



FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE KINESIOLOGÍA

**EVALUACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS
DE OXÍGENO EN LA INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN
CELULAR POR OLIGOSACÁRIDOS PÉCTICOS**

Tesis para optar al grado de
Magíster en Ciencias, mención Radicales Libres en Biomedicina

CAROL MARCELA PARRA IBARRA

Directora de Tesis: Dra Caroline Weinstein Oppenheimer
Co-directora de Tesis: Dra Jacqueline Concha Olmos

2016

AGRADECIMIENTOS

Espero estas líneas sirvan para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado para que este proyecto llegué a su etapa culmine, en especial a las Dras. María Eliana Hidalgo Lillo, Caroline Weinstein Oppenheimer y Jacqueline Concha, directoras de esta investigación, por la orientación, dedicación y seguimiento de la misma, pero sobre todo por la motivación y apoyo recibido durante estos años.

A Mirta Crovetto quien me impulsó y apoyo a realizar este magister. Hago extensiva mi gratitud al profesor Carlos Jara quien tuvo la voluntad para aportar con sus conocimientos a esta tesis, al sr. Mauricio Reyna, quien tuvo la paciencia y apoyo para realizar los análisis de esta investigación.

Un agradecimiento muy especial merece la comprensión, paciencia y ánimo de mi familia.

A Dios, quien ha estado a mi lado en cada momento de mi vida y ha guiado este difícil camino.

RESUMEN

La presente investigación se enfocó en evaluar oligosacáridos pécticos sobre el estrés oxidativo en una línea celular de cáncer de mama, MCF-7 con el objetivo de establecer la participación de estrés oxidativo en la inhibición de la proliferación celular, inducida por un extracto péctico de coseta agotada de remolacha sobre una línea celular de cáncer de mama.

Para este efecto se midió la presencia de oxígeno singulete y de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, la actividad de las enzimas catalasa y superóxido dismutasa en cultivos celulares expuestos a oligosacáridos pécticos al 1% p/p. También la actividad antioxidante de los extractos pécticos fue determinada mediante el método de determinación de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC).

Los resultados encontrados permitieron concluir que la acción antiproliferativa se atribuye a una actividad pro oxidante que afecta la viabilidad celular. Además, respecto de la actividad enzimática se determinó la disminución en la actividad de superóxido de dismutasa (4,2 U/mg proteína) y el aumento en la actividad catalasa (0,00008 U enzima/mg proteína) en los cultivos tratados con pectina. Por su parte el análisis ORAC reveló que el extracto en estudio posee capacidad antioxidante (171 Trolox mM).

Se puede concluir que existen mecanismos de estrés oxidativo involucrados en la actividad antiproliferativa de los oligosacáridos pécticos derivados de la coseta agotada de remolacha.

ABSTRACT

This research focused in the evaluation of pectic oligosaccharides on oxidative stress on a breast cancer cell line with the objective of establishing the oxidative stress on the inhibition of cell proliferation induced by a sugar beet pectic extract on a breast cancer cell line.

For this, singlet oxygen and oxygen and nitrogen reactive species were measured , the catalase and superoxide dismutase activities were determined on cell culture exposed to 1% w/w. In addition, oxygen radical absorption capacity (ORAC) was determinated.

The results found allowed to conclude that the antiproliferative activity is attributed to pro oxidant activity that affects cell viability. In addition, with regard to the enzymatic activities, superoxid dismutase showed a reduction (4,2 U/mg proteína) and catalase an increase (0,00008 U enzyme/mg proteína) On the other hand, ORAC indicated that the studied extract possesses antioxidant capacity (171 Trolox mM).

It can be concluded that there are oxidative stress mechanisms involved in the antiproliferative activity of the pectic oligosaccharides extracts derived from sugar beet pulp.

INDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	5
1.1	Mecanismo Fisiológico del Estrés Oxidativo.....	5
1.1.1.	Estrés oxidativo y su relación con cáncer.....	7
1.2.	Cáncer y estrategias anticancerígenas.....	12
1.2.1	Pectinas y cáncer.....	15
2.	HIPOTESIS.....	18
3.	OBJETIVO GENERAL.....	18
3. 1	Objetivos específicos.....	18
4.	METODOLOGÍA.....	19
4.1	Materiales.....	19
4.2.	Cultivos celulares.....	19
4.3.	Métodos.....	20
4.3.1.	Determinación de fenoles: Método Folin-Cicateau.....	20
4.3.2.	Determinación de capacidad antioxidante: Método ORAC-PGR.....	21
4.4.	Determinación de EROs y ERNs	22
4.4.1.	Detección de oxígeno singulete.....	22
4.4.2.	Detección de especies reactivas de oxígeno y/o nitrógeno.....	23
4.5	Determinación de actividad enzimática.....	24
4.5.1	Detección de actividad de superóxido dismutasa.....	24
4.5.2	Detección de la actividad de catalasa.....	25
5.	RESULTADOS.....	26
5.1	Determinación de Polifenoles.....	26
5.2.	Determinación de capacidad Antioxidante.....	27
5.3.	Determinación de ERO y ERN.....	27
5.3.1	Detección de oxígeno singulete.....	27

5.3.2.	Detección de especies reactivas de oxígeno y/o nitrógeno.....	30
5.4.	Determinación de actividad enzimática.....	32
5.4.1	Detección de actividad superóxido de dismutasa	32
5.4.2	Actividad de enzima catalasa.....	33
6.	DISCUSION.....	33
7.	CONCLUSION.....	39
8.	BIBLIOGRAFIA.....	40

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Mecanismo Fisiológico del Estrés Oxidativo

El Estrés Oxidativo (EO) se denomina al desbalance entre los sistemas oxidantes y los antioxidantes, siendo este desequilibrio a favor de los primeros, por la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (EROs) y especies reactivas de nitrógeno (ERNs). Paralelamente se describe un debilitamiento de los sistemas antioxidantes (Giménez, 2004).

En humanos el balance oxidativo es esencial para la regulación metabólica, la activación o inactivación de biomoléculas, la producción de energía, la transducción de señales, la producción de nuevas células, la mantención del tono vascular, entre otros (Gutowski & Kowalczyk, 2013). Son numerosas las patologías que han sido asociadas con este desbalance entre oxidantes y antioxidantes; tales como inflamación, disfunción, daño y riesgo cardiovascular son relacionados con hipertensión y aterosclerosis, la génesis del cáncer, la enfermedad de Alzheimer, la Diabetes Mellitus y sus complicaciones, enfermedades autoinmunes, inflamatorias crónicas, situaciones de injuria por isquemia y repercusión en los tejidos, el síndrome de distrés respiratorio, entre otras (Jiménez et al., 2000).

