



FACULTAD DE FARMACIA
ESCUELA DE NUTRICIÓN Y DIETÉTICA

EFFECTO ANTIPROLIFERATIVO DE EXTRACTOS PÉCTICOS DE
PLÁTANO *MUSA CAVENDISH* EN LÍNEAS CELULARES TUMORALES

**Tesis para optar al grado académico de Licenciado en Nutrición y título
de Nutricionista**

CAROLINA FERNÁNDEZ LAZCANO

GLORIA FERNÁNDEZ SALTOS

Director de tesis: Dra. Caroline Weinstein O.

Co-director de tesis: Dra. Carmen Soto M.

2016

DEDICATORIA

Dedicado a mi familia que a pesar de la distancia su apoyo y su amor siempre fue incondicional, a mis amigos más cercanos y a Enzo mi compañero de aventuras y de vida quienes se convirtieron en mi familia en este país y me apoyaron durante este proceso, sin ustedes este camino hubiese sido más difícil.

Gloria Fernández Saltos.

Dedicado a mis padres y a mi hermana, a mis amigos y a todas las personas que me apoyaron en este proceso y contribuyeron a culminar esta investigación.

Carolina Fernández Lazcano.

AGRADECIMIENTOS

Luego de este largo y sacrificado proceso hemos culminado nuestra etapa universitaria y con ello hemos logrado uno de nuestros más grandes sueños que nos propusimos antes de empezar esta travesía, ser unas profesionales y convertirnos en el orgullo de nuestra familia.

En primer lugar agradecemos de todo corazón a nuestra directora de tesis la Dra. Caroline Weinstein quien fue un pilar fundamental en el desarrollo de esta investigación, la cual nos entregó conocimientos, ánimo y paciencia a pesar de todas las adversidades y limitaciones que se presentaron a lo largo de este camino los cuales contribuyeron para llevar a cabo una de nuestras grandes metas.

A la profesora Jacqueline Concha por su colaboración y ánimo para realizar este trabajo, a la profesora Carmen Soto que con su sabiduría y consejos nos orientó a ejecutar de la mejor manera este proyecto.

A Mauricio Reyna por su buena disposición para enseñarnos y explicarnos los procesos y técnicas realizadas en el laboratorio, infinitas gracias por tu paciencia y por contestar todas las dudas y preguntas que te hacíamos.

Agradecimientos personales

Agradecerle a Dios por haberme dado las fuerzas y la valentía de enfrentar cada día la distancia de mis seres queridos y mantenerme siempre firme, a mis padres porque sin ellos probablemente no estaría donde estoy, gracias por todo el apoyo, gracias por ser mi ejemplo más grande de fortaleza y sacrificio los amo con mi vida, a Enzo por entregarme su apoyo,

por amarme y por estar junto a mí en las malas y en las peores y a mi amiga Carolina por ser además de mi compañera de tesis, una amiga y una hermana para mí, gracias por brindarme tu amistad y tu cariño a lo largo de estos años sin duda una de las mejores personas que la vida me regalo.

Gloria Fernández Saltos.

Agradezco profundamente a mis padres, los cuales me entregaron todas las herramientas para poder emprender este camino brindándome un gran apoyo durante todo este tiempo, en donde tuve momentos tanto difíciles como buenos estando siempre junto a mí para alentarme a continuar y cumplir mis objetivos. Sin ustedes no sería lo que hoy soy, los amo.

A mi hermana, la cual fue partícipe de este proceso y del diario vivir acompañándome y apoyándome durante estos años. Gracias por ser la mejor hermana.

A mi familia, amigos y a todos aquellos que me entregaron su cariño, buenas vibras y energías favoreciendo positivamente mi estado emocional.

A mi amiga y compañera de tesis, Gloria quien se convirtió en el transcurso de mi vida universitaria como una hermana. Agradezco al destino por unirnos.

Por último, le dedico este logro cumplido a mis abuelos los cuales se sentirían orgullosos de todo lo realizado en estos años de universidad, sin lugar a dudas en donde estén sé que me guiaron y cuidaron para terminar esta etapa de mi vida de la mejor manera.

Carolina Fernández Lazcano.

INDICE

DEDICATORIA	1
AGRADECIMIENTOS	2
INDICE DE FIGURAS	6
INDICE DE TABLAS	7
RESUMEN	8
MARCO TEÓRICO	10
1.1 Introducción	10
1.1.1 Cáncer: Realidad mundial, nacional y tratamiento	10
1.1.2 Pectinas: relación con salud y nutrición	14
1.1.3 Pectinas: Estructura y clasificación	14
1.1.4 Estructura de pectinas y actividad anti-cáncer	17
1.1.5 Mecanismo propuesto para la acción antiproliferativa	19
1.1.5 Métodos y fuentes de extracción de pectinas	20
HIPOTESIS	24
OBJETIVOS	25
3.1 Objetivo General	25
3.2 Objetivos Específicos	25
MATERIALES Y MÉTODOS	26
4.1 Materia Prima	26
4.2 Caracterización de pectinas	26
4.2.1. Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR, por sus siglas en inglés) ...	26
4.2.2. Determinación del contenido de ácido galacturónico	28
4.3 Evaluación de la actividad antiproliferativa <i>in vitro</i>	28
4.3.1 Líneas celulares	28
4.4 Análisis estadístico	30
RESULTADOS	31
5.1 Características de los extractos pécticos	31
5.1.1 Acido Galacturónico	31
5.1.2 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier	31

5.2 Ensayo de viabilidad celular	32
DISCUSIÓN	36
CONCLUSIÓN	41
REFERENCIAS	42
ANEXOS	49

INDICE DE FIGURAS

Figura 1-1. Estructura propuesta de pectina.....	16
Figura 4-1. Resumen de análisis de productos obtenidos a partir de la extracción.....	26
Figura 5-1. Espectro de absorción infrarrojo para pectina de <i>Musa Cavendish</i> , extracto 1 (línea superior) y extracto 2 (línea inferior).....	32
Figura 5-2. Proliferación celular de células MCF-7 expuestas a diferentes concentraciones de pectina ácida de plátano obtenida por la extracción 1 (A-C) y extracción 2 (B-D).....	33
Figura 5-3. Proliferación celular de células SH-SY5Y expuestas a diferentes concentraciones de pectina ácida de plátano obtenida por la extracción 1 (A-C) y extracción 2 (B-D).....	34
Figura 9-1. Curva de calibrado para determinación de ácido galacturónico.....	50

INDICE DE TABLAS

Tabla 5-1. Contenido de ácido galacturónico de las pectinas ácidas de cáscara de plátano <i>Musa cavendish</i> obtenidas a partir de tratamiento químico.....	31
Tabla 5-2. Valores promedio de los extractos pécticos para las líneas celulares MCF-7 y SH-SY5Y a una concentración de 2,5 mg/mL.....	35
Tabla 9-1. Diluciones utilizadas en la curva de calibrado para cuantificar el contenido de ácido galacturónico.....	50

RESUMEN

Las pectinas son polisacáridos presentes en frutas y vegetales. Su estructura está compuesta por homogalacturonano y ramnogalacturonano I y II. Hay evidencia que vincula formas modificadas de pectinas con actividad anti-cáncer por inhibición de galectina-3, proteína relacionada con la formación de tumores y metástasis. En Chile, el cáncer es una enfermedad que representa la segunda causa de muerte. En esta tesis se postula que los extractos pécticos de plátano *Musa cavendish* presentan actividad antiproliferativa sobre las líneas celulares MCF-7 y SH-SY5Y, debido a su alta expresión de galectina-3. Se seleccionó cáscara de plátano por presentar un alto contenido de fibra dietética soluble cuya mayor parte la conforma la pectina y además porque se generan cantidades importantes de este residuo sin valor comercial. A partir de la materia prima se obtuvo dos extractos los cuales fueron caracterizados químicamente mediante contenido de ácido galacturónico y grado de metilación por espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier. Se evaluó la actividad biológica de los extractos en un ensayo de proliferación basado en la reducción de la molécula Resazurin por células viables. Se utilizó las líneas celulares MCF-7 y SH-SY5Y y se efectuó dos experimentos independientes para cada extracto y línea celular. Los extractos pécticos evaluados exhibieron actividad antiproliferativa para ambas líneas celulares. Sin embargo, los resultados son más promisorios para la línea celular SH-SY5Y con el extracto 2, concluyendo que la actividad antiproliferativa depende de la expresión relativa de galectina-3. Este estudio sienta las bases para futuras investigaciones en que se profundice en la relación estructura actividad de las pectinas.

ABSTRACT

Pectins are polysaccharides found in fruits and vegetables. Its structure is composed of homogalacturonan and Rhamnogalacturonan I and II. There is evidence linking modified forms of pectins with anti-cancer activity by inhibition of galectin-3 protein associated with tumor formation and metastasis. In Chile cancer is a disease that represents the second cause of death. In this thesis, it is postulated that the pectic *Musa cavendish* banana extracts have antiproliferative activity on the MCF-7 and SH-SY5Y cell lines, due to its high galectin 3 expression. Banana peel was selected because presents a high content of soluble fiber diet which is mostly conformed by pectin and because significant amounts of this raw material are generated with no commercial value. From the raw material two extracts which were chemically characterized by galacturonic acid content and degree of methylation by infrared Fourier transform spectroscopy. A biological activity of the extracts was performed by a proliferation assay based on the reduction of the resazurin molecule by viable cells. The MCF-7 and the SH SY5Y were utilized and two independent experiment were performed for each extract and cell line. The pectic extract evaluated showed antiproliferative activity for both cell lines. However the most promising results were for the SH-SY5Y cell line with the extract 2, concluding that the antiproliferative activity depends of the relative expression of galectin-3. This study serves to establish the basis for future research that deepens structure activity analysis for pectins.

