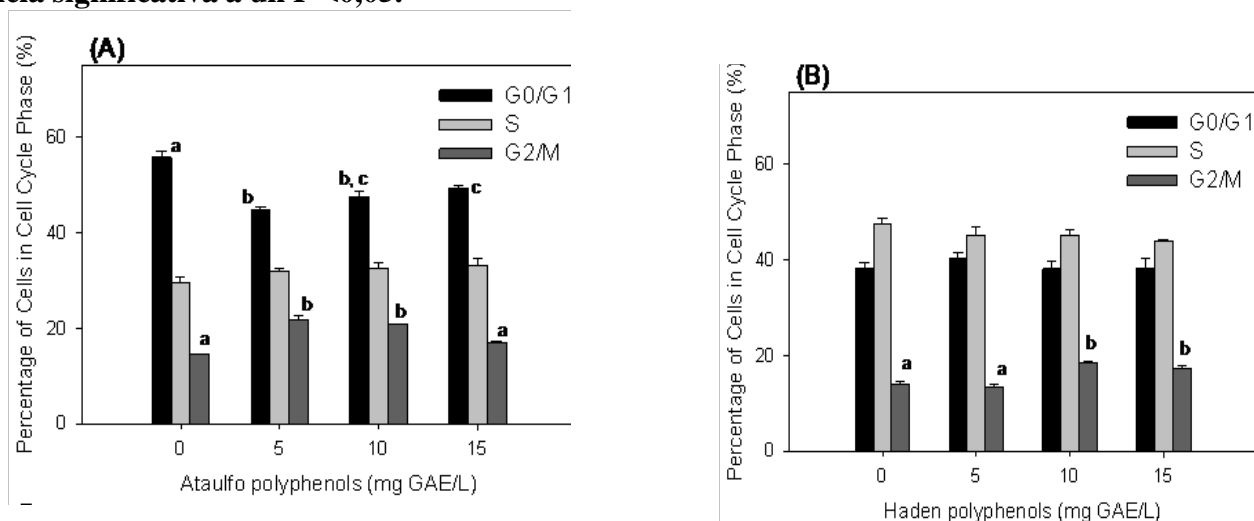
- **G1** (Gap 1), en la que la célula crece y funciona normalmente. La primer fase dentro la interfase, a partir del final de la fase anterior M hasta el inicio de la síntesis de ADN se llama G1 (G indicando *gap*). Durante este tiempo, una gran cantidad de síntesis proteica ocurre y la célula crece (a casi el doble de su tamaño original). Más organelos se producen e incrementa el volumen del citoplasma. Si la célula no se divide de nuevo, se mantendrá en esta fase.
- **Síntesis (S)**, en la que la célula duplica su ADN (a través de la replicación semi-conservativa).
- **G2** (Gap 2), en la que la célula reanuda su crecimiento en preparación para la mitosis.

La fase M está compuesta por dos procesos estrechamente relacionados: la mitosis, en la que los cromosomas de la célula se dividen entre las dos células hijas, y la citocinesis, en la que el citoplasma de la célula se divide formando dos células distintas. Además, en el caso de las células que han temporal o reversiblemente dejado de dividirse, se dice que han entrado en un estado de inactividad, llamado fase G<sub>0</sub>, que es una fase separada de la interfase y una fase G<sub>1</sub> prolongada. La formación de un tumor puede ocurrir debido a la desregulación de los componentes del ciclo celular. En un tumor, el porcentaje de células que están en división celular activa (frente a células en reposo en la fase G<sub>0</sub>) es mucho mayor que en el tejido normal.

La figura 12 muestra el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular. El porcentaje de células tratadas con polifenoles de Ataulfo en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> es menor que el control (sin tratamiento), lo que indica que polifenoles de Ataulfo suprimieron el número de células en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. Además, teniendo en cuenta que tenemos un incremento en el número de células en la fase G<sub>2</sub>/M después del tratamiento con extractos de Ataulfo, los polifenoles de esta variedad también indujeron el arresto de la fase G<sub>2</sub>/M, aunque el este efecto se invirtió a dosis más altas (15 mg GAE/L). Debido a esto, los polifenoles de Ataulfo están previniendo la progresión del ciclo celular y, en consecuencia, la formación de tumores. Por otra parte, los polifenoles de Haden no regularon el ciclo celular en G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>

pero el efecto sobre el arresto del ciclo celular en la fase G2/M se alcanzó a dosis más elevadas (10-15 mg GAE/L).