En los seres humanos el 5% del oxígeno inspirado sufre sucesivas reducciones generándose EROs, moléculas altamente tóxicas y reactivas, el 95% restante continúa por la ruta fisiológica en condiciones normales (Halliwell B, 2006).

Existen muchas dificultades para detectar directamente los radicales libres (RL) por lo que el estrés oxidativo, se puede determinar a través de la medición de los productos de las reacciones oxidativas (peroxidación lipídica, oxidación del DNA, oxidación de proteínas), o mediante el conocimiento de la depleción de sustancias antioxidantes (Aranda, 2003). Un RL es una molécula o un fragmento de una molécula que contiene uno o más electrones desapareados en un orbital externo (Pryor, 1986) dándole una configuración espacial que genera una alta inestabilidad, es extraordinariamente reactivo y de vida efímera, con una enorme capacidad para combinarse inespecíficamente en la mayoría de los casos, así como con la diversidad de moléculas integrantes de la estructura celular: carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y otros derivados de cada uno de estos (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Los radicales libres provienen de fuentes endógenas y exógenas, siendo el fundamento de esta clasificación el origen de los mismos, siendo definido como endógeno lo que se produce dentro del organismo y exógeno lo que es externo a este (Freeman & Crapo, 1982). Las principales especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno fueron descritas por Halliwell (2006) y son: radical superóxido $O_2^{\bullet-}$, radical hidropéroxido $HO_2^{\bullet}$, peróxido de hidrógeno H_2O_2 , radical hidroxilo $HO^{\bullet}$, radical alcóxi $RO^{\bullet}$, radical peróxi $ROO^{\bullet}$, óxido nítrico $NO^{\bullet}$, dióxido de nitrógeno NO_2 .

Halliwell, (1999) le da una connotación destacable a la descripción de las especies reactivas endógenas, afirmando que surgen como “accidentes químicos”, es decir, como reacciones secundarias no deseadas entre las biomoléculas. Otras, se generan *in vivo* con un fin determinado, como en el caso de los fagocitos activados, que producen O_2 y H_2O_2 .

Los RL pueden ser nocivos y el estrés oxidativo traer graves consecuencias, aunque estas especies tan reactivas, en condiciones normales, no causan daño oxidativo en la célula porque esta última posee diversos mecanismos antioxidantes. Sin embargo, cuando la capacidad de éstos últimos se ve superada por las agresiones oxidativas, o sea en una situación de estrés oxidativo, podría

ocurrir que las defensas antioxidantes del organismo no sean suficientes para una sobreproducción de RL; o alternatively que se produzca una caída en el nivel de las defensas antioxidantes, provocándose un daño sustancial a los tejidos (Ames, 1983). Se puede definir antioxidante (Halliwell et al., 1995) como “cualquier sustancia que, en bajas concentraciones comparado con el sustrato oxidable, disminuye significativamente o inhibe la oxidación de este sustrato”.

1.1.1. Estrés oxidativo y su relación con cáncer

Los radicales libres están implicados en numerosos procesos degenerativos (Fig. 1), que incluyen el envejecimiento, el cáncer, enfermedades cardiovasculares, arteriosclerosis, enfermedades neurológicas, procesos inmunológicos, irritativos de la piel, e inflamaciones (Kalam et al., 2015).

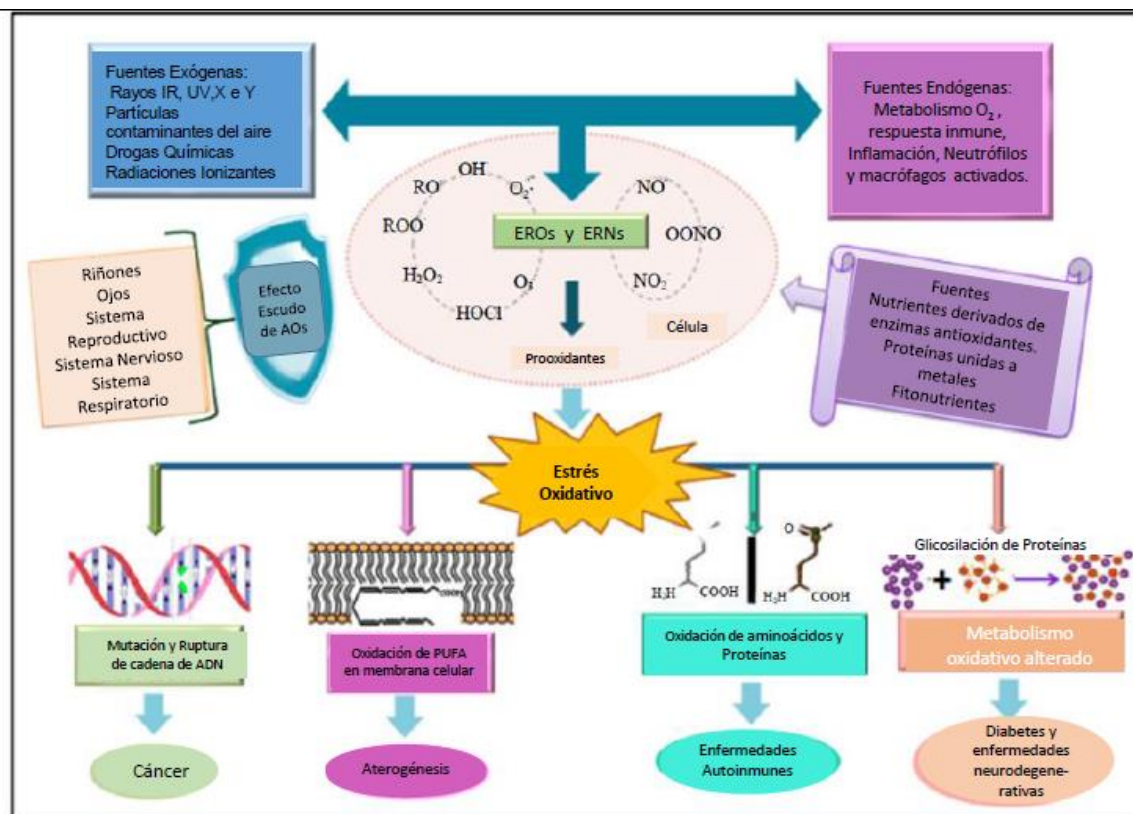


Figura N°1: Sinapsis de la formación de radicales libres, estrés oxidativo y patogénesis de enfermedades crónicas (adaptado de Kalam et al., 2015)

Asimismo, las lesiones por isquemia-reperfusión, se caracterizan también por la formación de radicales libres (Halliwell & Gutteridge, (1989), Aranda, (2003)). En cáncer también se ha demostrado que el daño producido a ácidos nucleicos por RL se encuentra asociado a su fisiopatología.