CAPÍTULO 1

MARCO TEÓRICO

1.1 Introducción

1.1.1 Cáncer: Realidad mundial, nacional y tratamiento

El cáncer es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier órgano; también se le denomina tumor maligno o neoplasia maligna que constituye una importante causa de muerte a nivel mundial. (Ferlay *et al.*, 2013).

En el año 2012 hubo 14,1 millones de nuevos casos de cáncer y 8,2 millones de muertes por cáncer en todo el mundo. En regiones menos desarrolladas se produjo un 57% de casos nuevos de cáncer y un 65% de las muertes por cáncer ocurrieron en dichas regiones (Ferlay *et al.*, 2013).

En Chile, en el año 2007 el cáncer ocupó el segundo lugar dentro de las causas de muerte luego de las enfermedades del sistema circulatorio. Las estimaciones por localización del cáncer muestran que en los hombres las seis primeras localizaciones corresponden a cáncer de próstata, estómago, cutáneo no melanoma, tráquea, bronquio y pulmón, colon y testículo. En cambio, en las mujeres las seis primeras localizaciones corresponden a cáncer de mama, seguida por cutáneo no melanoma, vesícula biliar, cuello uterino, estómago y colon (Díaz *et al.*, 2012).

En cuanto al cáncer en pediatría, para Chile se estiman 500 casos nuevos por año. Con los protocolos actuales de tratamiento, aproximadamente el 65% de los niños en nuestro país se cura de cáncer según la última revisión de octubre 2004 (Villarroel, 2006).

El neuroblastoma es uno de los tumores sólidos malignos más frecuentes en los niños, se origina de la cresta neural durante la embriogénesis y puede aparecer en cualquiera de los sitios anatómicos a lo largo de la cadena ganglionar simpática desde el cuello a la pelvis, así como en la glándula suprarrenal. Es el tumor más frecuente en el período de lactante, con un 95% de los casos diagnosticado antes de los diez años de edad y el 90% en menores de cinco años (Rosti6n *et al.*, 2005). La incidencia del neuroblastoma varía en las distintas regiones del mundo y también en relación a los grupos etarios. Así, en la casuística del grupo cooperativo chileno Programa Infantil de Drogas Antineoplásicas (PINDA) el neuroblastoma representa un 4,2% de las neoplasias de la infancia. Por otro lado, en la población occidental sólo alrededor de 0,5 a 1% de todos los cánceres ocurren en menores de quince años (Villarroel, 2006). La incidencia estimada es de 12-14 casos de cáncer por 100.000 niños menores de quince años por lo que para Chile, se estiman 440 a 540 casos nuevos por año. A pesar de su baja frecuencia esta patología tiene un gran impacto, ya que es la segunda causa de muerte en el grupo entre los cinco y quince años precedida sólo por accidentes. La tasa de mortalidad por cáncer en el año 2000 fue de 3,7 por 100.000 niños (Villarroel, 2006).

Mientras que para cáncer de mama las estimaciones a nivel mundial de mortalidad e incidencia obtenidas a través de la GLOBOCAN 2008, este cáncer aparece como primera causa de muerte en la mujer. Esta misma fuente estimó que anualmente fallecen 458.367

mujeres por esta causa, alcanzando una tasa estandarizada por edad de 12,5 por 100.000 mujeres. La tasa de incidencia estandarizada por edad fue estimada en 39 por 100.000 mujeres con un total de 1.383.523 casos nuevos en el mundo (Prieto, 2011).

En Chile, los datos oficiales de mortalidad publicados por el Departamento de Estadísticas e Información de Salud del Ministerio de Salud (Minsal) indican que el 2008, el cáncer de mama alcanzó una tasa de mortalidad observada de 14,5 por 100.000 mujeres.

La incidencia estimada por el Programa Nacional de Cáncer de Mama alcanza a alrededor de 3.100 casos nuevos y presenta como limitación el que corresponde sólo a datos de pacientes diagnosticados y tratados en el Sistema Público de Salud, sin embargo corresponde al 73,5% de la población chilena. Estos casos son informados en la Pauta de Evaluación anual del Programa de Cáncer de Mama, la cual es consolidada en la Unidad de Cáncer del Minsal. En el año 2009 completaron la información referida a incidencia 27 de los 29 Servicios de Salud. Según esta fuente, los casos nuevos han aumentado en forma sostenida en el tiempo en el Sistema Público, sin embargo, no se dispone de información oficial de los casos nuevos del Sistema Privado de Salud (Prieto, 2011).

Por otra parte, es necesario mencionar que una de las características de las principales enfermedades no transmisibles es que comparten un grupo de factores de riesgo, por lo que al realizar intervenciones sobre alguno de ellos es posible repercutir en todas las patologías asociadas a éste. Dentro de los factores de riesgo conocidos para el cáncer se encuentran factores hereditarios y de la historia personal y familiar de cáncer, sumado a los factores relacionados con la dieta y la nutrición, los hábitos no saludables como consumo de tabaco y alcohol y los agentes infecciosos (como los virus de la hepatitis B y C o el

papiloma virus). A los anteriores se agrega la exposición a sustancias químicas cancerígenas, a radiaciones ionizantes y el uso de algunas drogas terapéuticas, entre otros (Díaz *et al.*, 2012).

El tratamiento del cáncer requiere una cuidadosa selección de una o más modalidades terapéuticas. Las principales son la cirugía, la radioterapia o la quimioterapia, cuyo objetivo terapéutico consiste en erradicar las células tumorales o prolongar considerablemente la supervivencia o mejorar la calidad de vida del paciente a través de la curación, control y paliación. En el caso de los tumores sólidos, la cirugía puede ser el tratamiento de primera elección. La quimioterapia utiliza fármacos para destruir las células cancerosas. Las células cancerosas crecen y se dividen rápidamente y el tratamiento con quimioterapia pretende detener o retrasar el crecimiento de dichas células. No obstante, no se trata de un tratamiento selectivo frente a células tumorales, sino que además afectará a las células sanas que crecen y se dividen rápidamente. También esto ocurre con la radioterapia (Porth, 2009).

Una alternativa a las terapias antes mencionadas es el uso de productos naturales que potencialmente pueden co-ayudar e incluso conformar el arsenal terapéutico para el tratamiento de esta patología. Son ejemplos de esto último, actinomicina D, antraciclinas, alcaloides de la vinca y taxol (Nobili *et al.*, 2009). La investigación en esta área se ha ampliado hacia otros productos naturales, en la búsqueda de moléculas que curen tipos de cáncer con baja tasa de remisión. Es así como existen investigaciones orientadas al análisis de polisacáridos como agentes anti-cáncer (Zhong *et al.*, 2012). Entre los polisacáridos que han recibido la atención de los investigadores se encuentran las pectinas que han sido

propuestas como tratamiento alternativo del cáncer en el marco de la Medicina Integrativa (The Authority on Integrative Medicine).

1.1.2 Pectinas: relación con salud y nutrición

Las pectinas son polisacáridos que forman parte de la pared celular de frutas y vegetales y están consideradas dentro del grupo de fibra dietética soluble. Las pectinas son ampliamente utilizadas en la industria alimenticia, en la que se usan como agente gelificante, espesante, texturizante, emulsionante y estabilizante. Por otra parte, se han usado en productos farmacéuticos y biomédicos por su atractivo como un biopolímero no tóxico, biocompatible y biodegradable (Zhang *et al.*, 2015).

El interés fundamental de las pectinas en nutrición se debe a sus características de “fibra soluble”, al absorber agua constituyen una preparación espesante del contenido gástrico y regulador del tránsito gastrointestinal. Por otra parte, al fermentar con bastante rapidez favorecen el crecimiento de una microbiota saprofita más apropiada aumentando así el volumen fecal. Por ello, se utilizan en el tratamiento sintomático de las regurgitaciones del lactante y diarreas (Gil, 2010).

1.1.3 Pectinas: Estructura y clasificación

La pectina presenta una estructura compleja constituida por homogalacturonano (HG) el componente más predominante conocido también como la “región lisa” (smooth region) de la pectina, compuesto principalmente de un homopolímero parcialmente metil-esterificado (1-4) α -D-ácido galacturónico (GaIA). Un segundo componente bien caracterizado constituye la “región rugosa” (hairy region) o región ramnogalacturonano I

(RGI). RGI consiste en un esqueleto compuesto por un disacárido repetido $[-4)\text{-}\alpha\text{-D-GaIA-(1,2)\text{-a-L-Rha-(1)]}_n$ constituida de residuos GaIA y ramnosa (Rha). RGI es una estructura altamente ramificada con azúcares neutros (principalmente un L-arabinosa y $\beta\text{-D-galactosa}$) cadenas laterales (arabinanos, galactanos y arabinogalactanos) unidos a los residuos de ramnosa. Los extractos de pectina también pueden contener xilogalacturonano (XG) y ramnogalacturonano II (RGII) una estructura ramificada altamente compleja que aparece con mucha menos frecuencia que la RGI (Maxwell *et al.*, 2012).

Convencionalmente la estructura de las pectinas se presenta como una estructura compuesta que consta de RGI, RGII y XG conectado dentro de la columna vertebral HG (**Figura 1-1, A**). Una visualización directa y reciente de la estructura molecular de las pectinas, ha revelado una ramificación parcial de las regiones HG y la presencia de estructuras globales complejas (Round *et al.*, 2010). Tales estudios han propuesto una nueva estructura alternativa en la que HG puede estar presente como cadenas laterales de RGI (**Figura 1-1, B**) (Vincken *et al.*, 2003). A su vez, existen formas de polisacáridos pécticos (MP por sus siglas en inglés, modified pectins), que comúnmente se producen a partir de una despolimerización por una modificación enzimática o un tratamiento con álcali, causando β -eliminación que escinde y desesterifica la columna vertebral de HG, generando oligómeros de ácido poligalacturónico y regiones RGI. Puede requerirse un tratamiento posterior para escindir ciertos azúcares neutros, conduciendo preferentemente a la eliminación de los residuos de arabinosa y la liberación de RGI modificada (**Figura 1-1, C**).

