

## Efecto de *Rhizophora mangle* L. sobre la producción de anión superóxido en macrófagos murinos RAW 264.7

### Effect of *Rhizophora mangle* L. on the superoxide anion production in RAW 264.7 murine macrophages

Dra. Janet Sánchez Calero,<sup>I</sup> Dr. Roberto Faure García,<sup>I</sup> Dra. C. Maria Teresa Mitjavila Cors<sup>II</sup>

<sup>I</sup> Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. San José de Las Lajas, Mayabeque, Cuba.

<sup>II</sup> Universidad de Barcelona. Barcelona, España.

---

#### RESUMEN

**Introducción:** el extracto acuoso de la corteza de *Rhizophora mangle* L. (mangle rojo) posee varias propiedades farmacológicas: en el tratamiento de la mastitis bovina, la curación de heridas, las infecciones uterinas y las úlceras gastroduodenales; debido a sus propiedades antiséptica, cicatrizante, antiinflamatoria y antioxidante. Sin embargo, no se han completado los estudios de la actividad antioxidante a todos los niveles de complejidad para dilucidar los mecanismos de acción involucrados en este efecto farmacológico.

**Objetivo:** determinar el efecto del extracto acuoso de *Rhizophora mangle* y su fracción polifenólica sobre la producción de anión superóxido en una línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7, estimulados con forbol 12-myristato 13-acetato o lipopolisacárido.

**Métodos:** la evaluación de la actividad antioxidante del extracto de *Rhizophora mangle* y su fracción polifenólica sobre la producción de anión superóxido en macrófagos RAW 264.7, activados con lipopolisacárido o forbol 12-myristato 13-acetato, se determinó mediante el método de reducción del ferricitocromo c.

**Resultados:** el extracto de *Rhizophora mangle* y su fracción polifenólica, inhibieron la producción de anión superóxido en macrófagos RAW 264.7, activados con ambos tipos de agentes de forma dependiente de la concentración de taninos. La comparación de las líneas de regresión reveló diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), resultando este efecto superior en la fracción para ambos tipos de agentes, y en

presencia de lipopolisacárido para ambas muestras.

**Conclusiones:** el extracto acuoso de *Rhizophora mangle* mostró actividad antioxidante a nivel celular, evidenciada por la reducción del estrés oxidativo en macrófagos mediante la inhibición de la producción de anión superóxido. A su vez se demostró que los compuestos polifenólicos presentes en el extracto fueron los principales responsables de los efectos antioxidantes observados en este estudio.

**Palabras clave:** actividad antioxidante, anión superóxido, macrófagos RAW 264.7, *Rhizophora mangle* L., compuestos polifenólicos.

---

## ABSTRACT

**Introduction:** the aqueous extract of *Rhizophora mangle* L. (red mangrove) bark has some pharmacological properties, that is, the treatment of bovine mastitis, wound healing, uterine infections and stomach ulcers, due to its antiseptic, healing, antiinflammatory and antioxidant properties. However, the studies of antioxidant activity at all complexity levels have not been completed in order to elucidate the mechanisms of action involved in this pharmacological effect.

**Objective:** to determine the effect of *Rhizophora mangle* aqueous extract and its polyphenolic fraction on superoxide anion production in a cellular line of RAW 264.7 murine macrophages, stimulated with phorbol 12-myristate 13-acetate or lipopolysaccharide.

**Methods:** the evaluation of the antioxidant activity of *Rhizophora mangle* extract and its polyphenolic fraction on superoxide anion production in RAW 264.7 macrophages activated with lipopolysaccharide or phorbol 12-myristate 13-acetate was made using the C ferricytochrome reduction method.

**Results:** *Rhizophora mangle* extract and its polyphenolic fraction inhibit the superoxide anion production in RAW 264.7 macrophages activated with both types of agents depending on tannin concentration. The comparison of the regression lines showed significant differences ( $p < 0.05$ ), resulting this effect higher in the fraction for both types of agents, and the presence of lipopolysaccharide for both samples.