Desde hace bastantes años se vienen aportando en estudios científicos donde se ha descrito que los RL pueden reaccionar con todos los componentes del ADN; se ha demostrado que, en presencia de oxígeno, el radical peroxilo se forma por adición de oxígeno a las bases o al azúcar del ADN. Las reacciones posteriores de los radicales formados en el ADN dan lugar a un gran número de productos (Ames et al, 1993). Como consecuencia ocurrirían fenómenos de mutación y carcinogénesis, con pérdida de expresión o síntesis de una proteína por daño a un

gen específico, modificaciones oxidativas de las bases, delecciones, fragmentaciones, interacciones estables ADN-proteínas, reordenamientos cromosómicos y desmetilación de citosinas del ADN que activan genes. El daño se puede explicar por la alteración (inactivación/pérdida de algunos genes supresores de tumores que pueden conducir a la iniciación, progresión, o ambas de la carcinogénesis). Los genes supresores de tumores pueden ser modificados por un simple cambio en una base crítica de la secuencia del ADN (Venereo, 2002). Es importante destacar que el ADN mitocondrial está expuesto a un mayor daño oxidativo que el ADN nuclear. Muchos autores consideran que las causas del cáncer se encontrarían en el daño oxidativo al ADN y la consecuente mutagénesis (Ames et al, 1993).

Existen datos epidemiológicos y experimentales que relacionan los procesos inflamatorios con el cáncer, (Grivennikov, 2010). Las terapias anti-inflamatorias muestran eficacia en la prevención y tratamiento del cáncer (Gonda et al., 2009). Los carcinógenos actúan por innumerables modos de acción, incluyendo la producción de EROs. La carcinogénesis se inicia justo después de un estímulo inflamatorio que, o bien está mediada por EROs y puede ser directa (oxidación, nitración, halogenación de ADN nuclear, ARN y lípidos) o puede ser mediada por las vías de señalización activadas por EROs. Los radicales más dañinos en el organismo pueden ser formados ya sea por dismutación del anión superóxido o de forma espontánea en los peroxisomas a partir de oxígeno molecular (Ray y Husain, 2002; Bellezza et al, 2010).

La oxidación del ADN ocurre cuando hay deficiencia de antioxidantes. Estos incluyen a las vitaminas C y E; y carotenoides procedentes de frutas y vegetales ingeridos por la dieta. Una disminución de su ingesta aumenta el grado de oxidación del ADN, y por lo tanto el riesgo de cáncer (Ames & Gold, 1997).

Además, de los productos de la dieta mencionados en el párrafo precedente, las células aeróbicas, por estar sujetas a estrés oxidativo, han desarrollado una serie de mecanismos de defensa antioxidante enzimáticos y no enzimáticos diseñados para protegerse de la acción de los RL. El sistema de defensa antioxidante está

constituido por un grupo de sustancias que al estar presentes en concentraciones bajas con respecto al sustrato oxidable, retrasan o previenen significativamente su oxidación. Como sustrato oxidable se pueden considerar casi todas las moléculas orgánicas o inorgánicas que se encuentran en las células vivas tales como proteínas, lípidos, carbohidratos y ADN. Los antioxidantes al colisionar con un RL le ceden un electrón oxidándose a su vez y transformándose luego en un RL débil no tóxico y debido a que interactúan más rápido con los RL, que con el resto de las moléculas presentes, impidiendo que otras se unan al oxígeno (Halliwell et al, 1995).

Los antioxidantes ejercen su acción en un determinado microambiente que puede ser, la membrana plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular. La acción del antioxidante es de sacrificio de su propia integridad molecular para evitar alteraciones de moléculas funcionalmente vitales o más importantes. Su acción la realizan tanto en medios hidrofílicos como hidrofóbicos. Los antioxidantes exógenos actúan como moléculas suicidas, ya que se oxidan al neutralizar al RL, por lo que la reposición de éstos debe ser continua, mediante la ingesta de los nutrientes que los contienen (Venereo, 2002).

Los antioxidantes pueden actuar de diferentes formas, ya sea previniendo la formación de EROs, interceptando el ataque de EROs, secuestrando metabolitos reactivos y convirtiéndolos en moléculas menos reactivas, amplificando la resistencia de las dianas biológicas sensibles al ataque de EROs, facilitando la reparación del daño causado por EROs, manteniendo un ambiente favorable para la actuación de otros antioxidantes, entre otros (Benítez, 2008).

Los mecanismos antioxidantes pueden clasificarse en relación a su función por múltiples criterios ya sea como por ejemplo teniendo en cuenta su función preventiva, reparadora o secuestradora; según su localización; su origen endógeno o exógeno; para esta investigación se considerará una clasificación de antioxidantes en función de diferentes niveles (Rodríguez et al., 2001). Esta clasificación es acorde al diseño experimental y por ello se describe en esta investigación.

- Primer nivel: lleva a cabo la reducción univalente del oxígeno a través de sistemas enzimáticos que son capaces de efectuar una reducción tetravalente consecutiva, sin liberar intermediarios parcialmente reducidos. Esto lo logra eficazmente el sistema citocromo-oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial responsable de más del 90 % de la reducción del oxígeno en el organismo humano.
- Segundo nivel: lo constituyen enzimas especializadas en captar el anión radical superóxido (O_2^-) llamadas superóxido dismutasas (SOD).
- Tercer nivel: considera un grupo de enzimas especializadas en neutralizar el peróxido de hidrógeno. Entre ellas están la catalasa y la glutatión peroxidasa, que se encuentra en los peroxisomas.
- Cuarto nivel: Este nivel en general incluye a todos los sistemas antioxidantes no enzimáticos. El radical hidroxilo producido en el ciclo de Haber-Weiss que puede ser neutralizado por la vitamina E o alfa-tocoferol, un antioxidante efectivo y que por su hidrofobicidad se encuentra en las membranas biológicas donde su protección es particularmente importante. También la vitamina C o ácido ascórbico es un agente reductor o donador de electrones y reacciona rápidamente con el radical OH^- y el anión radical superóxido.
- Quinto nivel: Una vez producido el daño molecular, este nivel de defensa consiste en la reparación. Está demostrado que los RL son capaces de provocar rupturas de la cadena de ADN e inducir mutagénesis, pero existen mecanismos enzimáticos de reparación que permiten restablecer la información genética (Rodríguez et al., 2001).