**Figura 12. Análisis por citometría de flujo de células de adenocarcinoma colorectal humanas SW-480. Las células fueron tratadas con 0 (control), 5, 10 y 15 mg de equivalentes de ácido gálico/L de los extractos de Ataulfo (B) y Haden (A) durante 24 horas. Letras diferentes indican diferencia significativa a un P <0,05.**



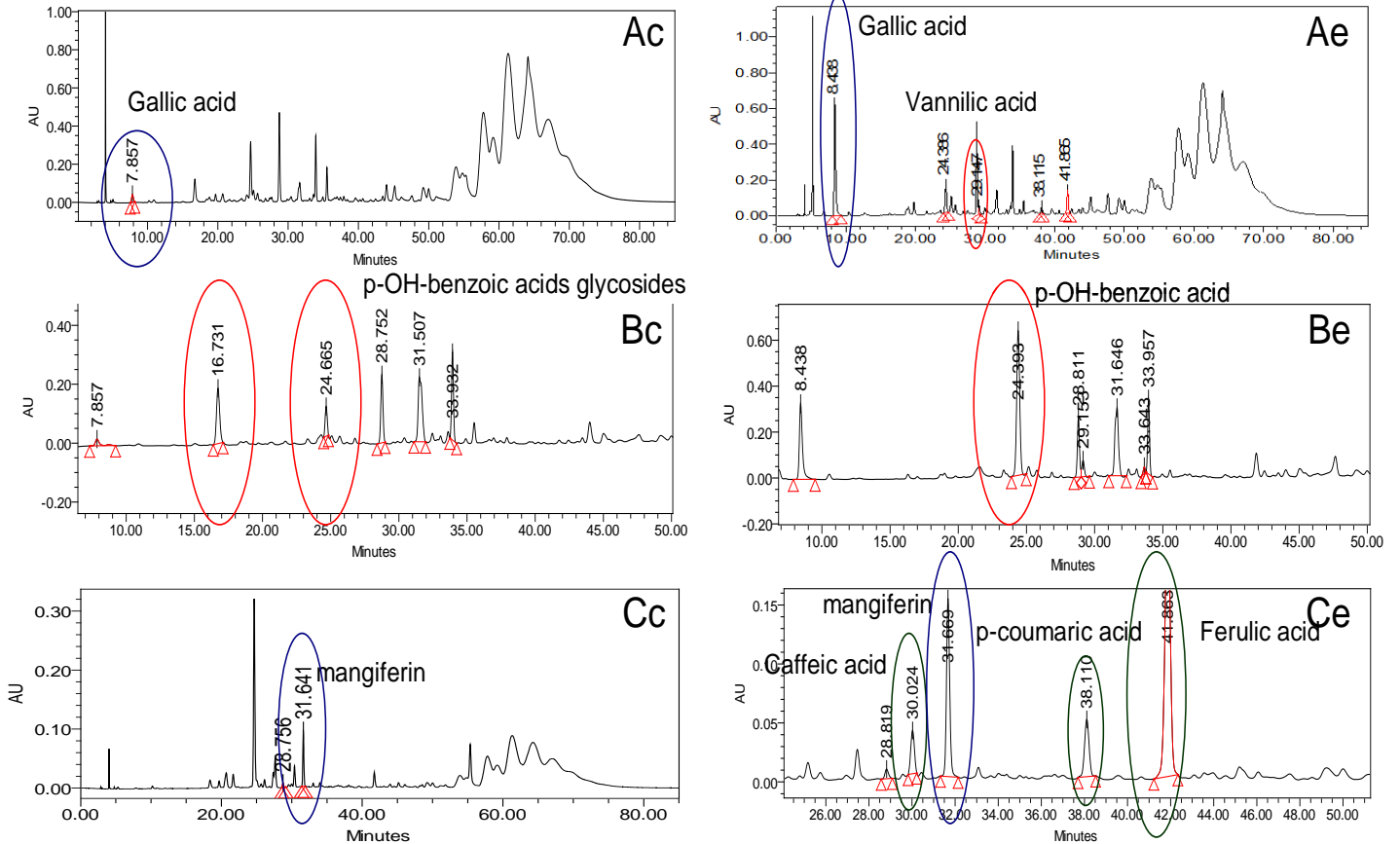
### Resumen no técnico:

Encontramos que los genes afectados por los polifenoles del mango están involucrados en la regulación de la división celular y el crecimiento, y que los compuestos en el mango inducen el llamado “suicidio” de las células de cáncer de colon. Esto significa que los compuestos disparan los mecanismos que ocasionan que las células se autodestruyan, lo cual es un mecanismo común en los compuestos naturales que tienen efectos anticancerígenos.