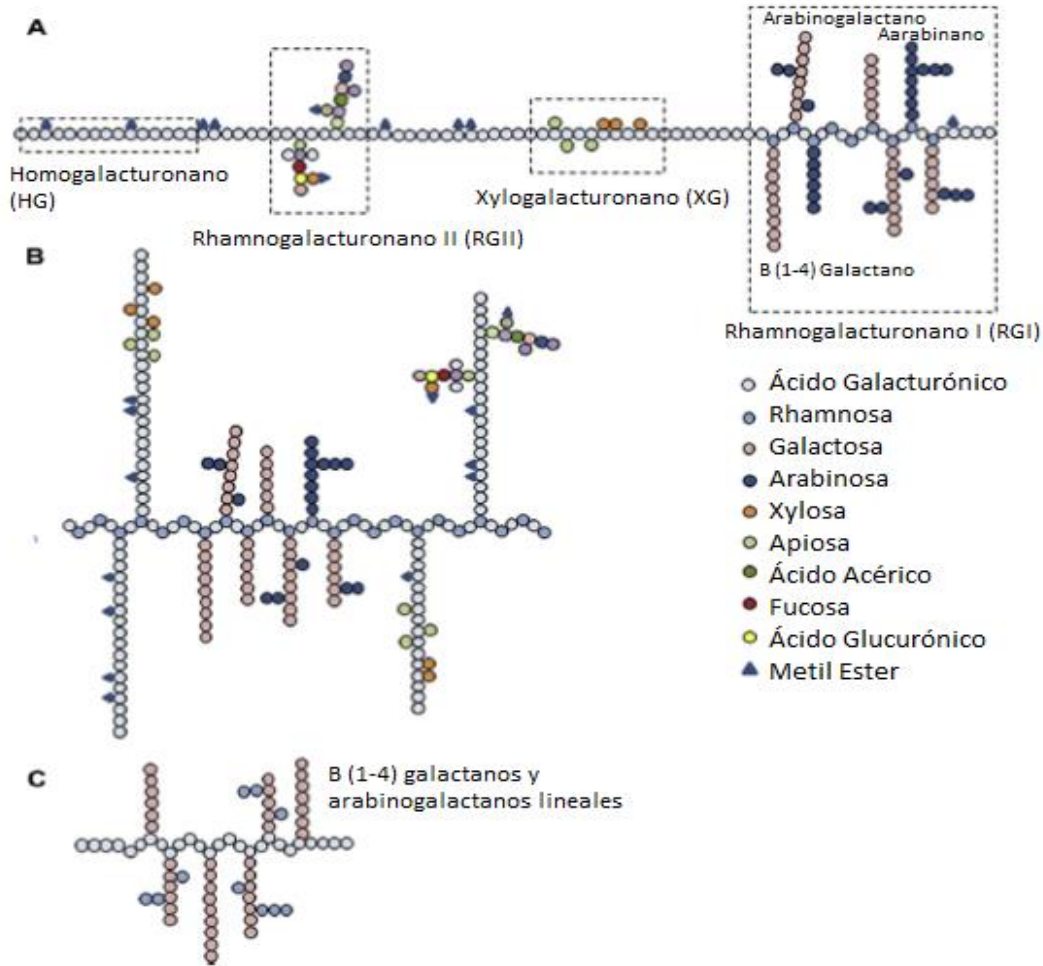


Figura 1-1. Estructuras propuestas de pectina. A. Pectina que presenta la región RGI unida a la región HG parcialmente metil-esterificadas y también contiene RGII y XG. B. Estructura alternativa en la cual HG son cadenas laterales de RGI. C. Pectina modificada RGI (adaptado de Maxwell *et al.*, 2012).

Las pectinas pueden ser clasificadas de acuerdo a su grado de esterificación, que se relaciona con la cantidad de metoxilos y por su naturaleza acídica. En primer lugar, una característica importante de la región homogalacturonano es el “grado de esterificación” (DE, siglas en inglés de degree of esterification). Muchas de las propiedades funcionales de

la pectina (comportamiento reológico, gelificación o la unión de iones metálicos) son dependientes de sus características estructurales tales como: peso molecular, DE o distribución de los grupos carboxilo libres y metoxilados dentro de las cadenas de galacturonano (Dongowski *et al.*, 2002). Las pectinas de alto metoxilo poseen un DE sobre un 50% y las pectinas de bajo metoxilo poseen un DE bajo un 50% (Liu *et al.*, 2010). Además, las pectinas según la cantidad de HG o regiones RGI y RGII, se pueden clasificar en ácidas cuando predomina la región HG (la acidez está dada por GaIA) y neutras si predominan las regiones RGI o RGII. Para esta última, su característica neutra se debe a la presencia de azúcares neutros en las cadenas laterales de arabinanos y arabinogalactanos que neutralizan el carácter ácido de la cadena principal compuesta por residuos de GaIA.

1.1.4 Estructura de pectinas y actividad anti-cáncer

Las pectinas comunes no modificadas que se encuentran en las frutas o vegetales, difícilmente pueden ser absorbidas por el organismo debido a su gran tamaño. Es por esta razón que se modifican para aumentar su absorción al disminuir su peso molecular. Existen antecedentes que vinculan las pectinas modificadas (MP por sus siglas en inglés, modified pectins) con actividad anti-cáncer. Es por ello, que la pectina cítrica y la pectina cítrica modificada son útiles en la prevención y tratamiento de cáncer metastásico especialmente en tumores sólidos como el melanoma y los cánceres de próstata, de colon y de mama (Nicholas, 2009). Además, la pectina cítrica modificada (MCP por sus siglas en inglés, modified citrus pectin) inhibe la progresión del cáncer mediante la supresión de la angiogénesis y la metástasis de varios tipos de cáncer en modelos animales (Glinsky y Raz, 2009; Johnson *et al.*, 2007; Morris *et al.*, 2013).

También se ha demostrado que el pre-tratamiento o administración oral de pectinas cítricas (CP por sus siglas en inglés, citrus pectins) o pectinas cítricas modificadas (MCP) antes de la quimioterapia sería una estrategia para mejorar la respuesta a la terapia anti-cáncer (Fuchs, 2004). Un resultado similar fue informado por Hayashi *et al.*, (2000), cuyos datos sugieren que la administración oral de MCP (0,8 y 1,6 mg mL⁻¹) en ratones Balb/c implantados con células de cáncer de colon-25 (humano) redujo el tamaño del tumor en un 50-75% en comparación con los ratones del grupo control.

En otra investigación (Jackson *et al.*, 2007) se evidenció que las pectinas inducen la apoptosis en células de cáncer de próstata andro-sensible (LNCaP) y andrógeno-independiente (LNCap C4-2).

Por otra parte, se ha demostrado que la pectina cítrica tratada térmicamente (HTCP por sus siglas en inglés, heat treatment of citrus pectin) conduce a la inducción de niveles significativos de apoptosis en comparación con la pectina en polvo fraccionada (FPP por sus siglas en inglés, fractionated pectin powder), lo que sugiere un medio para generar estructuras pécticas con propiedades pro-apoptóticas. Estos resultados indican que los elementos estructurales específicos dentro de la pectina son responsables de la actividad apoptótica y que esta estructura se puede generar o enriquecerse mediante tratamiento térmico de la CP (Jackson *et al.*, 2007).

Por otro lado, hay evidencia en la literatura de que pectinas ácidas presentan mejor actividad antiproliferativa por sobre las pectinas de carácter neutro (Cobs *et al.*, 2015). Además, en una investigación desarrollada con MCP neutras (MCP-N) y MCP ácidas (MCP-A) para estudiar la actividad bloqueadora sobre un receptor celular llamado

galectina-3 (Gal-3); tanto pectinas neutras como ácidas han demostrado capacidad de inhibir a este último. Sin embargo, MCP-A mostró una inhibición más potente que la MCP-N (Gao *et al.*, 2012). Una explicación propuesta para los efectos anticancerígenos de las pectinas, es que estos polisacáridos modificados contienen elementos estructurales que pueden unirse e inhibir la Gal-3.

1.1.5 Mecanismo propuesto para la acción antiproliferativa

Gal-3 es una proteína de múltiples acciones, entre las que se describen la actividad prometastásica. Se encuentra asociada con el desarrollo y la malignidad del carcinoma pancreático, carcinoma hepatocelular, cáncer colorrectal, carcinoma de células renales, cáncer mamario, cáncer de pulmón, melanoma, linfoma y glioblastomas (Song *et al.*, 2014). Las galectinas son miembros de las lectinas animales que son una familia de proteínas de unión a carbohidratos. Se han identificado catorce miembros de la familia de galectina y clasificado en tres subgrupos basados en su estructura: **A.** Prototipo (galectina -1, -2, -5, -7, -10, -11, -13 y -14); **B.** Tipo quimera (galectina-3); **C.** Tipo tandem repeat (galectina -6, -8, -9 y -12). Se ha sugerido que los miembros de esta familia desempeñan diferentes funciones en una variada gama de respuestas biológicas, tales como la regulación del crecimiento celular, el ciclo celular y la apoptosis. Gal-3 es una lectina de 31 kDa que se compone de tres dominios estructurales: un dominio N-terminal de 12 aminoácidos que contiene un sitio de fosforilación en serina que es importante para regular su señalización celular, una secuencia similar al colágeno rica en glicina, prolina y tirosina; y un dominio de reconocimiento de carbohidratos C-terminal (CRD) que consiste en 140 residuos de aminoácidos (Paniagua, 2014).