Como se mencionó anteriormente entre las defensas antioxidantes de segundo nivel se encuentra la superóxido dismutasa (SOD) que cataliza la dismutación del O_2^- a H_2O_2 y O_2 . (Blokina et al. 2003). Por representar parte de la primera línea de defensa de las células frente a EO, es que se ha seleccionado esta enzima como objeto de interés en este estudio. En humanos existen tres formas de

superóxido dismutasa. SOD1 que se encuentra en el citoplasma, SOD2 en las mitocondrias y SOD3 en el líquido extracelular. SOD1 es un dímero, consiste en dos subunidades; mientras que las otras son tetrámeros de cuatro subunidades. SOD1 y SOD3 contienen cobre y zinc, mientras que SOD2 tiene manganeso en su centro reactivo (Peskin & Winterbourn, 2000).

Por su parte la catalasa (CAT) es parte del tercer nivel de defensas antioxidantes. Esta enzima está ampliamente distribuida en el organismo humano y se localiza a nivel celular en las mitocondrias, peroxisomas y citosol. Presenta 2 funciones fundamentales: catalítica y peroxidativa y forma parte del sistema antioxidante CAT/SOD que actúa en presencia de altas concentraciones de peróxido de hidrógeno. La catalasa participa en la eliminación del peróxido de hidrógeno, dando lugar a agua y a una molécula de oxígeno (Miranda et al., 2000). Por constituir un sistema junto a SOD, es que también se seleccionó para su determinación en este estudio.

1.2. Cáncer y estrategias anticancerígenas.

Dado que una de las patologías más agresivas que puede ligarse a daño por estrés oxidativo es el cáncer, se han realizado numerosos estudios que describen la utilización de fitofármacos para regular o disminuir diferentes aspectos del cáncer y esta tesis propone aportar en este sentido.

En la actualidad el cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo. En el año 2012 causó 8,2 millones de defunciones en el mundo (OMS, 2015). El cáncer que provoca mayor mortalidad es el de pulmón (1,59 millones de defunciones), seguido por el cáncer de hígado (754.000 defunciones), estómago (723.000 defunciones), colon (694.000 defunciones) y mama (521.000 defunciones). En países de ingresos medios y bajos, más del 70% de las

defunciones son producidas por cáncer y se prevé que esta cifra siga aumentando a nivel mundial, superando los 13,1 millones en el 2030 (OMS. 2013).

En Chile, la segunda causa de muerte según el Ministerio de Salud, es algún tipo de cáncer (MINSAL, 2012). El cáncer de mama es la neoplasia maligna más frecuente en la mujer occidental y la principal causa de muerte por cáncer en la mujer en Europa, Estados Unidos de Norteamérica, Australia y algunos países de América Latina, se estima una incidencia de 700.000 casos nuevos cada año en el mundo. En Chile, se conoce parcialmente la incidencia porque la notificación obligatoria de los nuevos casos se registra sólo desde años cercanos al 2000, y principalmente en los servicios públicos que representan el 72% de la población chilena (Peralta,2002).

Con relación a la mortalidad general por cáncer en la población chilena, considerando ambos sexos, el cáncer de mama constituye la tercera causa de muerte con una tasa de mortalidad de alrededor de 13 x 100.000 mujeres, sólo inferior a la mortalidad por cáncer de estómago (20 x 100.000) y por cáncer de próstata (17 x 100.000). Si se considera la mortalidad por cáncer sólo en mujeres, el cáncer de mama también representa la tercera causa de muerte con una tasa de 13 x 100.000 mujeres, inferior al cáncer de vesícula biliar de 17 x 100.000 mujeres y 14 x 100.000 mujeres cáncer de estómago (MINSAL,2001; INE, 2001).

Jiménez et al. (2015), publicaron una revisión, respecto de la actualidad del cáncer en Chile. Se destaca de esta publicación que la incorporación de fármacos innovadores como Herceptin TM (Trastazumab), no se ha traducido en una disminución de las cifras negativas de mortalidad y concluyen sobre la necesidad de destinar nuevos y significativos recursos para investigación en el tema, abordando la problemática desde distintas disciplinas. Es en este sentido que se considera relevante y significativo el aporte de esta investigación. Las actuales terapias contra el cáncer, describen principalmente tratamientos médicos paliativos en oncología, lo que podría definirse como, aquella terapia farmacológica que no siendo capaz de conseguir la curación del paciente neoplásico, perseguiría como objetivos fundamentales el aumento de la

supervivencia y el control de los síntomas, como medio básico de mejorar la calidad de vida de los pacientes. Se considera que el arsenal oncológico terapéutico actual tiene un impacto limitado en cuanto al aumento de supervivencia en la mayoría de los pacientes que padecen de tumores malignos (Jimenez et al, 2015).

Según García et al. (2003) los tipos de tratamiento del cáncer según por orden de importancia y uso, son en primer lugar la quimioterapia, en general aplicada por vía intravenosa y tiene la opción de usarse en monoterapia o más frecuentemente en una combinación de varios citostáticos. Se clasifican en distintas familias: alquilantes (ciclofosfamida, busulfan o lomustina); cisplatino y análogos (que forman uniones dentro de la cadena de ADN bloqueando su función); antimetabolitos que son análogos no funcionales de las bases nitrogenadas que inhiben la síntesis de precursores de nucleótidos e interfieren con la síntesis ADN (metotrexato, 5-fluorouracilo, citarabina, fludarabina); inhibidores de la topoisomerasa (doxorubicina, irinotecan); agentes antimicrotúbulos (taxanos o los alcaloides de la vinca); y otros como bleomicina y suramina con mecanismos de acción variados.

A su vez, existen tratamientos de hormonoterapia (cuando hay dependencia hormonal como en el cáncer de próstata y de mama). Inmunoterapia (uso de sustancias que potencian el sistema inmune como la interleucina 2 y los interferones, usados en el tratamiento del melanoma y el carcinoma renal). Finalmente nuevas terapias que buscan fundamentalmente conseguir una mayor especificidad en la lucha contra la célula tumoral. Existen cuatro grupos en esta categoría: (1) Terapia génica que consiste en la transferencia de ácidos nucleicos a un paciente, para inhibir la expresión de oncogenes tumorales, administrar de una copia normal de un gen supresor, aumentar la inmunogenicidad de las células tumorales o transferir genes asesinos suicidas (De Vita et al. 2001). (2) Inhibidores micromoleculares que actúan sobre objetivos moleculares específicos, buscando una menor toxicidad y una mayor eficacia antitumoral, como los inhibidores de las tirosin-quinasas de los receptores de factores de crecimiento epidérmico, o del

factor de crecimiento plaquetario. (3) Anticuerpos monoclonales, tal como el trastuzumab, dirigido contra el dominio extracelular de la oncoproteína erbB-2 que se sobreexpresa en un 20- 30% de los carcinomas de mama. (4) Vacunas antitumorales que potencian la respuesta inmune específica contra el tumor (Cortés-Funes H et al. 1999).