### Análisis por HPLC-DAD de los polifenoles extraídos de Ataulfo en Monocapas de Células Caco-2

Después de la hidrólisis con  $\beta$ -glucosidasa, el perfil de fenólicos cambio significativamente, tal como se observó en estudios previos para confirmar los efectos de los galotaninos después de la hidrólisis enzimática. El contenido total de fenólicos tuvo una reducción del 24%, lo cual corresponde a una reducción en galoil glucósidos, tal como se confirmó por HPLC (tiempos de retención mayores a 60 min). Estos compuestos de alto peso molecular (hexa-galoil glucósidos y superiores) pudieron estar unidos con la enzima creando un complejo. De hecho, se formó un precipitado y se retuvo durante la elución de fenólicos en el cartucho C18. La hidrólisis incrementó la concentración de ácidos fenólicos, tales como ácido gálico (1327.3% o 13.3 veces) y xantanos, como la mangiferina (40.4% o 1.4 veces). Además, otros ácidos fenólicos fueron liberados de sus glucósidos, tales como ácido cafeico, p-cumárico, vanílico, p-OH-benzoico y ferúlico (Figura 13).

**Figura 13. Cromatogramas a 280 nm (A), 250nm (B) y 320nm (C) del extracto de Ataulfo sin tratamiento (c) e hidrolizado con beta-glucosidasa (e).**



### Absorción de los compuestos fenólicos por la monocapa de células Caco-2

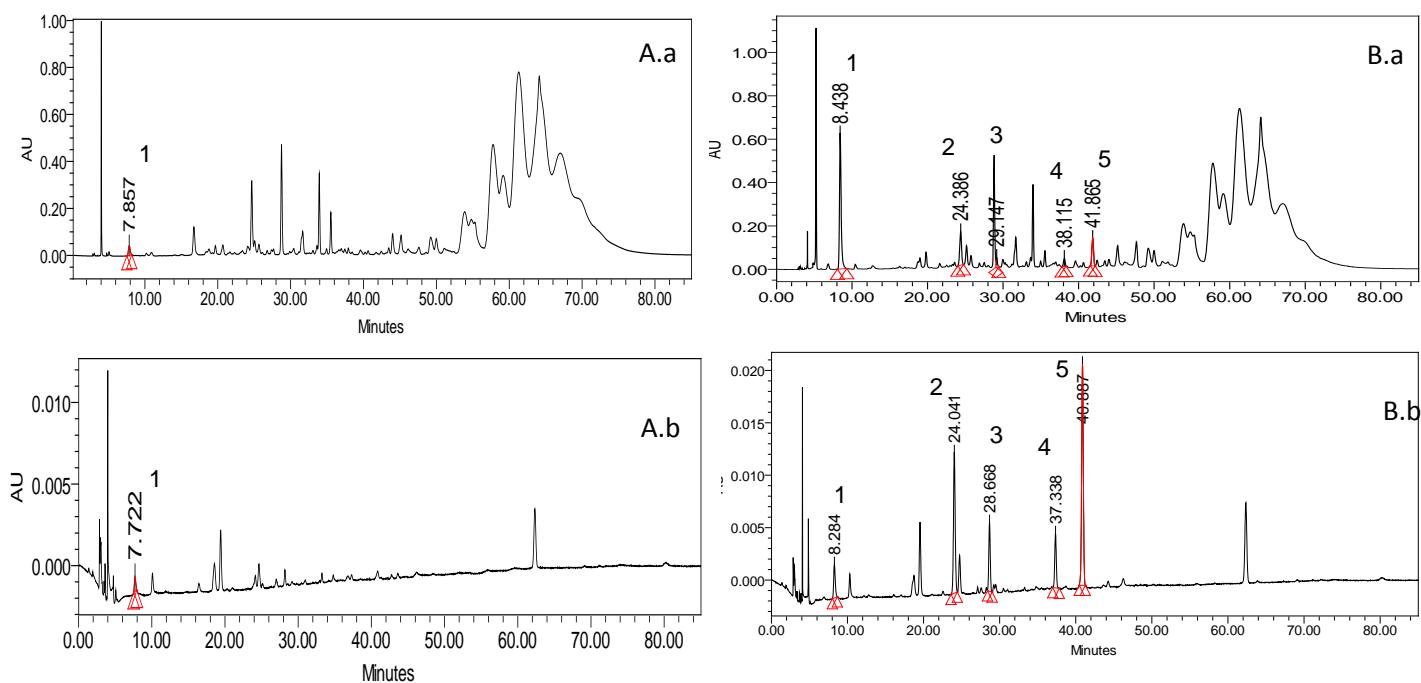
En ambos extractos de Acaulfo (control y tratado con enzima), los compuestos de alto peso molecular como los galotaninos, glucósidos de xantona y glucósidos de flavonoides no fueron encontrados en el lado basolateral, lo cual sugiere que estos compuestos no fueron absorbidos intactos por las células Caco-2. Además, la mangiferina en su forma intacta no fue encontrada en el lado basolateral después de 2 hrs de incubación con ambos extractos. Por otra parte, todos los ácidos fenólicos y sus agliconas fueron absorbidos. La absorción del ácido cafeico fue detectado por HPLC a los 320 nm, aun a bajas concentraciones (Figura 14).