**Conclusions:** *Rhizophora mangle* aqueous extract showed antioxidant activity at cellular level, evidenced by reduction of oxidative stress in macrophages, through the inhibition of superoxide anion production. At the same time, it was shown that polyphenolic compounds, present in the extract, were the main responsible for the antioxidant effects observed in this study.

**Key words:** antioxidant activity, superoxide anion, RAW 264.7 macrophages, *Rhizophora mangle* L., polyphenolic compounds.

---

## INTRODUCCIÓN

El estrés oxidativo surge en sistemas biológicos después de una prolongada exposición a oxidantes, o debido a una disminución de la capacidad antioxidante del sistema; y está asociado con la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO), las cuales están implicadas en el origen de numerosas enfermedades como el cáncer, enfermedades cardíacas, arterosclerosis, enfermedades cerebrales y el envejecimiento.<sup>1</sup>

---

Varios estudios han demostrado que las plantas producen potentes antioxidantes y representan una importante fuente natural. En tal sentido, la caracterización química del extracto acuoso de la corteza de *Rhizophora mangle* (L) reveló la presencia de polifenoles (54,78 %), representados en su mayoría por taninos poliméricos (80 %) y taninos hidrolizables (20 %), se destaca la presencia en estos últimos de epicatequina, catequina, ácido clorogénico, ácido gálico y ácido elágico, además se encontraron galotaninos y elagitaninos. De las estructuras no tánicas, se refiere la presencia de carbohidratos (17,5 %) libres y enlazados; ácidos grasos (4,0 %) de cadena larga, saturados e insaturados; fitoesteroles (0,0285 %); componentes volátiles o semivolátiles (70 compuestos) (0.0205 %) y aromas o aceites esenciales no volátiles.<sup>2</sup>

A esta planta se le atribuyen varias propiedades en medicina tradicional, se ha utilizado para el tratamiento de enfermedades de la garganta y en la tuberculosis pulmonar,<sup>3</sup> así como contra la lepra, el asma, el envenenamiento por pescados contaminados, la úlcera péptica, los trastornos digestivos, las infecciones de la piel y las enfermedades venéreas.<sup>4</sup> Además se reportó que tiene actividad antifúngica.<sup>5</sup>

En la última década se demostraron varias propiedades farmacológicas del extracto acuoso de la corteza de *R. mangle*, que incluyen, prevención de la mastitis bovina,<sup>6</sup> eficacia en la curación de las heridas,<sup>7,8</sup> así como propiedades antimicrobianas;<sup>9,10</sup> a su vez resultó exitoso en el tratamiento de las infecciones uterinas<sup>11</sup> y las úlceras gastroduodenales,<sup>12</sup> también se demostraron sus propiedades antiinflamatorias.<sup>13</sup>

Aunque algunas propiedades antioxidantes han sido demostradas previamente, tanto para el extracto acuoso de *R. mangle* como para su fracción mayoritaria constituida por compuestos polifenólicos, como son la actividad secuestradora de radicales DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) y anión superóxido,<sup>14</sup> la capacidad de neutralizar los radicales hidroxilo y propiedades quelantes de iones de hierro,<sup>15</sup> el efecto protector a las principales biomoléculas expuestas a daño oxidativo,<sup>16</sup> la inhibición de la peroxidación lipídica en cerebro de rata, así como la reducción del riesgo de hemólisis inducida por radicales libres.<sup>17</sup> En un modelo de curación de heridas abiertas asépticas en ratas, durante el proceso de reparación de las lesiones, incrementó los indicadores antioxidantes como superóxido dismutasa, catalasa, glutatión reducido y redujo los biomarcadores prooxidantes como el malonildialdehído,<sup>18</sup> pero aún no existe información acerca de sus efectos sobre otras ERO a nivel celular, como por ejemplo, el anión superóxido producido en fagocitos activados, un aspecto que es importante conocer para completar el estudio de las propiedades antioxidantes de esta planta a todos los niveles de complejidad y dilucidar los mecanismos de acción involucrados en este efecto farmacológico. El objetivo del presente trabajo estuvo en determinar el efecto del extracto acuoso de *Rhizophora mangle* L. y su fracción polifenólica sobre la producción de anión superóxido en una línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7, estimulados con forbol 12-myristato 13-acetato (PMA) o lipopolisacárido (LPS).