A pesar de estas múltiples alternativas farmacológicas, tanto aprobadas por las agencias regulatorias como en etapa experimental, los pacientes siguen perdiendo la batalla contra el cáncer. Esta observación alienta la búsqueda de nuevos productos con mecanismos de acción novedosos dentro de los productos naturales, que presenten tanto efectos quimiopreventivos como quimioterapéuticos. Entre estos los polisacáridos han atraído la atención de investigadores en los últimos años, en particular las pectinas, con las que se han observado resultados promisorios.

1.2.1 Pectinas y cáncer

Los polisacáridos son moléculas que se encuentran en la matriz celular de la pared de las plantas (Taiz & Ziedger 1998). Desde un punto de vista estructural, los polisacáridos pécticos son copolímeros distribuidos en bloques, en la pared celular, bloques de dos tipos fundamentalmente (Lacomini et al., 2005). Un bloque no ramificado, constituido por una cadena lineal de unidades de ácido anhidrogalaacturónico unidas entre sí por enlaces del tipo α - (1,4) y que son conocidos por homogalaacturanos y un bloque ramificado, donde una cadena lineal de homogalaacturanos es interrumpida frecuentemente por unidades de β -L-ramnopiranosido enlazado por las posiciones 1-2, que quiebran la regularidad lineal del esqueleto. Muchos de estos residuos portan cadenas laterales de

azúcares neutros. Estos polisacáridos son conocidos como ramnogalacturanos (RG), que según su composición se clasifican como RGI o RGII (Carpeta y Mc Cann, 2000).

Las pectinas en la industria alimentaria, se utilizan como agentes gelificantes en la producción de mermeladas y jaleas, espesantes, emulsionantes y estabilizantes en productos lácteos y margarinas, mayonesa y aderezos (Willats, Knox y Mikkelsen, 2006) o en forma de grasa sustitutos en confitería y helados (Kalapathy y Proctor, 2001). Estos polímeros también se utilizan con el fin de mejorar las propiedades mecánicas de las películas de proteínas y revestimientos (Pérez et al. 2013).

Las pectinas son aisladas en una escala industrial principalmente de pulpa de manzana y cítricos (lima, limón, naranja, pomelo) y cáscaras. Sin embargo, estos polímeros también se pueden obtener con alto rendimiento a partir de cáscara de soya o descartes de girasol (industria de grasa), remolacha azucarera, torta de prensa o cáscara de la semilla de cacao (Iglesias & Lozano, 2004; Mollea et al, 2008).

En el año 1996, se publicó una investigación en que se puso de manifiesto la actividad anticancerígena de una pectina cítrica modificada (MCP, por sus siglas en inglés). La estructura ramificada de las pectinas se puede tratar y obtener así un producto de menor peso molecular rico en galactosa. Esta pectina modificada puede ayudar a retrasar la metástasis de las células cancerígenas porque sus azúcares bloquean las moléculas de lectina (galectina) de la superficie de las células que median la metástasis (Kidd, 1996). Otros estudios evaluaron el efecto MCP y un derivado de quercetina en la reducción del tamaño de tumores implantados en ratones. Los resultados mostraron que la administración diaria de ambos derivados naturales durante 20 días, producía una reducción en el tamaño de los tumores implantados, entre el 65% y el 70%, con una dosis de 1,6 mg/mL

diarios (Hayashi et al. 2000). Siendo el primer estudio en evidenciar la actividad de MCP sobre el crecimiento de tumores primarios sólidos.

Respecto de los estudios de pectinas y cáncer en humanos, la mayoría se ha efectuado en la pectina cítrica modificada (GCS-100), además de estudios en pectinas modificadas enzimáticamente y pectinas tratadas térmicamente (Morris et al.2013). Los estudios clínicos hasta el reporte en el año 2013 parecen estar restringidos a ensayos clínicos de fase II. Los estudios sobre GCS-100 fueron realizados con una perspectiva terapéutica, en distintos tipos de cánceres de sangre, como: leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiple y el linfoma difuso de células B (Cotter et al, 2009). Por otro lado se puede mencionar los estudios con Pectasol (Eco Nugenic ®), una MCP, en cáncer de próstata, que demostró disminución de los tumores sólidos prostáticos (Azémar et al.2007).

En estudios realizados en líneas celulares, se destaca el trabajo realizado con pectinas de Ginseng, en células HT-29 de cáncer de colon. Los resultados mostraron que las pectinas ricas en homogalacturonanos (HG) ejercen un efecto antiproliferativo, probablemente a través de la detención del ciclo celular en la fase G2/M (Cheng et al.2011). Recientemente, un estudio de Cobs et al. (2015) realizado con sustancias pécticas extraídas a partir de la torta de raps, mostró actividad antiproliferativa en células MCF-7 (línea celular de cáncer de mama) y en células de la línea celular Caco-2 (células de adenocarcinoma de colon humano). Este estudio concluyó que la bioactividad depende tanto del procedimiento de extracción como de la línea celular estudiada, por lo que diferentes extractos podrían resultar más o menos eficaces, en líneas celulares de diferentes tipos de cáncer. Otro trabajo realizado en células Caco-2, describe que las pectinas son capaces de inhibir la proliferación y migración de células Caco-2, y junto con esto les atribuye un efecto sobre la respuesta oxidativa que describe una alta actividad antioxidante de las pectinas utilizadas (Concha, 2009; Wikiera et al, 2015).

Por su parte destacan los resultados evaluados para determinar el efecto terapéutico en la disrupción renal, de las pectinas sobre el estrés oxidativo y la apoptosis en ratas tratadas con Octilfenol (OP) un disruptor endocrino. Los resultados revelaron que OP disminuyó significativamente los niveles de la glutatión-S-transferasa (GST), glutatión peroxidasa (GPx), catalasa (CAT), glutatión reducido (GSH), glutatión reductasa (GR) y la superóxido dismutasa (SOD); y paralelamente se reportó un aumento significativo de la peroxidación lipídica, el óxido nítrico y en los carbonilos de proteínas en los tejidos de riñón. Además, OP provocó una disminución de la expresión de p53, y un aumento de la expresión de bcl-2 en el tejido renal. El tratamiento con cualquiera de las dosis de pectina en ratas expuesta a OP fue capaz de restaurar todos los parámetros anteriores acercándose a los valores normales, en que la pectina en dosis más alta fue más eficaz que a dosis inferiores, concluyendo que la pectina tiene actividades antioxidantes y anti-apoptóticas en la toxicidad renal inducidos por OP (Koriem et al 2014).