\*Los modelos usados para estimar la cantidad de mango que se debe consumir para obtener los efectos anticancerígenos son de naturaleza teorica, ya que muchos de los factores involucrados no están siendo considerados.

## Absorción de los compuestos fenólicos por la monocapa de células Caco-2

En ambos extractos de Ataulfo (control y tratado con enzima), los compuestos de alto peso molecular como los galotaninos, glucósidos de xantona y glucósidos de flavonoides no fueron encontrados en el lado basolateral, lo cual sugiere que estos compuestos no fueron absorbidos intactos por las células Caco-2. Además, la mangiferina en su forma intacta no fue encontrada en el lado basolateral después de 2 hrs de incubación con ambos extractos. Por otra parte, todos los ácidos fenólicos y sus agliconas fueron absorbidos. La absorción del ácido cafeico fue detectado por HPLC a los 320 nm, aun a bajas concentraciones (Figura 14).

**Figura 14. Cromatogramas a 280 nm del extracto fenólico de Ataulfo sin tratamiento (A) e hidrolizado (B), disuelto en HBSS pH 6.0 (lado apical) (a) o compuestos analizados en el lado basolateral después de 120 min de absorción (b). (1) ácido gálico; (2) derivados de ácido p-hidrobenzoico; (3) ácido vanílico; (4) ácido p-cumárico y (5) ácido ferúlico.**



## Conclusiones

Entre las cinco variedades de mango estudiadas, Ataulfo y Haden fueron identificadas por sus evidentes beneficios en la salud debido a su capacidad antioxidante y anticancerígena. Los polifenoles identificados en la parte comestible de estas variedades de mango comprenden un gran rango de compuestos incluyendo galoil glucósidos de alto peso molecular, glucósidos de flavanol, mangiferina y galotaninos de alto peso molecular. La actividad anticancerígena exhibida por los fitoquímicos del mango es atribuida a la fracción de los polifenoles, ya que la fracción de carotenoides tuvo un efecto inhibitorio dosis-dependiente a dosis relativamente altas que no es factible por medio del consumo de mango. Los galoil glicósidos de bajo peso molecular encontrados en las variedades Ataulfo y Haden a las concentraciones en que se encuentran disponibles en las condiciones fisiológicas inhibieron preferentemente el crecimiento de células humanas SW-480 de cáncer de colon, más que otras líneas celulares estudiadas y que a las células no cancerígenas CCD-18Co. Más aún, a las mismas dosis (5 mg GAE/L) Ataulfo inhibió el crecimiento de las células cancerígenas SW-480 en un ~79%, sin afectar el crecimiento de los miofibroblastos de colon (CCD-18Co).

La regulación genética de la transcripción inducida en SW-480 por los polifenoles de Ataulfo y Haden sugiere que hay una inducción de apoptosis a través de mecanismos intrínsecos y extrínsecos. La vía extrínseca pro-apoptótica puede estar mediada por la caspasa-8, mientras que la vía pro-apoptótica intrínseca podría estar mediada por Bax y Bim. De la misma manera, el arresto del ciclo celular en la fase G2/M estuvo relacionada a la regulación positiva del gen PKMYT1, el cual se ha reportado que regula negativamente la transición del ciclo celular G2/M. Finalmente, los polifenoles de Ataulfo y Haden pueden ejercer protección durante las etapas de iniciación y promoción de la carcinogénesis. Al momento de la iniciación estos compuestos protegieron a las células de colon no-cancerígenas (CCD-18Co) por medio de una reducción en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden causar daño al ADN y mutaciones. Durante la etapa de promoción, los polifenoles redujeron las señales de ROS necesarias para conducir a la proliferación de células tumorales. Cuando son aplicadas a concentraciones que se asemejan a las dosis farmacológicas, estos polifenoles pueden inducir la producción de ROS en cáncer de colon sobre un umbral establecido, contribuyendo por tanto a eliminar las células de cáncer selectivamente. Estos resultados tienen implicaciones clínicas importantes porque muy probablemente los polifenoles encontrados en el mango están disponibles en el colon y son metabolizados por la microflora del intestino, liberando así los compuestos activos en el tejido objetivo. En general, los polifenoles del mango tienen actividad anticancerígena en varias líneas celulares, con una eficacia comparable a los taninos hidrolizables de la granada. Los efectos anticancerígenos del mango son atribuibles a las unidades de ácido elágico. Además indujeron arresto

del ciclo celular y apoptosis en células de adenocarcinoma de colon Caco-2 por medio de la vía mitocondrial (en un rango de concentración de 1-30  $\mu$ M GAE), sin mostrar un efecto negativo en las células de colon normales.