## MÉTODOS

### *Material vegetal*

Las cortezas de *Rhizophora mangle* L. se colectaron en la zona de la Playa Caimito, La Habana. A un espécimen se le realizó la identificación taxonómica en el Herbario del Jardín Botánico Nacional (La Habana, Cuba).

#### *Preparación del extracto*

El material vegetal fresco se secó al aire, a temperatura ambiente (25 °C). El extracto de *R. mangle* se obtuvo a partir de la decocción acuosa de las cortezas previamente molinadas, en una proporción 1:7,5 (p/v) durante 30 min a 95 °C. El extracto se concentró hasta 24 mg/mL de materia seca y mostró un contenido de taninos superior a 12 mg/mL.

#### *Preparación de la fracción polifenólica*

La fracción polifenólica se obtuvo a partir del extracto acuoso de *R. mangle*, a una concentración de 24 mg/mL, mediante la precipitación con NaCl, en una proporción 1:2,8 (p/v).<sup>19</sup> El NaCl se añadió lentamente al extracto, en condiciones de agitación y calentamiento a 70 °C durante 10 min. El sobrenadante se decantó y las muestras se centrifugaron a 3 500 rpm durante 15 min a temperatura ambiente. El precipitado obtenido se disolvió en agua desionizada y se le realizaron 3 extracciones con n-butanol 1:2 (v/v) para eliminar las sales contaminantes. La fase butanólica se colectó y se efectuó rotoevaporación hasta sequedad para la eliminación del solvente orgánico. El material obtenido se liofilizó y se conservó a - 20 °C.

#### *Determinación del contenido de taninos*

El contenido de taninos en el extracto acuoso de *R. mangle* y su fracción polifenólica se determinó como se describió antes.<sup>20</sup> Con este método colorimétrico se midió la cantidad de taninos precipitados por una proteína estándar, la albúmina de suero bovino (BSA). La mezcla de reacción contenía extracto de *R. mangle*, su fracción polifenólica o ácido tánico como estándar (1 mL) y BSA (1 mg/mL), los cuales inicialmente se mezclaron y después se dejaron en reposo durante 15 min a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugó a 3 000 g durante 15 min, el sobrenadante se desechó y el pellet se disolvió en 15 mL de lauryl sulfato de sodio (1 %) y a 1 mL se le añadieron 3 mL de una solución que contenía lauryl sulfato de sodio (1 %) y trietanolamina (7 %) y 1 mL de FeCl<sub>3</sub> (0,01 M en HCl 0,1 N) e inmediatamente la mezcla se agitó. Después de 15 min, se midió la absorbancia a 510 nm y la concentración de taninos se calculó usando una curva patrón de ácido tánico.

#### *Ensayo de generación de anión superóxido*

La producción de anión superóxido en macrófagos estimulados con 2 tipos de agentes: PMA o LPS, se midió empleando el método de reducción del ferricitocromo c.<sup>21</sup> Macrófagos cultivados en medio DMEM completo (DMEM con L-glutamina 2 mM, piruvato 1 mM, Hepes 20 mM, suero fetal bovino 10 %) se sembraron en placas de 12 pocillos (1·10<sup>6</sup> células/pocillo) y se incubaron durante 3 h a 37 °C, en atmósfera de CO<sub>2</sub> 5 %, para lograr la adhesión de las células a la placa. Transcurrido este tiempo, los pocillos se lavaron 3 veces con solución salina balanceada de Hanks (HBSS). A continuación se añadieron 900 µL HBBS, que contenían 110 mg de ferricitocromo c; 1 mL de N5-(1-iminoetil)-L-ornitina (L-NIO) 1 mM, 100 µL del extracto de *R. mangle* (5,1; 25,7; 51,4 µg/mL de taninos) o su fracción (2,8; 13,9; 27,8 µg/mL de taninos) y 10 µL de PMA o LPS (10 mg/mL). La mezcla de reacción se incubó durante 2 h a 37 °C, en atmósfera de CO<sub>2</sub> 5 %. Se utilizó la superóxido dismutasa (SOD) (6 000 U/mL) como control de la inhibición de la producción de anión superóxido. A continuación se detuvo la reacción poniendo los tubos en baño