Gal-3 se encuentra localizada en núcleo, citoplasma y en la superficie celular. También, puede ser secretada y aparecer en circulación (Song *et al.*, 2014). En el espacio extracelular, Gal-3 puede unirse a glicoconjugados en la superficie celular y además formar dímeros que produzcan la adhesión de células. Gal-3 se expresa ampliamente en las células cancerosas, así como en células epiteliales e inmunes. La expresión de esta proteína es mayor en las células tumorales y se correlaciona con la invasión tumoral y el potencial metastásico de varios tipos de cáncer. Se ha demostrado que Gal-3 es una proteína oncogénica y multifuncional que regula el crecimiento, la adhesión y la proliferación celular, además de la angiogénesis y la apoptosis (Fukumori *et al.*, 2007). También, se sugiere que la expresión de Gal-3 contribuye en parte a la quimiorresistencia de las células cancerígenas (Wang *et al.*, 2010) y la inhibición de Gal-3 por pectinas podría resensibilizar estas células al tratamiento farmacológico, sumado a que las pectinas son consideradas como un producto seguro según la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA por sus siglas en inglés, Food and Drug Administration) y al presentar actividad apoptótica vinculada a Gal-3, podrían ser un tratamiento más selectivo frente al cáncer que se relacione con los del tipo que presentan sobreexpresión de Gal-3.

1.1.5 Métodos y fuentes de extracción de pectinas

Se ha observado que el método de obtención de pectinas influye en su estructura y propiedades, incluyendo la actividad antiproliferativa (Cobs *et al.*, 2015). Existen diversos métodos de extracción de pectinas. El método convencional utiliza soluciones acuosas acidificadas con ácidos minerales como ácido nítrico, sulfúrico y clorhídrico, a pH en el rango de 1 a 3, temperaturas entre los 60-100°C y a un tiempo de 20 a 360 minutos (Yapo,

2009). Luego, se utiliza alcohol (etanol, metanol o isopropanol) para precipitar y obtener la pectina (Seggiani *et al.*, 2009). También se han estudiado métodos enzimáticos en que se utilizan pectinasas con actividad despolimerizante (hidrolasas, liasas) y desesterificante (Kashyap *et al.*, 2011).

Por otra parte, además del método de extracción las especies vegetales influyen en las estructuras macromoleculares, propiedades hidrodinámicas, gelificantes y antiproliferativas de las pectinas. Se reporta en la literatura un estudio en que se examinó las pectinas presentes en las paredes celulares de la piña y plátano dulce y las de maracuyá y limón demostrándose que las pectinas de piña y plátano dulce son más ricas en ramnagalacturonano I, pero con menor cantidad de homogalacturonano. La pectina del limón mostró la mayor cantidad de HG seguido por la de maracuyá, además la pectina de limón presentó el más alto grado de esterificación, peso molecular promedio de viscosidad y capacidad gelificante. La pectina de plátano dulce mostró una menor capacidad de gelificación que la pectina de maracuyá (Yapo, 2009).

En otro estudio (Happi *et al.*, 2007) se analizaron los componentes de la fibra dietética (fibra neutra detergente, fibra ácida detergente, celulosa, hemicelulosa) y las características químicas de la pectina encontrada en las cáscaras de plátano dulce (*Musa*, AAA) y plátano barraganete (*Musa*, AAB) durante las fases de maduración. Las cáscaras de plátano barraganete muestran una mayor cantidad de lignina, pero poseen un contenido de hemicelulosa inferior a las cáscaras de plátano dulce. Una extracción secuencial de las pectinas mostró que la extracción con ácido era el método más eficiente para aislar pectinas

de la cáscara de plátano dulce, mientras que una extracción con oxalato de amonio era más apropiada para las cáscaras de plátano barraganete (Happi *et al.*, 2007).

En el caso de pectinas obtenidas de plátano dulce se ha descrito la influencia de su estado de maduración. Además, el contenido de pectina en cáscaras de plátano provenientes de *Musa* AAA fue mayor en comparación con las de cáscaras de plátano de *Musa* AAB. Por otro lado, el contenido de ácido y de grupo metoxigalacturónico en cáscaras de plátano dulces eran más altos que en las cáscaras de plátano barraganete. Se ha demostrado que las cáscaras de plátano dulces son una fuente potencial de fibra dietética y pectinas (Happi *et al.*, 2007).

Considerando lo anteriormente expuesto, se hace evidente que es promisorio evaluar fuentes alternativas de pectinas de manera de determinar su efecto sobre la proliferación de células tumorales. Aunque la industria tradicionalmente utiliza pulpa de manzana y cáscaras de cítricos, principalmente limón y naranja como materia prima para la producción de pectina, en el último tiempo se han evaluado fuentes no tradicionales para la obtención de pectinas como los residuos y desechos generados productos del procesamiento de frutas y vegetales (Santos *et al.*, 2013).

En relación a lo anterior, en el laboratorio de cultivos celulares de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valparaíso se han hecho estudios sobre la actividad antiproliferativa de pectinas aisladas desde fuentes no convencionales, tales como residuos agroindustriales de raps y remolacha. Estos estudios se han efectuado utilizando las líneas celulares MCF-7, que corresponde a un cáncer de mama que expresa receptor de estrógeno

y SH-SY5Y, línea celular que proviene de neuroblastoma (Cobs *et al.*, 2015 y observaciones no publicadas).

Para evaluar nuevas pectinas y poder compararlas con las de otras fuentes y métodos de extracción es necesario mantener el mismo modelo de estudio. Y es por esto, que se propone evaluar pectinas de cáscara de *Musa cavendish* en las líneas celulares antes mencionadas.

El plátano dulce es uno de los frutos más consumidos a nivel nacional y en consecuencia se generan cantidades importantes de cáscara de este plátano que se convierten en un residuo sin valor comercial, el verificar si las pectinas descritas en su cáscara poseen potencial terapéutico permitiría valorizar este residuo constituyendo un estudio novedoso, debido a que no existen estudios de bioactividad para pectinas provenientes de la cáscara de plátano dulce.

CAPÍTULO 2

HIPÓTESIS

El extracto péctico del plátano *Musa cavendish* presenta actividad antiproliferativa sobre las líneas celulares cancerosas SH-SY5Y, de neuroblastoma y MCF-7, cáncer de mama.

CAPÍTULO 3

OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

- Evaluar la actividad antiproliferativa de extractos pécticos de plátano *Musa cavendish* en dos líneas celulares tumorales.

3.2 Objetivos Específicos

- Analizar el efecto antiproliferativo de extractos pécticos del plátano *Musa cavendish* sobre la línea celular de cáncer de mama MCF-7.
- Analizar el efecto antiproliferativo de extractos pécticos del plátano *Musa cavendish* sobre la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y.

CAPÍTULO 4

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materia Prima

La materia prima correspondió a cáscara de plátano (*Musa cavendish*) adquirida en el mercado local. A partir de esta se obtuvo dos extractos pécticos liofilizados denominados Extracto 1 y Extracto 2. Estos fueron suministrados por el laboratorio de Bioprocesos de la Escuela de Química y Farmacia de la Universidad de Valparaíso.

4.2 Caracterización de pectinas

Las pectinas ácidas fueron caracterizadas (Gavera y López, 2005) mediante los siguientes análisis:

PECTINAS
❖ Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier
❖ Determinación del contenido de ácido galacturónico

Figura 4-1. Resumen de análisis de productos obtenidos a partir de la extracción

4.2.1. Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR, por sus siglas en inglés)

Esta prueba físico-química se efectuó con el objetivo de evaluar las pectinas aisladas desde el punto de vista de la presencia de grupos carboxilo libres versus esterificados y la presencia de proteínas contaminantes.

Los espectros de los compuestos pécticos, se obtuvieron a partir de la espectroscopía utilizando un espectrofotómetro infrarrojo de Fourier (Rayleigh, modelo WQF-510A) acoplado a un ordenador con software de análisis MAIN FTOS versión 2.0. Se elaboraron comprimidos a partir de una mezcla de pectina con KBr (al 5%) y se registró en transmitancia a una resolución de 4 cm^{-1} con 64 exploraciones acumuladas en el rango 4000 - 500 cm^{-1} . Se utilizó KBr como blanco. Esta técnica permitió obtener espectros infrarrojos que representan un perfil de los extractos obtenidos.

Las bandas de interés, 1747 y 1637 cm^{-1} , se relacionan con el grado de esterificación de las pectinas (DE). La banda alrededor de 1740 cm^{-1} pertenece a la vibración del grupo carboxílico metilesterificado (COOCH_3) y los grupos carboxílicos ionizados (COO^-) se representan en la banda cercana a 1630 cm^{-1} (Chatjigakis *et al.*, 1998)

Además, los espectros infrarrojos permiten verificar la contaminación con proteínas en la muestra por la aparición de dos bandas en 1656 y en 1544 cm^{-1} , que corresponden a las regiones Amida I y Amida II, respectivamente, características de las proteínas (Ami *et al.*, 2003).

4.2.2. Determinación del contenido de ácido galacturónico

Esta prueba química se efectuó con el objeto de comprobar la naturaleza péctica de los extractos obtenidos, ya que el ácido galacturónico compone el esqueleto básico de las pectinas.

Se determinó el contenido de ácido galacturónico (AGA) en los precipitados obtenidos a través de un método colorimétrico. Las muestras se hidrolizaron con ácido (Ahmed & Labavitch, 1977) y luego se efectuó un ensayo colorimétrico cuyos detalles se explican en el **Anexo A**. También se construyó una curva de calibrado con estándar de ácido galacturónico (Filisetti-Cozzi & Carpita, 1991).