## LITERATURA CITADA

1. WHO, *World Health Statistics 2008*. World health Organization: Geneva Switzerland, 2008.
2. WHO In *An update of the global burden of disease in 2004*, Geneva, Switzerland, 2004; World Health Organization. Geneva, Switzerland, 2004.
3. AmericanCancerSociety Cancer Facts & Figures 2008. <http://www.cancer.org/downloads/STT/2008CAFFfinalsecured.pdf> (03/13/09),
4. Birt, D. F.; Hendrich, S.; Wang, W., Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol Ther* **2001**, 90, (2-3), 157-77.
5. Itsiopoulos, C.; Hodge, A.; Kaimakamis, M., Can the Mediterranean diet prevent prostate cancer? *Mol Nutr Food Res* **2009**, 53, (2), 227-39.
6. Block, G.; Patterson, B.; Subar, A., Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutr Cancer* **1992**, 18, (1), 1-29.
7. Steinmetz, K. A.; Potter, J. D., Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *J Am Diet Assoc* **1996**, 96, (10), 1027-39.
8. Mathew, A.; Peters, U.; Chatterjee, N.; Kulldorff, M.; Sinha, R., Fat, fiber, fruits, vegetables, and risk of colorectal adenomas. *Int J Cancer* **2004**, 108, (2), 287-92.
9. Reddy, L.; Odhav, B.; Bhoola, K. D., Natural products for cancer prevention: a global perspective. *Pharmacol Ther* **2003**, 99, (1), 1-13.
10. Rudolf, E.; Andelova, H.; Cervinka, M., Polyphenolic compounds in chemoprevention of colon cancer - targets and signaling pathways. *Anticancer Agents Med Chem* **2007**, 7, (5), 559-75.
11. Schieber, A.; Ullrich, W.; Carle, R., Characterization of polyphenols in mango puree concentrate by HPLC with diode array and mass spectrometric detection. *Inn Food Sci Emerg Technol* **2000**, 1, 161-6.
12. Barreto, J. C.; Trevisan, M. T.; Hull, W. E.; Erben, G.; de Brito, E. S.; Pfundstein, B.; Wurtele, G.; Spiegelhalder, B.; Owen, R. W., Characterization and quantitation of polyphenolic compounds in bark, kernel, leaves, and peel of mango (*Mangifera indica* L.). *J Agric Food Chem* **2008**, 56, (14), 5599-610.

13. Coates, E. M.; Popa, G.; Gill, C. I.; McCann, M. J.; McDougall, G. J.; Stewart, D.; Rowland, I., Colon-available raspberry polyphenols exhibit anti-cancer effects on in vitro models of colon cancer. *J Carcinog* **2007**, 6, 4.
14. McDougall, G. J.; Dobson, P.; Smith, P.; Blake, A.; Stewart, D., Assessing potential bioavailability of raspberry anthocyanins using an in vitro digestion system. *J Agric Food Chem* **2005**, 53, (15), 5896-904.
15. Borges, G.; Roowi, S.; Rouanet, J. M.; Duthie, G. G.; Lean, M. E.; Crozier, A., The bioavailability of raspberry anthocyanins and ellagitannins in rats. *Mol Nutr Food Res* **2007**, 51, (6), 714-25.
16. Carbonaro, M.; Grant, G.; Pusttai, A., Evaluation of polyphenol bioavailability in rat small intestine. *Eur J Nutr* **2001**, 40, (2), 84-90.
17. Mercadante, A. Z.; Rodriguez-Amaya, D. B., Effects of ripening, cultivar differences, and processing on the carotenoid composition of mango. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1998**, 46, (1), 128-130.
18. Ogawa, K.; Fukamachi, H.; Kato, H., Evaluation of predominant carotenoid contents in domestic 'Irwin' mango cultivated in plastic greenhouses at different sites in Japan. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **2005**, 74, (5), 414-416.
19. Ornelas-Paz, J. D.; Yahia, E. M.; Gardea, A. A., Changes in external and internal color during postharvest ripening of 'Manila' and 'Ataulfo' mango fruit and relationship with carotenoid content determined by liquid chromatography-APCI(+)-time-of-flight mass spectrometry. *Postharvest Biology and Technology* **2008**, 50, (2-3), 145-152.
20. Perkins-Veazie, P.; Collins, J.; Manthey, J. In *Mango variation in vitamin degrees C and beta carotene with cultivar and country of origin*, 2008; Amer Soc Horticultural Science: 2008; pp 1211-1211.
21. Park, S. Y.; Nomura, A. M.; Murphy, S. P.; Wilkens, L. R.; Henderson, B. E.; Kolonel, L. N., Carotenoid Intake and Colorectal Cancer Risk: The Multiethnic Cohort Study. *J Epidemiol* **2009**.
22. Cha, K. H.; Koo, S. Y.; Lee, D. U., Antiproliferative effects of carotenoids extracted from *Chlorella ellipsoidea* and *Chlorella vulgaris* on human colon cancer cells. *J Agric Food Chem* **2008**, 56, (22), 10521-6.
23. Palozza, P.; Bellovino, D.; Simone, R.; Boninsegna, A.; Cellini, F.; Monastera, G.; Gaetani, S., Effect of beta-carotene-rich tomato lycopene beta-cyclase ( tlc<sub>y</sub>-b) on cell growth inhibition in HT-29 colon adenocarcinoma cells. *Br J Nutr* **2008**, 1-8.