de hielo, se centrifugó a 800 *g*, durante 10 min a 4 °C, se recuperó el sobrenadante y se midió su absorbancia a 550 nm. La concentración de anión superóxido se calculó empleando el coeficiente de extinción molar (21 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>) del citocromo c reducido. Los resultados fueron expresados como porcentaje de inhibición de la producción de anión superóxido.

#### *Análisis estadístico*

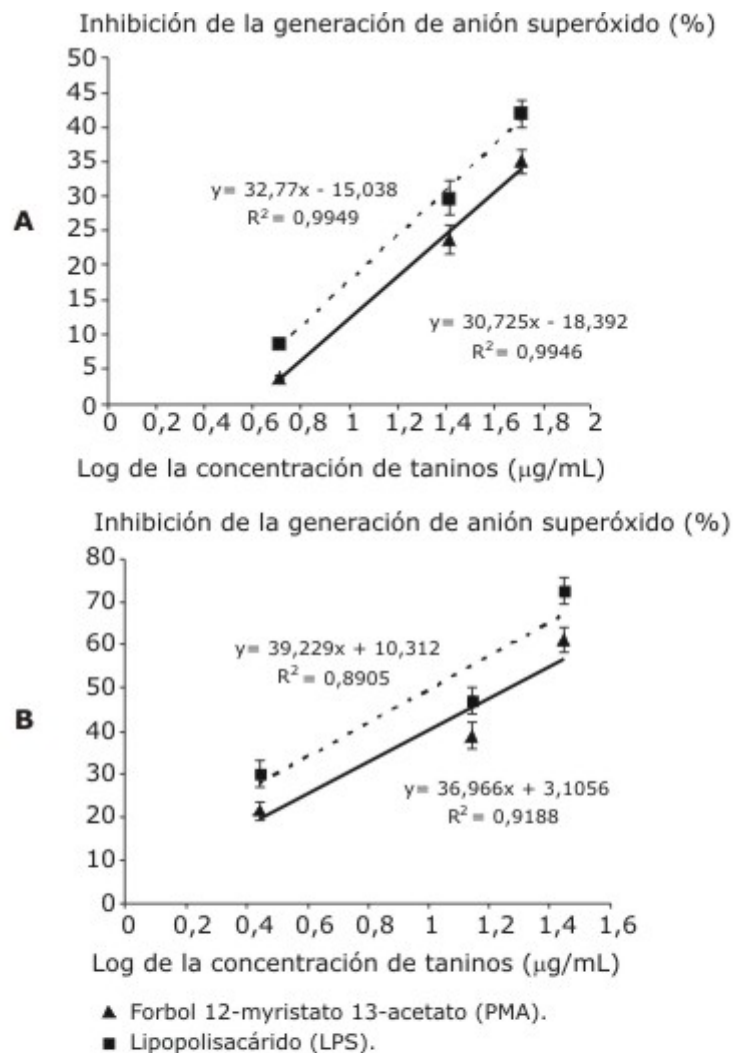
Los resultados experimentales son expresados como la media ± EEM (error estándar de la media). Todas las mediciones se realizaron por triplicado. Los datos fueron analizados mediante un análisis de regresión lineal para obtener las curvas que relacionan la concentración de taninos con el efecto de inhibición de la generación de anión superóxido, ejercido por el extracto de *R. mangle* y su fracción polifenólica, y posteriormente se realizó la comparación de estas, empleando el paquete estadístico *Statgraphics* versión 4.1 para Windows, considerando valores estadísticamente significativos para  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

En la figura 1A y 1B se muestran, respectivamente, el análisis de regresión de la inhibición de la generación de anión superóxido, en macrófagos estimulados con PMA o LPS, en función de la concentración de taninos del extracto acuoso de *R. mangle* y su fracción polifenólica. Ambas muestras disminuyeron la generación de esta ERO en los macrófagos estimulados con ambos tipos de agentes. Este efecto fue dependiente de la concentración de taninos, con valores de índice de determinación ( $r^2$ ) de 0,995 y 0,995 para el extracto, y 0,919 y 0,891 para la fracción, en presencia de PMA y LPS, respectivamente.