En base a lo expuesto anteriormente, respecto de la relación entre la actividad antiproliferativa y antioxidante que exhiben las pectinas, surge la propuesta de explorar el efecto antiproliferativo de extractos de pectina extraída de coseta agotada de remolacha, y dilucidar si dicho efecto está mediado por especies reactivas de oxígeno y/o nitrógeno; determinando la actividad de las enzimas CAT y SOD en células MCF-7 expuestas a determinadas dosis citotóxicas de pectinas.

2. HIPOTESIS

Establecer la participación de estrés oxidativo en la inhibición de la proliferación celular, inducida por un extracto péctico de coseta agotada de remolacha sobre una línea celular de cáncer de mama.

3. OBJETIVO GENERAL

Determinar si el extracto pèctico de coseta agotada de remolacha inhibe la proliferación celular en la línea celular de cáncer de mama MCF- 7 mediante mecanismos que involucren estrés oxidativo.

3.1 Objetivos específicos

1.- Evaluar la presencia de polifenoles en el extracto pèctico de coseta agotada de remolacha.

2.- Verificar la actividad antioxidante *in vitro* del extracto pèctico de coseta agotada de remolacha.

3.- Determinar la presencia de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en cultivos de células MCF-7 incubados con extracto pèctico de coseta agotada de remolacha.

4. Determinar la actividad enzimática de superóxido dismutasa y catalasa en cultivos de células MCF-7 expuestos a extracto pèctico de coseta agotada de remolacha.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales

- Extracto de oligosacáridos pècticos

El extracto pèctico (EP) fue procesado y extraído por la Dra. Jacqueline Concha, de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valparaíso a partir de coseta agotada de remolacha, donación de Iansa S.A. (Los Ángeles, Chile). El extracto

péptico se obtuvo mediante tratamiento enzimático con Rohapect DA6L, según lo descrito en Concha et al, 2013.

El EP se diluyó en una relación de 1 mg por 1mL de DMEM (Invitrogen, Carisbad, California, USA) suplementado con suero bovino fetal (Hyclone, USA), penicilina 0,1U/mL y estreptomycin 0,1mg/mL. Esta dilución fue la que exhibió la capacidad antiproliferativa en la línea celular MCF7 de cáncer de mama, en una tesis de doctorado en ciencias de la Ingeniería con mención en Ingeniería Bioquímica de la PUCV y resultados previos de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valparaíso.

Los reactivos utilizados fueron grado pro analisis marca Merck, excepto doxorubicina que fue comprada a Sigma Chemical Co. Doxorubicina se utilizó como control positivo de droga anticancerígena que produce estrés oxidativo.

4.2. Cultivos celulares

Se cultivó líneas celulares MCF-7, células de cáncer de mama humano receptor de estrógeno positivo, basado en trabajos de Levenson A. (1997), David & Ades. (2006) y Gaube et al. (2007). Las células fueron adquiridas en la ATCC (ATCC® HTB-22™).

Se mantuvieron en frascos de cultivo de 75 cm² con medio DMEM/F12 glutamax alto en glucosa (suplementado con suero bovino fetal 10%, penicilina 0,1U/ml/estreptomycin 0,1mg/mL) a una temperatura de cultivo de 37°C, con 5% de CO₂ y 95% humedad ambiente en incubadora Thermo Forma. Los medios de cultivo y antibióticos se adquirieron en INVITROGEN, Carisbad, USA y el suero bovino fetal en Biologicals Industries, Israel. Todas las actividades asociadas a cultivos celulares se efectuaron en un gabinete de bioseguridad ESCO.

El medio se reemplazó cada 3 días hasta alcanzar la confluencia del 80 a 90% para luego traspasar células a nuevo frasco en proporción 1:3.

4.3. Métodos

4.3.1. Determinación de fenoles: Método Folin-Ciocalteu

Para evaluar la presencia de polifenoles en el extracto péctico de coseta agotada de remolacha, planteado en el primer objetivo, se determinó el contenido de fenoles totales mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu. 0,5 mL de EP (1 mg/mL) se mezcló con 0,75 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu dejando en reposo a temperatura ambiente por 5 min después de lo cual se agregaron 0,75 mL de carbonato de sodio al 20 %. Se agitaron fuertemente para luego, dejar reposar durante 90 min a temperatura ambiente y privados de luz. Después de este tiempo se midió la absorbancia a 760 nm.

Los resultados se expresan mediante el Índice de Folin, según Singleton V. (1999), que se calcula con la siguiente formula:

$$IF = UAXH / UAREF \times n^{\circ}OHREF$$

Donde,

IF= Índice Folin, grupos fenólicos OH totales

UAXH= Lectura Abs a 740 nm muestra

UARE= Lectura Abs a 740 nm compuesto referencia Trolox (5 uM)

n°OHREF= número de grupos fenólicos OH en relación a los de Trolox

4.3.2. Determinación de capacidad antioxidante: Método ORAC-PGR

La actividad antioxidante *in vitro* del extracto péctico de coseta agotada de remolacha se realizó mediante la técnica ORAC (Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno), metodología que usa como molécula sonda PGR (Rojo pirogalol) (López-Alarcón & Lissi E. 2005; Poblete A. et al (2009)). Esta técnica se basa en la descomposición de un compuesto azida, que libera nitrógeno gaseoso

que en presencia de oxígeno genera radicales peroxilos (ROO') que de ser atrapados por moléculas antioxidantes producen compuestos coloreados cuya absorbancia es detectable. Los resultados son calculados como el área bajo la curva (AUC) para la obtención de valores expresados como equivalente Trolox, molécula que se usa como referente.

Concentraciones de 2 mg/mL, 1 mg/mL y 0,5 mg/mL de EP se incubaron con ABAP (2,2'-azobis (2-metilpropionamida) 0,6 M y Pirogalol Rojo 5 mM en solución salina tamponada con fosfato 0,1M, pH7,4 (PBS), previamente llevados a 37°C, en baño termorregulado. La desaparición de color se mide a 540 nm en espectrofotómetro (Rayleigh uv-2601) en intervalos de tiempo de 1 min durante 20 min. El agua destilada se utilizó como blanco de reactivos.

Para las determinaciones de ORAC, se considera el consumo de las moléculas de la sonda, PGR, asociado a su incubación en presencia de 2,2'-azo-bis (2-amidino-propano) dihidrocloruro (AAPH). Las razones de fluorescencia o absorbancias se representaron como una función del tiempo. La integración del área bajo la curva (AUC) se realizó hasta un tiempo tal que (F / F0) o (A / A0) alcanzó un valor de 0,2. Se emplearon estas áreas para obtener valores de ORAC, de acuerdo con la ecuación [1]. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

$$\text{ORAC} = \frac{[\text{AUC} - \text{AUC}^{\circ}]}{[\text{AUC}_{\text{referencia}} - \text{AUC}^{\circ}]} \times [\text{referencia}] \quad [1]$$

dónde:

AUC = área bajo la curva en presencia de las EP ensayados, integrado entre el tiempo cero y la que corresponde a 80% del consumo de sonda; AUC = área bajo la curva para el control. AUC referencia = Área bajo la curva para el compuesto de referencia.

f = factor de dilución, igual a la relación entre el volumen total de la solución de color rojo o AAPH-pirógalo y el volumen de muestra añadido, [referencia] = Trolox en concentración milimolar.