24. Palozza, P.; Sestito, R.; Picci, N.; Lanza, P.; Monego, G.; Ranelletti, F. O., The sensitivity to beta-carotene growth-inhibitory and proapoptotic effects is regulated by caveolin-1 expression in human colon and prostate cancer cells. *Carcinogenesis* **2008**, 29, (11), 2153-61.
25. Russo, G. L., Ins and outs of dietary phytochemicals in cancer chemoprevention. *Biochem Pharmacol* **2007**, 74, (4), 533-44
26. Surh, Y. J., Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer* **2003**, 3, (10), 768-80.
27. Greenwald, P.; Clifford, C. K.; Milner, J. A., Diet and cancer prevention. *Eur J Cancer* **2001**, 37, (8), 948-65.
28. Sporn, M. B.; Suh, N., Chemoprevention: an essential approach to controlling cancer. *Nat Rev Cancer* **2002**, 2, (7), 537-43.
29. Swain, T.; Hillis, W., The phenolic constituents of *Prinus domestica*. I. The Quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science and Food Agric* **1959**, 10, 63-68.
30. Talcott, S. T.; Howard, L. R., Phenolic autoxidation is responsible for color degradation in processed carrot puree. *J Agric Food Chem* **1999**, 47, (5), 2109-15.
31. Cao, G.; Alessio, H. M.; Cutler, R. G., Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic Biol Med* **1993**, 14, (3), 303-11.
32. Cao, G.; Verdon, C. P.; Wu, A. H.; Wang, H.; Prior, R. L., Automated assay of oxygen radical absorbance capacity with the COBAS FARA II. *Clin Chem* **1995**, 41, (12 Pt 1), 1738-44.
33. Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Prior, R. L., Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem* **2001**, 49, (10), 4619-26.
34. Meng, Q.; Velalar, C. N.; Ruan, R., Effects of epigallocatechin-3-gallate on mitochondrial integrity and antioxidative enzyme activity in the aging process of human fibroblast. *Free Radic Biol Med* **2008**, 44, (6), 1032-41.
35. Mertens-Talcott, S. U.; Chintharlapalli, S.; Li, X.; Safe, S., The oncogenic microRNA-27a targets genes that regulate specificity protein transcription factors and the G2-M checkpoint in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer Res* **2007**, 67, (22), 11001-11.
36. Ribeiro, S. M. R.; Barbosa, L. C. A.; Queiroz, J. H.; Knodler, M.; Schieber, A., Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties. *Food Chemistry* **2008**, 110, (3), 620-626.