La comparación de las líneas de regresión obtenidas en presencia de PMA y LPS reveló diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre estas, tanto en el extracto como en la fracción, resultando en ambas muestras el efecto inhibitorio en la producción de anión superóxido superior en presencia de LPS.

Los valores de la concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) fueron de 168,3 y 96,4 mg taninos/mL para el extracto y 18,5 y 10,3 mg taninos/mL para la fracción, en presencia de PMA y LPS respectivamente. La comparación de las líneas de regresión (extracto vs. fracción) reveló que eran estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) tanto en presencia de PMA como de LPS. La fracción resultó más eficaz que el extracto en reducir la generación de esta ERO en presencia de ambos agentes.



**Fig.** Inhibición de la generación de anión superóxido en una línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7, estimulados con forbol 12-myristato 13-acetato o lipopolisacárido en función de la concentración de taninos del extracto acuoso (A) y la fracción polifenólica (B) de *Rhizophora mangle* L. determinados por el método de reducción del ferricitocromo c. Los datos son expresados como la media  $\pm$  error estándar de la media (EEM) de 3 experimentos independientes.

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo el extracto acuoso de *R. mangle* y su fracción polifenólica mostraron un efecto inhibitorio sobre la producción de anión superóxido en una línea celular de macrófagos estimulada con PMA o LPS, resultando este efecto superior en ambas muestras con el empleo del LPS.

El efecto diferencial de ambas muestras en presencia de diferentes estímulos puede ser debido a que estos agentes activan los macrófagos por diferentes vías de

señalización intracelular para dar lugar a la generación de anión superóxido.<sup>22,23</sup> Estudios previos indican diferentes vías de activación de la NADPH oxidasa, enzima responsable de la producción de anión superóxido en macrófagos; se detecta que en los fagocitos estimulados con PMA, la activación de la NADPH oxidasa es independiente de calcio y está mediada por la proteína quinasa C.<sup>24,25</sup> En contraste, cuando se emplea LPS, las vías de transducción de señales intracelulares que son importantes en la estimulación de los macrófagos son las proteínas tirosina quinasa y las concentraciones de  $Ca^{2+}$ .<sup>26</sup>

Los elevados porcentajes de inhibición en la producción de anión superóxido, en presencia de la fracción polifenólica con ambos tipos de estímulo, indican que los compuestos polifenólicos presentes en el extracto de *R. mangle* son los principales responsables de la inhibición de la generación de esta ERO. En este sentido, numerosos reportes informan acerca de esta actividad biológica en extractos de plantas que contienen polifenoles o en compuestos polifenólicos puros, tanto por el secuestro directo de anión superóxido como regulando la expresión de las enzimas encargadas de la producción de esta ERO, e interactuando con los mediadores que participan en las vías de transducción de señales intracelulares para modular la generación de esta especie radical. Así, los polifenoles del té verde o negro como las teaflavinas y la epigallocatequina galato (EGCG),<sup>27</sup> así como la fracción polifenólica de la cocoa comercial,<sup>28</sup> inhibieron la generación de anión superóxido en células HL-60 estimuladas con PMA y TPA (activador del plasminógeno tisular), otro éster de forbol, respectivamente. Otros estudios han revelado que tanto los polifenoles del té verde como los del té negro disminuyeron la producción de anión superóxido, por un mecanismo basado en la regulación negativa de la expresión de las subunidades p22phox y p67phox de la enzima NADPH oxidasa.<sup>29,30</sup> Otro trabajo reveló que los polifenoles del té verde inhibieron la activación de la proteína quinasa C provocada por un inductor de tumores.<sup>31</sup> También se informó que los polifenoles del té negro y verde, la teaflavina-3,3'-dialato y la EGCG, respectivamente, suprimieron la actividad de la proteína quinasa C inducida por el TPA, por bloquear la translocación de esa proteína del citosol a la membrana.<sup>32</sup>