Esta fórmula proporciona valores ORAC en términos de los equivalentes de referencia milimolar.

4.4. Determinación de ERO y ERN

4.4.1 Detección de oxígeno singulete

Este ensayo se basa en que el agua deuterada (D_2O) disminuye la velocidad de desactivación del estado singulete, aproximadamente en un orden de magnitud debido a que las frecuencias vibracionales disminuyen (Valenzuela A. 1983). El resultado es un tiempo de vida mucho mayor en D_2O que en agua común (de 3 a 4 μs en H_2O a 62 μs en D_2O , (Foote CS, Clennan (1995) Martínez, G. (2005)). Por lo tanto, si la producción de oxígeno singulete es parte del mecanismo de acción de la pectina, al ser estabilizado por deuterio, sus efectos se verían exacerbados.

Para observar este efecto se sembró 5.000 células en placas de 96 pocillos las que fueron expuestas a diferentes condiciones de tratamiento, con EP, doxorubicina (control positivo para la producción de radicales libres) y agua deuterada. Cada condición se ensayó en cuádruplicado.

Para determinar la viabilidad celular se aplicó la técnica de resazurin que se basa en la reducción metabólica de (7-Hidroxi-3H-phenoxazin-3-one 10-oxido) por deshidrogenasas mitocondriales cuya actividad refleja la viabilidad celular. El compuesto reducido es fluorescente con una longitud de onda de excitación de 544 nm de excitación y de emisión a 590 nm que se leyó en un lector Appliskan de Thermoscientific. La viabilidad celular se calculó a partir de la relación condición

experimental sobre condición control expresada en porcentaje. Las condiciones de cultivo, incluyeron controles para verificar efectos citotóxicos del D₂O y DMSO de manera independiente.

4.4.2. Detección de especies reactivas de oxígeno y/o nitrógeno

La técnica conocida como AAPH, utiliza como control a la 2,2'-azo-bis (2-amidino-propano) dihidrocloruro (AAPH) como generador de radicales libres y la luminiscencia del luminol como indicador de la concentración de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en estado estacionario.

Se cultivaron 5.000 células por 48 h en placas de 96 pocillos expuestas a los siguientes tratamientos, EP 1mg/mL, doxorubicina 1 μ M (control positivo), AAPH (control positivo) y en condiciones de cultivo control (sin tratamiento). Los sobrenadantes de los cultivos se transfirieron a pocillos libres de células de la misma placa y se efectuó una lectura basal de luminiscencia a tiempo 0, y luego se agregó luminol 25 mM y se leyó a tiempos de 0, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 minutos. La quimioluminiscencia fue medida en contador de fotones en espectrofotómetro utilizando placas para 96 pocillos especiales para leer luminiscencia (Appliskan, Thermo Forma). Los resultados se expresan como curvas de luminiscencia en el tiempo para el estado basal y posterior a la adición de luminol.

4.5. Determinación de actividad enzimática

4.5.1 Detección de actividad de superóxido dismutasa

El método se basa en proporcionar el sustrato (anión radical superóxido), a través de la reacción xantina-xantina oxidasa, y luego medir su desaparición que será proporcional a la actividad de la SOD e inversamente proporcional al citocromo c reducido (Halliwell, 2000). La actividad de SOD se obtiene por la cinética de reducción de citocromo C, ya que la reducción de anión radical superóxido es

catalizado por la SOD, la cinética se sigue mediante espectrofotometría de absorción a 540 nm cada 15 min.

La actividad SOD fue evaluada en lisados de células cultivadas por 48 h en doxorrubicina 1 μ M , EP 2000 mg/L y medio sin tratamiento. Se usó una solución de lisis de NaCl 0,1 M que fue suplementada con EDTA 5mM (inhibidor de metaloproteasas) y un cocktail de inhibidores de proteasas a 10 μ L/mL (Thermoscientific). Los lisados fueron mantenidos a -80°C hasta su utilización.

Los lisados fueron expuestos a xantina 0,5 mM y xantina oxidasa 2,5% v/v y una solución de citocromo C cuya absorbancia ha sido previamente ajustada a 0,152. A continuación se leyó a 540 nm usando como blanco de reactivos una solución EDTA 0,1 mM, pH 7,8. Todas las condiciones fueron evaluadas en dos experimentos independientes con triplicados en cada uno de éstos.

La siguiente expresión permitió determinar la cantidad de citocromo C reducido:

$$\text{citocromo reducido} = \frac{A}{21,1 \times \text{célula}} (mM^{-1} cm^{-1} \text{célula/mL})$$

Los resultados se normalizan por la concentración de proteínas determinada con el Kit BCA (Thermoscientific). Luego se calcula la actividad enzimática que se expresa en U/mg de proteína. Los cálculos se efectuaron con el programa informático Microstat®.

4.4.2 Detección de la actividad catalasa

El método se basa en el seguimiento, por espectrofotometría de absorción a 240 nm, de la cinética de degradación de peróxido de hidrógeno. Las células MCF-7 fueron cultivadas en placas de 6 pocillos hasta su pre-confluencia en presencia de EP y doxorrubicina (control positivo) o en condiciones de cultivo control (sin

tratamiento). Al cabo de 48 h las células fueron lisadas utilizando una solución de NaCl 0,1 M que fue suplementada con EDTA 5mM (inhibidor de metaloproteasas) y un cocktail de inhibidores de proteasas a 10 uL/mL (Thermoscientific). Los lisados fueron mantenidos a -80°C hasta su utilización.

Los lisados celulares fueron expuestos a 100 µL de H₂O₂ a una concentración de 0,3M. A continuación la absorbancia a 240 nm fue seguida cada 15 s por un período de un minuto. Al lisado celular se le detectó también la concentración de proteínas mediante un ensayo de microBiuret comercial (Thermoscientific). La actividad de catalasa se informó como UI/mg de proteína (Halliwell B & Gutteridge J.1999).

5. RESULTADOS

5.1 Determinación de polifenoles.

Los resultados obtenidos fueron negativos para la presencia de fenoles, por lo que se informa no existe presencia de fenoles en el EP en las condiciones de ensayo.