4.3 Evaluación de la actividad antiproliferativa *in vitro*

4.3.1 Líneas celulares

Se usaron dos líneas celulares provenientes de tumores humanos para este ensayo y que fueron adquiridas de American Type Culture Collection (ATCC). La línea MCF-7 (ATCC[®] HTB-22[™]) proveniente de un adenocarcinoma de mama aislado desde efusión pleural, expresa receptor de estrógeno y su cariotipo fluctúa entre hipertriploidía e hipertetraploidia (Huguet *et al.*, 1994). Por otra parte, la línea celular SH-SY5Y (ATCC[®] CRL-2266[™]) que corresponde a un neuroblastoma recuperado desde hueso, cuyo cariotipo tiene una moda de 47 y posee una trisomía 1q (Ross *et al.*, 1983).

4.3.2. Mantención de cultivos celulares

Las líneas celulares se mantuvieron en frascos de cultivo T-25 (BD Falcon) utilizando medio de cultivo (DMEM (Medio Eagle Modificado por Dubelcco, Corning Collegro) suplementado con 10% de suero bovino fetal (Biological industries) 1% glutamina (Life Technologies, 200 mM), antibiótico al 1% (penicilina 10.000 UI/mL y estreptomicina 10.000 ug/mL, Life technologies). Las células fueron cultivadas a 37°C en atmósfera humidificada con 5% de CO₂ en un incubador (Thermo Forma Direct Heat CO₂ incubator).

4.3.3 Ensayo de viabilidad celular

El efecto de las sustancias pécticas sobre la viabilidad de las células SH-SY5Y y MCF-7 fue evaluado por el método de Resazurin (Resazurinsodiumsalt, grado cultivo celular, Sigma Aldrich). Este método se basa en la capacidad de las células viables para reducir esta molécula y formar un producto fluorescente con una longitud de onda de excitación de 544 nm y una emisión de 590 nm. La fluorescencia se determinó en un fluorímetro de placas (Appliskan Thermo Scientific) y es proporcional al número de células viables.

Los ensayos, se efectuaron en placas de 96 pocillos y se sembraron a 5.000 células en cada pocillo suspendidas en 200 µL de medio de cultivo. Cada condición se realizó por triplicado. El esquema de siembra se presenta en el **Anexo B**.

Después de la adherencia de las células (16 horas aproximadamente), las células fueron expuestas durante 48 horas a las concentraciones de pectinas seleccionadas, que

correspondieron a diluciones seriadas 1:2 a partir de una solución madre de 2,5 mg/mL y a una condición control que corresponde a medio de cultivo libre de pectina. Terminado el período de incubación se retiró el medio con pectina y se aplicó 200 μ L de resazurín 4 mg/mL en medio de cultivo por pocillo. Luego de 4 horas se detectó la fluorescencia en el medio de cultivo. La supervivencia de las células se calculó a partir de la relación de unidades de fluorescencia relativa (RFU) de las células expuestas al tratamiento y células expuestas a medio de cultivo libre de pectinas de acuerdo a:

$$\text{Proliferación celular \%} = \frac{\text{RFU células con tratamiento}}{\text{RFU células control}}$$

4.4 Análisis estadístico

Se aplicó estadística descriptiva para el análisis de los datos de inhibición de la proliferación, esto es promedio, error estándar y gráficos concentración versus % de proliferación celular. Se utilizó el programa EXCEL para este análisis.

Además, se realizó estadística analítica en la cual se aplicó un método paramétrico, T-Student, y otro no paramétrico, Test de Mann-Whitney-Wilcoxon, para la comparación las pendientes de las curvas de proliferación para cada extracto, en ambas líneas celulares. (Dupont, 2002). Se consideró significativo un valor $p \leq 0,05$.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS

En este capítulo se presentarán los resultados hallados en los procesos aplicados para este estudio.

5.1 Características de los extractos pécticos

5.1.1 Acido Galacturónico

A continuación se presenta el contenido de ácido galacturónico (AGA) de los extractos pécticos 1 y 2 de tipo ácidas utilizados en este estudio (**Tabla 5-1**).

Pectinas	AGA (% p/p± DE %)
Extracto 1	18,8% ± 1,80 %
Extracto 2	22,04% ± 4,42%

Tabla 5-1. Contenido de ácido galacturónico de las pectinas ácidas de cáscara de plátano *Musa cavendish*.

5.1.2 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier

Este método fue aplicado para comparar las estructuras de las pectinas presentes en el extracto 1 y 2. El espectro infrarrojo de ambos extractos se presenta en la **Figura 5-1**. Sin embargo, las señales no fueron lo suficientemente fuertes para realizar un análisis cuantitativo y determinar el grado de esterificación de los extractos. Solamente se puede sugerir que el extracto 1 se encuentra en un menor grado de metilación, ya que la banda

correspondiente a carboxilo metilado (alrededor de 1700 nm) se encuentra disminuida en relación a la banda que representa los carboxilos libres (1630 nm). Por otra parte, la ausencia de bandas a 1656 y 1544 nm corrobora que ambos extractos carecen de contaminación proteica.

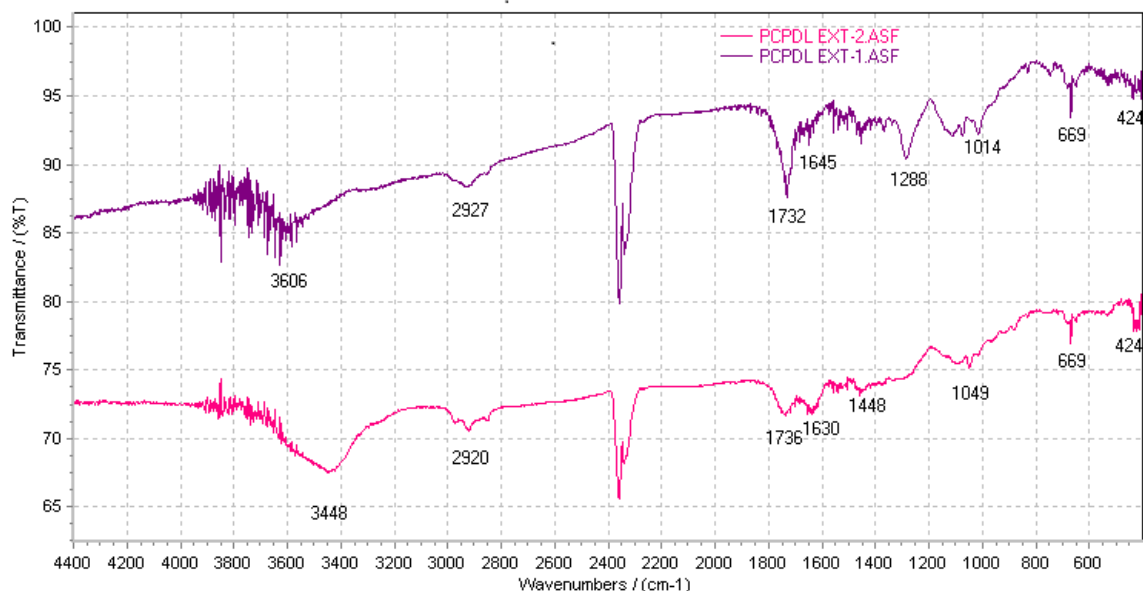


Figura 5-1. Espectro de absorción infrarrojo para pectina de *Musa Cavendish*, extracto 1 (línea superior) y extracto 2 (línea inferior).

5.2 Ensayo de viabilidad celular

Los extractos 1 y 2 fueron evaluados en dos experimentos independientes en las líneas celulares MCF-7 y SH-SY5Y. Los resultados se presentan en las figuras 5-2 y 5-3 y en la tabla 5-2. No se encontró diferencias estadísticamente significativas ($p \geq 0.05$) por ninguno de los métodos estadísticos aplicados al comparar las pendientes de las curvas de proliferación celular para cada extracto en cada una de las líneas celulares. No obstante lo

anterior, se puede sugerir una tendencia a que el extracto 2 presente una mayor actividad a concentraciones más bajas.