Estos resultados permiten concluir que el extracto acuoso de *R. mangle* redujo el estrés oxidativo a nivel celular, lo cual se evidencia en la disminución de la generación de anión superóxido en macrófagos. A su vez se demostró que los compuestos polifenólicos presentes en el extracto fueron los principales responsables de los efectos antioxidantes observados en este estudio.

## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por una beca del proyecto PIBARTRI-CYTED y la Universidad de Barcelona, España.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*. 2002; 30(6):620-50.

2. Sánchez LM, Melchor G, Alvarez S, Bulnes C. Caracterización química y toxicológica de una formulación cicatrizante de *Rhizophora mangle* L. Rev Salud Anim. 1998;20(2):69-72.
3. Roig JT. Plantas medicinales, aromáticas y venenosas de Cuba. 2<sup>da</sup> ed. La Habana: Editorial Científico-Técnica, 1988:606-7.
4. Rojas N, Coto O. Propiedades antimicrobianas de extractos de *Rhizophora mangle* L. Rev Cubana Med Tropical. 1978;30(3):181-7.
5. Cáceres A, López B, Juárez X, del Aguila J, García S. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections 2: Evaluation of antifungal activity of seven American plants. J Ethnopharmacol. 1993;40:207-13.
6. Armenteros M. Evaluación de un desinfectante mamario post-ordeño de origen natural [Tesis doctoral] La Habana: Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, Universidad Agraria de La Habana; 1998.
7. Bulnes C, Fernández O, Navarro D, Marrero E, Rueda D, Figueroa O, et al. Healing effect of a red mangrove extract in open aseptic wounds in rat. Rev Salud Anim. 2001;23(2):102-8.
8. Fernández O, Capdevila JZ, Dalla G, Melchor G. Efficacy of *Rhizophora mangle* aqueous bark extract in the healing of open surgical wounds. Fitoterapia. 2002;73:564-8.
9. Montes de Oca N, Reverón Y, González R. Evaluation of antimicrobial activity of different extracts of *Rhizophora mangle* L. using five methods. Rev Salud Anim. 2001;23:1-11.
10. Melchor G, Armenteros M, Fernández O, Linares E, Fragas I. Antibacterial activity of *Rhizophora mangle* bark. Fitoterapia. 2001;72:689-91.
11. Agüero F. Evaluación de un producto natural, a base de *Rhizophora mangle* L. en la terapia de la endometritis bovina [Tesis doctoral] La Habana: Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, Universidad Agraria de La Habana; 2004.
12. Sánchez LM, Rueda D, Gómez BC. Gastric antiulcer effect of *Rhizophora mangle* L. J Ethnopharmacol. 2001;77:1-3.
13. Marrero E, Sánchez J, de Armas E, Escobar A, Melchor G, Abad MJ, et al. COX-2 and sPLA<sub>2</sub> inhibitory activity of aqueous extract polyphenols of *Rhizophora mangle* (red mangrove). Fitoterapia. 2006;77:313-5.
14. Sánchez J, Faure R, Mitjavila MT. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) and superoxide anion scavenging activity of *Rhizophora mangle* L. Bark. Phcog Res. 2010;2:279-84.
15. Sánchez J, Melchor G, Martínez G, Escobar A, Faure R. Antioxidant activity of *Rhizophora mangle* bark. Fitoterapia. 2006;77:141-3.
16. Sánchez J, Martínez G, Faure R. Efecto protector de los polifenoles de *Rhizophora mangle* L. sobre el daño oxidativo a proteínas y ADN. Rev Cubana Plant Med. 2011;16:1-6.