37. Ghosal, S.; Biswas, K.; Chattopadhyay, B. K., Differences in Chemical Constituents of *Mangifera-Indica*, Infected with *Aspergillus-Niger* and *Fusarium-Moniliformae*. *Phytochemistry* **1978**, 17, (4), 689-694.
38. Gil, M. I.; Tomas-Barberan, F. A.; Hess-Pierce, B.; Kader, A. A., Antioxidant capacities, phenolic compounds, carotenoids, and vitamin C contents of nectarine, peach, and plum cultivars from California. *J Agric Food Chem* **2002**, 50, (17), 4976-82.
39. Shahidi, F.; Wanasundara, P. K., Phenolic antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr* **1992**, 32, (1), 67-103.
40. Masibo, M.; He, Q., Major mango polyphenols and their potential significance to human health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2008**, 7, (4), 309-319.
41. Rajendran, P.; Ekambaram, G.; Sakthisekaran, D., Effect of mangiferin on benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis in experimental Swiss albino mice. *Nat Prod Res* **2008**, 22, (8), 672-80.
42. Yoshimi, N.; Matsunaga, K.; Katayama, M.; Yamada, Y.; Kuno, T.; Qiao, Z.; Hara, A.; Yamahara, J.; Mori, H., The inhibitory effects of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone, in bowel carcinogenesis of male F344 rats. *Cancer Lett* **2001**, 163, (2), 163-70.
43. Nair, H. K.; Rao, K. V.; Aalinkeel, R.; Mahajan, S.; Chawda, R.; Schwartz, S. A., Inhibition of prostate cancer cell colony formation by the flavonoid quercetin correlates with modulation of specific regulatory genes. *Clin Diagn Lab Immunol* **2004**, 11, (1), 63-9.
44. Nguyen, T. T.; Tran, E.; Ong, C. K.; Lee, S. K.; Do, P. T.; Huynh, T. T.; Nguyen, T. H.; Lee, J. J.; Tan, Y.; Ong, C. S.; Huynh, H., Kaempferol-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells is mediated by activation of MEK-MAPK. *J Cell Physiol* **2003**, 197, (1), 110-21.
45. Hu, H.; Lee, H. J.; Jiang, C.; Zhang, J.; Wang, L.; Zhao, Y.; Xiang, Q.; Lee, E. O.; Kim, S. H.; Lu, J., Penta-1,2,3,4,6-O-galloyl-beta-D-glucose induces p53 and inhibits STAT3 in prostate cancer cells in vitro and suppresses prostate xenograft tumor growth in vivo. *Mol Cancer Ther* **2008**, 7, (9), 2681-91.
46. Fjaeraa, C.; Nanberg, E., Effect of ellagic acid on proliferation, cell adhesion and apoptosis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Biomed Pharmacother* **2008**.
47. Edderkaoui, M.; Odinkova, I.; Ohno, I.; Gukovsky, I.; Go, V. L.; Pandol, S. J.; Gukovskaya, A. S., Ellagic acid induces apoptosis through inhibition of nuclear factor kappa B in pancreatic cancer cells. *World J Gastroenterol* **2008**, 14, (23), 3672-80.
48. Heber, D., Multitargeted therapy of cancer by ellagitannins. *Cancer Lett* **2008**, 269, (2), 262-8.
49. Pinto, M. M.; Sousa, M. E.; Nascimento, M. S., Xanthone derivatives: new insights in biological activities. *Curr Med Chem* **2005**, 12, (21), 2517-38.

50. Berardini, N.; Carle, R.; Schieber, A., Characterization of gallotannins and benzophenone derivatives from mango (*Mangifera indica* L. cv. 'Tommy Atkins') peels, pulp and kernels by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2004**, 18, (19), 2208-16.
51. Cerda, B.; Ceron, J. J.; Tomas-Barberan, F. A.; Espin, J. C., Repeated oral administration of high doses of the pomegranate ellagitannin punicalagin to rats for 37 days is not toxic. *J Agric Food Chem* **2003**, 51, (11), 3493-501.
52. Seeram, N. P.; Adams, L. S.; Hardy, M. L.; Heber, D., Total cranberry extract versus its phytochemical constituents: antiproliferative and synergistic effects against human tumor cell lines. *J Agric Food Chem* **2004**, 52, (9), 2512-7.
53. Seeram, N. P.; Adams, L. S.; Zhang, Y.; Lee, R.; Sand, D.; Scheuller, H. S.; Heber, D., Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. *J Agric Food Chem* **2006**, 54, (25), 9329-39.
54. Seeram, N. P.; Adams, L. S.; Henning, S. M.; Niu, Y.; Zhang, Y.; Nair, M. G.; Heber, D., In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *J Nutr Biochem* **2005**, 16, (6), 360-7.
55. Gonthier, M. P.; Donovan, J. L.; Texier, O.; Felgines, C.; Remesy, C.; Scalbert, A., Metabolism of dietary procyanidins in rats. *Free Radical Biology and Medicine* **2003**, 35, (8), 837-844.
56. Cerda, B.; Tomas-Barberan, F. A.; Espin, J. C., Metabolism of antioxidant and chemopreventive ellagitannins from strawberries, raspberries, walnuts, and oak-aged wine in humans: identification of biomarkers and individual variability. *J Agric Food Chem* **2005**, 53, (2), 227-35.
57. Dulinska, J.; Gil, D.; Zagajewski, J.; Hartwich, J.; Bodzioch, M.; Dembinska-Kiec, A.; Langmann, T.; Schmitz, G.; Laidler, P., Different effect of beta-carotene on proliferation of prostate cancer cells. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* **2005**, 1740, (2), 189-201.
58. Sacha, T.; Zawada, M.; Hartwich, J.; Lach, Z.; Polus, A.; Szostek, M.; Zdzi Owska, E.; Libura, M.; Bodzioch, M.; Dembinska-Kiec, A.; Skotnicki, A. B.; Goralczyk, R.; Wertz, K.; Riss, G.; Moele, C.; Langmann, T.; Schmitz, G., The effect of beta-carotene and its derivatives on cytotoxicity, differentiation, proliferative potential and apoptosis on the three human acute leukemia cell lines: U-937, HL-60 and TF-1. *Biochim Biophys Acta* **2005**, 1740, (2), 206-14.
59. Lizarraga, D.; Tourino, S.; Reyes-Zurita, F. J.; de Kok, T. M.; van Delft, J. H.; Maas, L. M.; Briede, J. J.; Centelles, J. J.; Torres, J. L.; Cascante, M., Witch hazel (*Hamamelis virginiana*) fractions