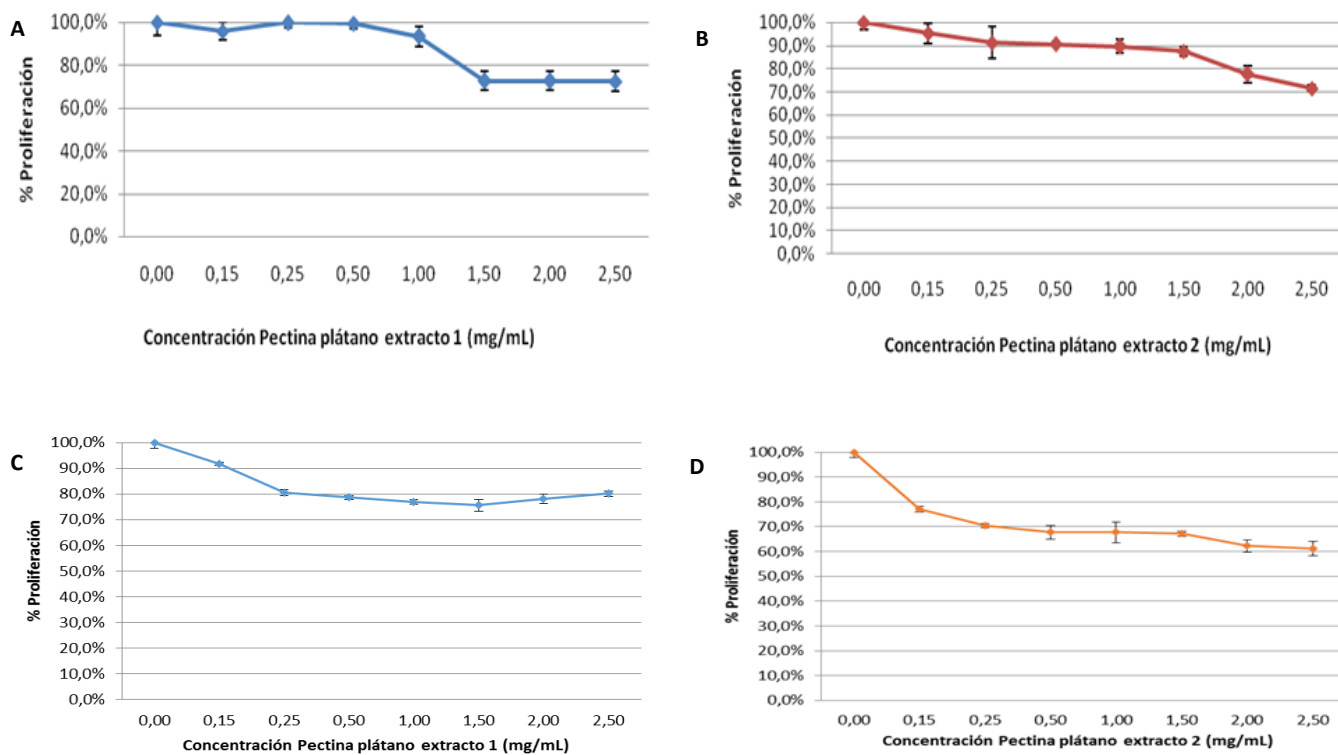


Figura 5-2. Proliferación celular de células MCF-7 expuestas a diferentes concentraciones de pectina ácida de plátano obtenida por la extracción 1 (A-C) y extracción 2 (B-D).

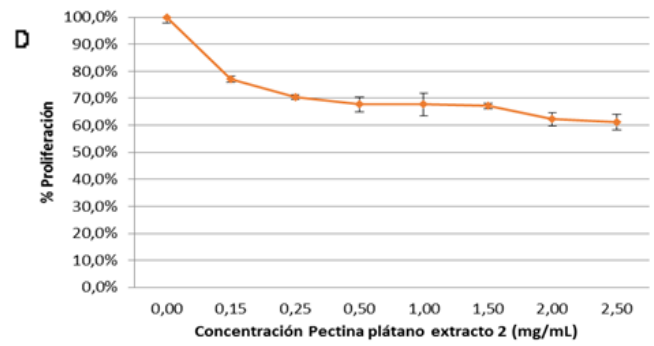
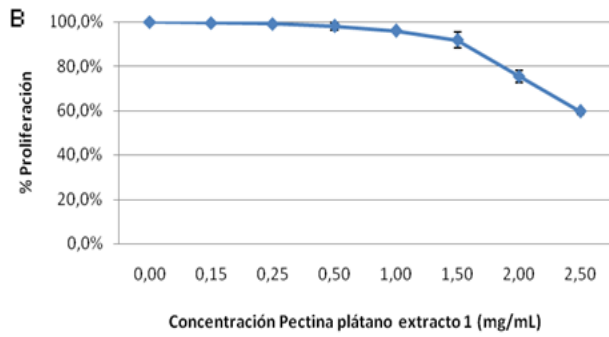
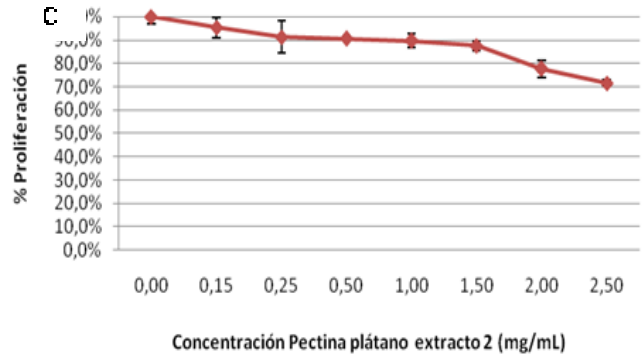
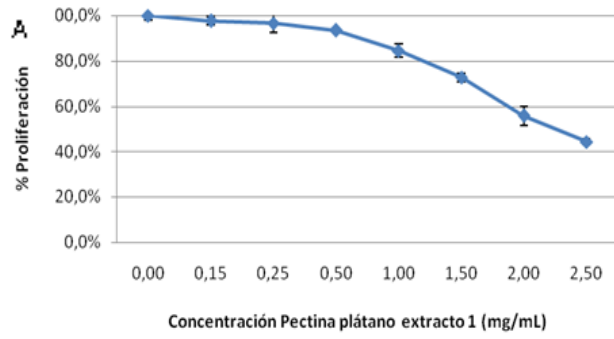


Figura 5-3. Proliferación celular de células SH-SY5Y expuestas a diferentes concentraciones de pectina ácida de plátano obtenida por la extracción 1 (A-C) y extracción 2 (B-D).

Líneas celulares	Extracto 1 (% p/p± DE%)	Extracto 2 (% p/p± DE%)
MCF-7	76,3 ± 2,8	61,5 ± 2,2
SH-SY5Y	52 ± 1,4	72,3 ± 1,6

Tabla 5-2. Valores promedio de los extractos pécticos para las líneas celulares MCF-7 y SH-SY5Y a una concentración de 2,5 mg/mL.

CAPÍTULO 6

DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados expuestos anteriormente, se observa que para el extracto 1 y 2 del primer experimento en la línea celular MCF-7 (**Figura 5-2 A-B**) y para el extracto 2 del segundo experimento independiente (**Figura 5-2 D**), a medida que aumenta la concentración de pectina disminuye la proliferación celular alcanzando un 72,4%, 61,7% y 61,2% con la más alta concentración, respectivamente. Cabe destacar, que en los resultados obtenidos no se aprecian valores sobre un 100%, es decir, las pectinas de ninguna manera estimulan la proliferación celular, lo que es consistente con su denominación de sustancia segura (FDA, 2015).

Por otro lado, en la línea celular SH-SY5Y (**Figura 5-3**) para el extracto 1 y 2 en ambos ensayos se consiguió como resultado en la máxima concentración niveles de proliferación celular de: 44,3%, 71,5%, 59,6% y 73% respectivamente, mostrando una tendencia similar a lo mencionado anteriormente, es decir, a mayor concentración de pectina menor proliferación celular. A pesar de que no se alcanzó a determinar significancia estadística, se aprecian curvas diferentes para los extractos 1 y 2 en experimentos independientes. Sin embargo, se plantea la necesidad de efectuar un número superior de experimentos independientes para poder validar estadísticamente una conclusión en relación a las diferencias en efectividad de los extractos pécticos analizados.

Asimismo, se expresa una diferencia entre el comportamiento de las líneas celulares frente a los extractos 1 y 2, manifestando la línea celular SH-SY5Y mejor sensibilidad en la

inhibición de la proliferación celular ante al extracto 2, mientras que la línea celular MCF-7 presenta mejor sensibilidad con el extracto 1 de pectinas ácidas de plátano.

Además, en la tabla 5-2 se presenta el promedio del nivel de inhibición de la proliferación celular y de las desviaciones estándar con la máxima concentración utilizada en este estudio (2,5 mg/mL), en la cual se observa que el extracto 1 expresa un menor porcentaje de proliferación siendo este un 52% para la línea celular SH-SY5Y, mientras que para la línea celular MCF-7 el extracto 2 obtuvo un mejor comportamiento inhibitorio resultando un 61,5%, sin embargo no se pudo calcular una concentración efectiva al 50% porque no se alcanzaron porcentajes de inhibición bajo este valor.

En cuanto a la caracterización analítica de los extractos 1 y 2, se logró confirmar la obtención de pectinas ácidas provenientes de la cáscara de plátano mediante la determinación del contenido de AGA, el que forma parte del polímero de la estructura homogalacturonano, conocida como la región lisa de las pectinas en la cual es su componente mayoritario. Además, mientras mayor es el contenido de ácido galacturónico más ácida es la pectina. En cuanto a los espectros FT-IR, estos sugieren que si bien ambos extractos son de bajo metoxilo las pectinas del extracto 2 se encuentran más esterificadas que las del extracto 1 indicando que estas últimas poseen un menor grado de metoxilación. Esto se relaciona a su vez con la actividad distinta sobre las líneas celulares estudiadas, en donde las pectinas de bajo metoxilo presentan mayor actividad antiproliferativa versus las pectinas de alto metoxilo tal como se ha descrito en la literatura (Pérez, 2014).

La extracción (25 mg) permitió trabajar con una concentración máxima de 2,5 mg/mL lo que influyó en la determinación de porcentajes de inhibición celular menores

referente a otros trabajos realizados en el laboratorio de cultivos celulares de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valparaíso. Luego, si se compara las pectinas ácidas obtenidas mediante un método químico a partir de cáscara de *Musa cavendish* se puede observar que exhiben una actividad antiproliferativa en las líneas celulares estudiadas comparable con el producto comercial de pectina cítrica modificada llamado Pectasol®, el cual alcanza una proliferación celular cercana a un 90% a la concentración de 2,5 mg/mL y que se comercializa como agente para la quimioprevención del cáncer. Otras pectinas evaluadas en el laboratorio como aquellas obtenidas de residuos de pera y manzana presentaron a la misma concentración proliferaciones celulares de 99 y 95%, respectivamente en las líneas celulares cáncer de mama (MCF-7) y cáncer de colon (Caco-2) (Weinstein_Oppenheimer *et al.*, 2013). En síntesis, se propone que esta materia es una promisorio fuente de pectinas con actividad antiproliferativa pero se sugiere aumentar las cantidades de materia prima utilizada para poder evaluar concentraciones superiores comparables a aquellas que ejercen actividad antiproliferativa para otras fuentes y poder efectuar suficientes ensayos independientes para llevar a cabo un análisis estadístico con suficiente potencia para validar los resultados.