17. Sánchez J, Melchor G, Martínez G, Sánchez LM, Faure R, Vinardel P. Protective effect of *Rhizophora mangle* bark on lipid peroxidation and erythrocyte hemolysis. *Phcog Mag*. 2005;1(3):101-4.
18. Sánchez J, Faure R, Martínez G, Vega E, Fernández O. Propiedades antioxidantes de *Rhizophora mangle* L. y su relación con el proceso de curación de heridas en ratas. *Rev Salud Anim*. 2009;31(3):170-5.
19. Matsuo T, McCord SA. Simple and rapid purification method of condensed tannins from several young fruits. *Agric Biol Chem*. 1980;45:1885-7.
20. Hagermann AE, Butler LG. Protein precipitation method for the determination of tannins. *J Agric Food Chem*. 1978;26:809-12.
21. Johnston RB, Godzik CA, Cohn ZA. Increased superoxide anion production by immunologically activated and chemically elicited macrophages. *J Exp Med*. 1978;148:115-9.
22. Yagawa K, Kaku M, Ichinose Y, Aida Y, Tomoda A. Fc receptor-mediated desensitization of superoxide ( $O_2^-$ ) generation response of guinea-pig macrophages and polymorphonuclear leucocytes. *Immunology*. 1985;55:629-38.
23. Sen CK, Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J*. 1996;10:709-20.
24. Maridonneau-Parini I, Tringale SM, Tauber AI. Identification of distinct activation pathways of the human neutrophil NADPH-oxidase. *J Immunol*. 1986;137:2925-9.
25. Fan L, Santoro D, Palicz A, Li L, Lewis EM, Ledford BG. Activation of protein kinase C via phospholipase D enhances NADPH oxidase activity. *FASEB J*. 2006;20:484.
26. Jian ZJ, Yang Z, Mason GL, Slauson DO, Bochsler PN. Regulation of superoxide anion generation in bovine alveolar macrophages by bacterial lipopolysaccharide, serum proteins, and modulators of signal transduction. *Inflammation*. 1995;19:637-50.
27. Lin JK, Chen PC, Ho CT, Lin-Shiau SY. Inhibition of xanthine oxidase and suppression of intracellular reactive oxygen species in HL-60 cells by theaflavin-3,3'-digallate, epigallocatechin-3-gallate, and propyl gallate. *J Agric Food Chem*. 2000;48:2736-43.
28. Won K, Kumar J, Ok S, Chun KS, Joo H, Surh YJ. Cocoa polyphenols inhibit phorbol ester-induced superoxide anion formation in cultured HL-60 cells and expression of cyclooxygenase-2 and activation of NF- $\kappa$ B and MAPKs in mouse skin *in vivo*. *J Nutr*. 2006;136:1150-5.
29. Ying CJ, Sun XF, Zhang SL, Zhang XP, Mao LM, Zuo XZ, et al. ROS-related enzyme expressions in endothelial cells regulated by tea polyphenols. *Biomed Environ Sci*. 2004;17:33-9.
30. Ying CJ, Xu JW, Ikeda K, Takahashi K, Nara Y, Yamori Y. Tea polyphenols regulate nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase subunit expression and ameliorate angiotensin II-induced hyperpermeability in endothelial cells. *Hypertens Res*. 2003;26:823-8.

31. Komori A, Yatsunami J, Okabe S, Abe S, Hara K, Suganuma M, et al. Anticarcinogenic activity of green tea polyphenols. *Jpn J Clin Oncol.* 1993;23:186-90.

32. Chen YC, Liang YC, Lin-Shiau SY, Ho CT, Lin JK. Inhibition of TPA-induced protein kinase C and transcription activator protein-1 binding activities by theaflavin-3,3'-digallate from black tea in NIH3T3 cells. *J Agric Food Chem.* 1999;47:1416-21.

Recibido: 29 de marzo de 2012.

Aprobado: 7 de abril de 2012.

*Janet Sánchez Calero.* Departamento de Química-Farmacología-Toxicología, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. San José de Las Lajas, Mayabeque, Cuba.  
Correo electrónico: [jsanchez@censa.edu.cu](mailto:jsanchez@censa.edu.cu)