and the importance of gallate moieties--electron transfer capacities in their antitumoral properties. *J Agric Food Chem* **2008**, 56, (24), 11675-82.

60. Ma, J.; Luo, X. D.; Protiva, P.; Yang, H.; Ma, C.; Basile, M. J.; Weinstein, I. B.; Kennelly, E. J., Bioactive novel polyphenols from the fruit of Manilkara zapota (Sapodilla). *J Nat Prod* **2003**, 66, (7), 983-6.

61. Zheng, Q.; Hirose, Y.; Yoshimi, N.; Murakami, A.; Koshimizu, K.; Ohigashi, H.; Sakata, K.; Matsumoto, Y.; Sayama, Y.; Mori, H., Further investigation of the modifying effect of various chemopreventive agents on apoptosis and cell proliferation in human colon cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* **2002**, 128, (10), 539-46.

62. Yi, W. G.; Fischer, J.; Krewer, G.; Akoh, C. C., Phenolic compounds from blueberries can inhibit colon cancer cell proliferation and induce apoptosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, 53, (18), 7320-7329.

63. Hudson, E. A.; Dinh, P. A.; Kokubun, T.; Simmonds, M. S.; Gescher, A., Characterization of potentially chemopreventive phenols in extracts of brown rice that inhibit the growth of human breast and colon cancer cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2000**, 9, (11), 1163-70.

64. Chu, K.; Niu, X.; Williams, L. T., A Fas-associated protein factor, FAF1, potentiates Fas-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**, 92, (25), 11894-8.

65. Vermeulen, K.; Van Bockstaele, D. R.; Berneman, Z. N., Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Ann Hematol* **2005**, 84, (10), 627-39.

66. Antonsson, B., Mitochondria and the Bcl-2 family proteins in apoptosis signaling pathways. *Mol Cell Biochem* **2004**, 256-257, (1-2), 141-55.

67. O'Connor, L.; Strasser, A.; O'Reilly, L. A.; Hausmann, G.; Adams, J. M.; Cory, S.; Huang, D. C., Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J* **1998**, 17, (2), 384-95.

68. Hill, R.; Bodzak, E.; Blough, M. D.; Lee, P. W., p53 Binding to the p21 promoter is dependent on the nature of DNA damage. *Cell Cycle* **2008**, 7, (16), 2535-43.

69. Pierini, R.; Kroon, P. A.; Guyot, S.; Johnson, I. T.; Belshaw, N. J., The procyanidin-mediated induction of apoptosis and cell-cycle arrest in esophageal adenocarcinoma cells is not dependent on p21(Cip1/WAF1). *Cancer Lett* **2008**, 270, (2), 234-41.

70. Liu, F.; Rothblum-Oviatt, C.; Ryan, C. E.; Piwnicka-Worms, H., Overproduction of human Myt1 kinase induces a G2 cell cycle delay by interfering with the intracellular trafficking of Cdc2-cyclin B1 complexes. *Mol Cell Biol* **1999**, 19, (7), 5113-23.

71. Schumacker, P. T., Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword. *Cancer Cell* **2006**, 10, (3), 175-6.