Además, la actividad antiproliferativa de las pectinas de plátano *Musa cavendish* en las líneas celulares de cáncer de mama y neuroblastoma demostrada en esta investigación se pueden comparar con las pectinas provenientes de otras fuentes convencionales, tales como cítricas, para las que existe un mayor número de estudios y evidencia científica acerca de su actividad antiproliferativa, especialmente sobre la pectina cítrica modificada (MCP) obtenida a partir de la cáscara y pulpa de los cítricos en donde produce un efecto inhibitorio o bloqueo de la agregación y adhesión de células cancerígenas (Huang, *et al.*,

2008, Hossein, *et al.*, 2014). Es así, como estos resultados obtenidos a partir de las pectinas provenientes del plátano *Musa cavendish* se convierten en una buena opción para estudios posteriores.

Por otro parte, esta investigación contempla extractos de pectinas ácidas de la cáscara de plátano *Musa cavendish*, obteniendo buena correlación con el efecto antiproliferativo en las líneas celulares MCF-7 y SH-SY5Y, sin embargo estos experimentos pueden ampliarse evaluando el efecto que podrían generar las pectinas neutras provenientes de la misma materia prima. Esto debido a que estudios desarrollados en otras materias primas han mostrado un mejor desempeño de pectinas neutras sobre las ácidas (Castellano, 2015, Paniagua, 2014, Arancibia, 2014). Además, estas pectinas podrían modificarse posteriormente mediante enzimas, temperatura o pH, tal como se ha hecho con pectinas cítricas modificadas que han mejorado su potencial posterior a este tipo de modificaciones (Glinsky *et al.*, 2009).

En general, los extractos pécticos presentaron mejor actividad antiproliferativa para la línea celular SH-SY5Y por sobre MCF-7. Esto se relaciona con la mayor expresión de galectina-3 para la primera línea celular con respecto a MCF-7, esta última mediante una investigación (Paniagua, 2014) que estableció la diferencia de expresión de Gal-3 en las células MCF-7 versus la expresión de dicho gen con una muestra de referencia utilizando células de encía como control sano, determinando que la expresión relativa del gen Gal-3 en las células de cáncer de mama MCF-7 es 6,1 veces mayor que la expresión basal. Mientras que para SH-SY5Y la expresión es mayor siendo de 6,7 veces en relación a

células no cancerosas, de acuerdo a la evidencia experimental en ensayos de RT PCR en tiempo real (observaciones no publicados del laboratorio de cultivos celulares).

Finalmente, esta investigación propone transformar un residuo sin valor comercial como lo es la cáscara de plátano *Musa cavendish* en un residuo con potencial valor favoreciendo la utilización de esta materia prima para los próximos estudios sumado a que este trabajo es un aporte a las futuras investigaciones científicas basadas en pectinas como gran coadyuvante en el tratamiento del cáncer, ya que existe poca evidencia científica de pectinas provenientes de la fuente utilizada en este trabajo. Estas pectinas se podrían convertir en un principio activo para preparados nutracéuticos o alimentos funcionales con propiedades de quimioprevención del cáncer. No se descarta que algunas pectinas pudieran sumarse al arsenal terapéutico de antineoplásicos de origen natural.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIÓN

Considerando la hipótesis y los objetivos planteados al comienzo de esta investigación, se concluye lo siguiente:

- 1.- El grado de esterificación y metoxilación de los extractos pécticos influyen en la actividad antiproliferativa sobre las líneas celulares tumorales estudiadas.
- 2.- Las líneas celulares presentan diferente sensibilidad a los extractos de pectinas, debido a su diversidad genética.
- 3.- Las pectinas ácidas provenientes de plátano *Musa cavendish* efectivamente poseen un efecto antiproliferativo en las líneas celulares estudiadas a dosis bajas, cumpliendo así con la hipótesis planteada en esta investigación.

CAPÍTULO 8

REFERENCIAS

- Ahmed, A., Labavitch, J. (1977). A simplified method for accurate determination of cell wall uronide content. *Journal Food Biochemistry*, 1, 361-365.
- Ami, D., Bonecchi, L., Calí, S., Orsini, G., Tonon, G., Doglia, S. (2003). FT-IR study of heterologous protein expression in recombinant *Escherichia coli* strains. *Biochimica et Biophysica Acta* 1624, 6–10.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. (2005). Official methods of Analysis of the AOAC. 18th Ed. Washington, D.C. US Government Printing Office.
- Arancibia, P. (2014). Efecto del grado de metoxilación y peso molecular de pectinas ácidas de coseta agotada de remolacha sobre la proliferación de células que poseen distinto grado de expresión del receptor de galectina-3. Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile.
- Castellano, A. (2015). Determinación de la actividad antiproliferativa de pectinas neutras de raps sobre la línea celular MCF-7 de cáncer de mama. Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile.
- Chatjigakis, A., Pappas, C., Proxenia, N., Kalantzi, O., Rodis, P., Polissiou, M. (1998). FT-IR spectroscopy determination of the degree of esterification of cell wall pectins from stored peaches and correlation to textural changes. *Carbohydr Polym* 37, 395-408.

- Cobs, M., Concha, J., Weinstein, C., Zuñiga, M.E. (2015). Assesment of antiproliferative activity of pectic substances obtained by different extraction methods from rapeseed cake on cancer cell lines. *Carbohydrate Polymers* 117, 923-932.
- Díaz, N., Galaz, J., Jofré, A., Moya, J., Umaña, M., Vallebouna, C., Vicuña, P., Ameijide, A., Cardó, X., Carulla, M., Galceran, J. (2012). Primer informe de registros poblacionales de cáncer en Chile. Quinquenio 2003-2007. Unidad de vigilancia de enfermedades no transmisibles y estudios, departamento de epidemiología, división planificación sanitaria, Subsecretaria de Salud Pública, Ministerio de Salud, Chile.
- Dongowski, G., Lorenz, A., Proll, J. (2002). The degree of methylation influences the degradation of pectin in the intestinal tract of rats and in vitro. *J. Nutr.*, 132(7).
- Dupont, W. *Statistical modeling for biomedical researches*. Version 14, 2° Ed. 2002. Reino Unido: Cambridge University Press, 348-351.
- FDA. GRAS Substances (SCOGS) Database. <http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/SCOGS/ucm260947.htm>. (visitado 15 de Diciembre 2015)
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D., Forman, D., Bray, F. (2013) GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11, disponible en <http://globocan.iarc.fr> [citado 2014-09-28].
- Filisetti-Cozzi, T., Carpita, N. (1991). Measurement of uronic acid without Interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry*, 197, 157-162.

- Fuchs, N. (2004). Modified Citrus Pectin (MCP): A Super Nutraceutical. Basic Health Publications, Inc, 5-14.
- Fukumori, T., Kanayama, H., Raz, A. (2007). The role of galectin-3 in cáncer drug resistance. *Drug Resist. Update*, 10 (3), 101-108.
- Gao, X., Zhi, Y., Zhang, T., Xue, H., Wang, X., Foday, A., Zhou, Y. (2012). Analysis of the neutral polysaccharide fraction of MCP and its inhibitory activity on galectin-3. *Glycoconjugate J.*, 29 (4), 159-165.
- Gavera, N., López, L. (2005). Extracción a escala laboratorio de la pectina del maracuyá y escalado preliminar y a planta piloto. Universidad Eafit, Departamento de ingeniería de procesos, Medellín, 23-50.
- Gil, A. (2010). Tratado de Nutrición, Capítulo 9, Tomo I. Bases Fisiológicas y Bioquímica de la Nutrición. 2º ed. Editorial Médica Panamericana S.A., 237-238.
- Glinsky, V., Raz, A. (2009). Modified citrus pectin anti-metastatic properties: one bullet, multiple targets. Minireview. USA. *Carbohydr Res.* 344:1788-91.
- Hayashi, A., Gillen, A.C., Lott, J.R. (2000). Effects of daily oral administration of quercetin chalcone and modified citrus pectin on implanted colon-25 tumor growth in Balb-c mice. *Altern. Med. Rev.*, 5 (6): 546-552.
- Happi, T., Robert, C., Sebastien, N., Ronkart, Wathelet, B., Paquot, M. (2007). Dietary fibre components and pectin chemical features of peels during ripening in banana and plantain varieties. *Bioresource Technology* 99 (10), 4346–4354.
- Hossein, G., Keshavarz, M., Ahmadi, S., Naderi, N. (2014). Synergistic Effects of PectaSol-C Modified Citrus Pectin an Inhibitor of Galectin-3 and Paclitaxel on

- Apoptosis of Human SKOV-3 Ovarian Cancer Cells. *Asian Pac J Cancer Prev*, 14 (12), 7561-7568.
- Huang, Z., Liu, H. (2008). Expression of galectin-3 in liver metastasis of colon cancer and the inhibitory effect of modified citrus pectin. *Journal of Southern Medical University*. 28(8):1358-1361.
 - Huguet, E.L., McMahon, J.A., McMahon, A.P., Bicknell, R., Harris, A.L. (1994). Differential expression of human Wnt genes 2, 3, 4, and 7B in human breast cell lines and normal and disease states of human breast tissue. *Cancer Res*. 54(10): 2615-2621.
 - Jackson, C.L., Dreaden, T.M., Theobald, L.K., Tran, N.M., Beal, T.L. (2007). Pectin induces apoptosis in human prostate cancer cells: Correlation of apoptotic function with pectin structure. *Glycobiology*, 17 (8): 805-819.
 - Johnson, K.D., Glinskii, O.V., Mossine, V.V., Turk, J.R., Mawhinney, T.P., Anthony, D.C., Henry, C.J., Huxley, V.H., Glinsky, G.V., Pienta, K.J., Raz, A., Glinsky, V.V. (2007). Galectin-3 as a potential therapeutic target in tumors arising from malignant endothelia. *Neoplasia*, 9 (8): 662-670.
 - Kashyap, D., Vohra, P., Chopra, S., Tewari, R. (2011). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresour. Technol*. 77 (3): 215-227.
 - Liu, L., Cao, J., Huang, J., Cai, Y., Yao, J. (2010). Extraction of pectins with different degrees of esterification from mulberry branch bark. *Bioresour. Technol*. 101 (23):3268-3273.

- Manrique, G., Lajolo, F. (2002). FT-IR spectroscopy as a tool for measuring degree of methyl esterification in pectins isolated from ripening papaya fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 25, 99 – 107.
- Maxwell, E., Belshaw, N., Waldron, K., Morris, V. (2012). Pectin –An emerging new bioactive food polysaccharide. *Trends Food Sci. Technol.*, 24 (2): 64-73.
- Calvo, M. (2004). *Bioquímica de los alimentos*
- Morris, V., Belshaw, N., Waldron, K., Maxwell, E. (2013). The bioactivity of modified pectin fragments. *Bioactive carbohydrates and dietary fibre 1*: 21-37.
- Nicholas, J. (2009). Fighting cancer metastasis and heavy metal toxicities with modified citrus pectin. *Life Extension. Mag.*
- Nobili, S., Lippi, D., Witort, E., Donnini, M., Bausi, L., Mini, E., Capaccioli, S. (2009). Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacological Research*.59: 365-378.
- Paniagua, R. (2014). Efecto de hidrolizados de pectinas ácidas de raps sobre la proliferación de células con distinto grado de expresión de receptor galectina-3. Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile.
- Perez, M. (2014). Efecto del peso molecular y grado de esterificación de pectinas comerciales sobre la expresión del gen p21 en células tumorales MCF-7. Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile.
- Porth, C. (2009) *Fisiopatología Salud-enfermedad: un enfoque conceptual 7° ed.* 2009. Editorial Médica Panamericana .A., 174-177.

- Prieto, M. (2011). Epidemiología del cáncer de mama en Chile. Rev. Med. Clin. Condes. 22 (4): 428-435.
- Ross, R.A., Spengler, B.A., Biedler, J.L. (1983). Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. J Natl Cancer Inst. 71(4):741-7.
- Rosti3n, C., Jauregui, L., Broussain, V., Gac, K., Paulos, A., Hepp, M., Cortez, D. (2005). Neuroblastoma: Forma de presentaci3n y probabilidad de resecci3n quir3rgica. Revista de pediatria electr3nica, 2 (2): 718-918.
- Round, A., Rigby, N., MacDougall, A., Morris, V. (2010). A new view of pectin structure revealed by acid hydrolysis and atomic force microscopy. Carbohydr. Res., 345(4): 487-497.
- Santos J., Espeleta A., Branco A., Assis S. (2013). Aqueous extraction of pectin from sisal waste. Carbohydr. Polym. 92 (2), 1997-2001.
- Seggiani, M., Puccini, M., Pierini, M., Giovando, S., Forneris, C. (2009). Effect of different extracction and a precipitation methods on yield and quality of pectin. Int. J. Food Sci. Technol. 44: 574-580.
- Song, L., Tang, J., Owusu, L., Sun, M., Wu, J., Zhang, J. (2014). Galectin-3 in cancer. Clinica Chimica Acta 431, 185-191.
- Vasquez, R., Ruesga, L., D'addosio, R., P3ez, G., Mar3n, M. (2011). Extracci3n de pectina a partir de la c3scara de pl3tano (*Musa* AAB, subgrupo pl3tano) clon Hart3n. Caracas: Universidad del Zulia, Facultad de ingenier3a.
- Villarroel, M. (2006). Diagnostico precoz del c3ncer infantil. Revista M3dica Cl3nica las Condes, 17(2): 60-5

- Vincken, J., Schols, H., Oomen, R., McCann, M., Ulvskov, P., Voragen, A. (2003). If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *J. Plant Physiol.*, 132 (4): 1781-1789.
- Wang, Y., Nangia-Makker, P., Balan, V., Hogan, V., Raz, A. (2010). Calpain activation through galectin-3 inhibition sensitizes prostate cancer cells to cisplatin treatment. *Cell Death Dis.*, 1 (11), e 101.
- Weinstein-Oppenheimer, CR., Reyna, M., Marchant, S., Meneses, C., Concha, J. Zúñiga, M.E. (2013). Recuperación de pectinas con actividad antiproliferativa a partir de materiales de desecho agroindustrial. *Rev. Farmacol. Chile.* 6 (3):94.
- Yapo, B. (2009). Pectin quantity, composition and physicochemical behaviour as influenced by the purification process. *Food Res Int* 42: 1197-1202.
- Zhang, W., Xu, P., Zhang, H. (2015). Pectin in cancer therapy: A review. *Trends in Food Science and Technology* 44: 258-271.
- Zong, A., Cao, H., Wang, F. (2012). Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. *Carbohydrate Polymers* 90 (2012) 1395–1410.

CAPÍTULO 9

ANEXOS

A) Contenido de ácido galacturónico

- Hidrólisis con ácido: Se agregó 1 mL de H₂SO₄ concentrado a 5 mg de muestra en un tubo de vidrio con tapa el cual se dejó en hielo por 5 minutos, agitando constantemente y se repitió este proceso. Luego, se agregó 0,5 mL de agua destilada y se dejó en hielo por 5 minutos, agitando constantemente y se repitió nuevamente este proceso. Se aforó a 10 mL con agua destilada y posteriormente se trasvasió y centrifugó a 2000 rpm por 10 minutos.
- Ensayo colorimétrico: En 3 tubos de vidrio, se agregó 400 µL del sobrenadante obtenido en el paso anterior más 40 µL de ácido sulfámico 4 M (Tabla 9-1.), se agitó y se le agregó 2,4 mL de solución de tetraborato de sodio 75 mM (Tabla 9-1.). Luego, se dejaron los tubos en un baño termorregulado a 100°C por 20 minutos y después en baño de hielo por 10 minutos. A dos de los tubos se le agregó 80 µL de solución de m-Hidroxidifenil (Tabla 9-1.) y al tercer tubo se le agregó 80 µL de solución de NaOH 0,5%. Posteriormente y pasados 15 minutos, se leyó la absorbancia a 525 nm en espectrofotómetro (Genesys 10 uv, Thermo Electron Corporation) utilizando el tercer tubo como blanco. La medición de absorbancia puede hacerse como máximo después de una hora.

La curva de calibrado se preparó a partir de una solución de ácido-D-(+)-galacturónico de 200 µg/mL, que se preparó de una solución de 20 mg/mL y se realizó la siguiente batería

de diluciones aforadas a 10 mL con agua destilada; a las diluciones sólo se les aplica el paso del ensayo colorimétrico para su medición respectiva:

Concentración Final ($\mu\text{g}/400 \mu\text{L}$)	Volumen de solución de ácido galacturónico (200 $\mu\text{L}/\text{mL}$)
5,0	625
10,0	1250
15,0	1875
20,0	2500
30,0	3750
40,0	5000

Tabla 9-1. Diluciones utilizadas en la curva de calibrado para cuantificar el contenido de ácido galacturónico.

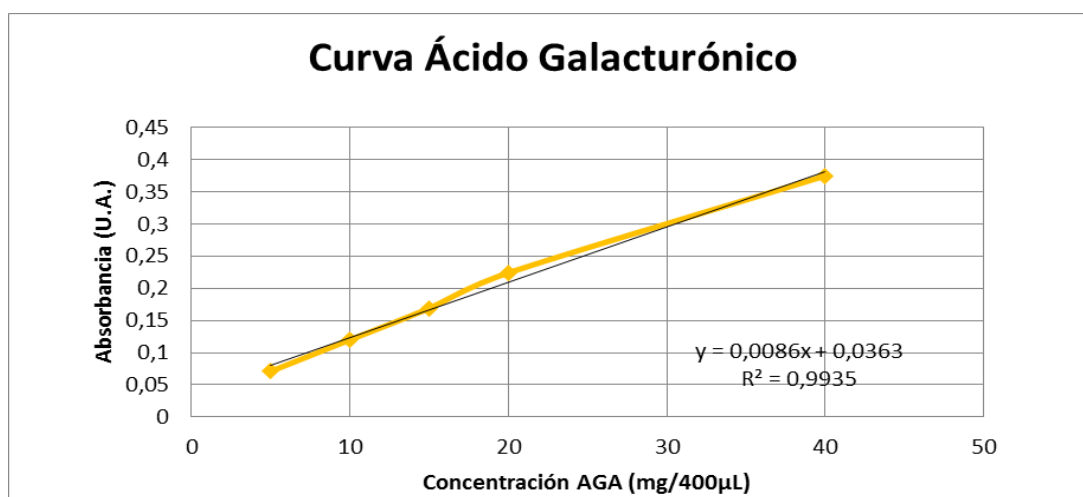


Figura 9-1. Curva de calibrado para determinación de ácido galacturónico.

B) Diseño de placa para estudios de proliferación de sustancias pecticas

Esquema de la aplicación de sustancias pecticas para estudios de proliferación en placa de 96 pocillos. La primera fila (A) contiene sólo solución madre y la condición control (H) no contiene pectinas, sólo medio de cultivo. En cada pocillo se utilizó un volumen de 200 µL.

		Pectina A			Pectina B			Pectina C			Pectina D		
		Extracto 1			Extracto 2			Extracto 1			Extracto 2		
		SH-SY5Y			SH-SY5Y			MCF-7			MCF-7		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2,5 mg/mL	A												
2,0 mg/mL	B												
1,5 mg/mL	C												
1,0 mg/mL	D												
0,5 mg/mL	E												
0,25 mg/mL	F												
0,15 mg/mL	G												
Control	H												