5.2. Determinación de capacidad antioxidante

La Fig. 2 presenta los resultados obtenidos para la capacidad antioxidante de EP expresado en ORAC en base a equivalentes de TROLOX. Se observa que no existe una relación dosis respuesta a las concentraciones ensayadas, puesto que para 0,5 mg/mL y 1 mg/mL de EP existe un aumento en el índice ORAC a medida que se aumentó la concentración, pero luego a 2 mg/mL de EP el índice ORAC es incluso menor al obtenido a la menor concentración evaluada.

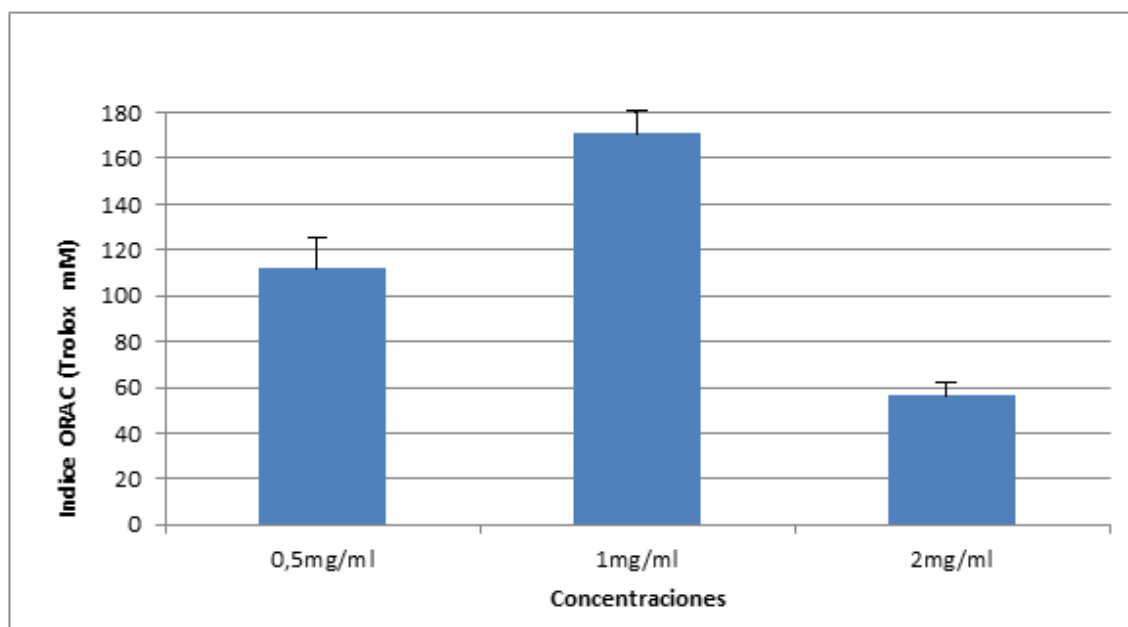


Figura N° 2. Índice ORAC en base a equivalentes de Trolox para tres concentraciones de EP.

5.3. Determinación de ERO y ERN

5.3.1 Detección de oxígeno singulete

Se determinó el efecto del agua deuterada sobre la viabilidad celular. Los resultados obtenidos se muestran en la figura N°3 y en la tabla N°1, en las se puede observar que existe un efecto del agua deuterada sobre la viabilidad celular que es proporcional a su concentración, Por lo tanto, para los estudios posteriores se decidió utilizar agua deuterada en la menor concentración probada, con el fin de minimizar sus efectos sobre la viabilidad celular.

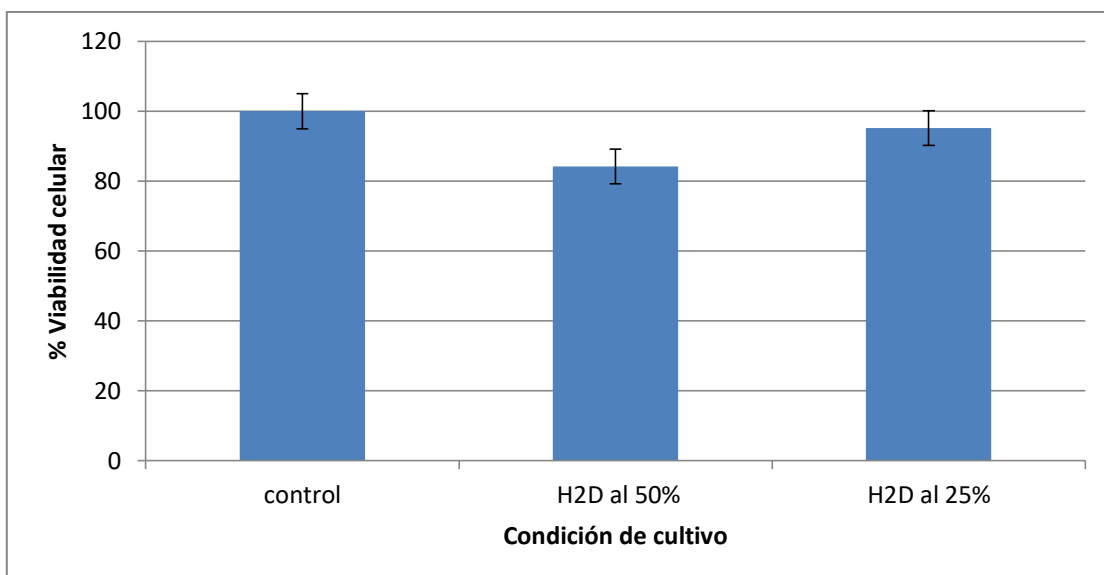


Figura 3. Porcentaje de viabilidad celular de células expuestas a diferentes concentraciones de agua deuterada y cultivo control, transcurridas 48 h de cultivo.

TABLA 1 VIABILIDAD CELULAR (%) DE CÉLULAS MCF-7 CULTIVADAS EN PRESENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AGUA DEUTERADA.

CONDICIONES	% VIABILIDAD CELULAR
H2D 25%	95,18
H2D 50%	84,18

La Fig 4 presenta el porcentaje de viabilidad celular para cultivos en condiciones control y expuestos a doxorrubicina, y agua deuterada, transcurridas 48 h. de cultivo. La doxorrubicina se usó como control positivo ya que genera radicales libres (McEvoy et al.2006). Los resultados obtenidos muestran que las células tratadas con doxorrubicina, sólo alcanzan un 65 % de viabilidad celular en comparación al control que es del 100% de viabilidad. Por otra parte, el cultivo con doxorrubicina en combinación con H₂D al 50% presentó un 40% de viabilidad, siendo el cultivo que muestra mayor mortalidad de células, en comparación a doxorrubicina cuando se usó en combinación con H₂D 25%, en que la viabilidad fue de 55 %.

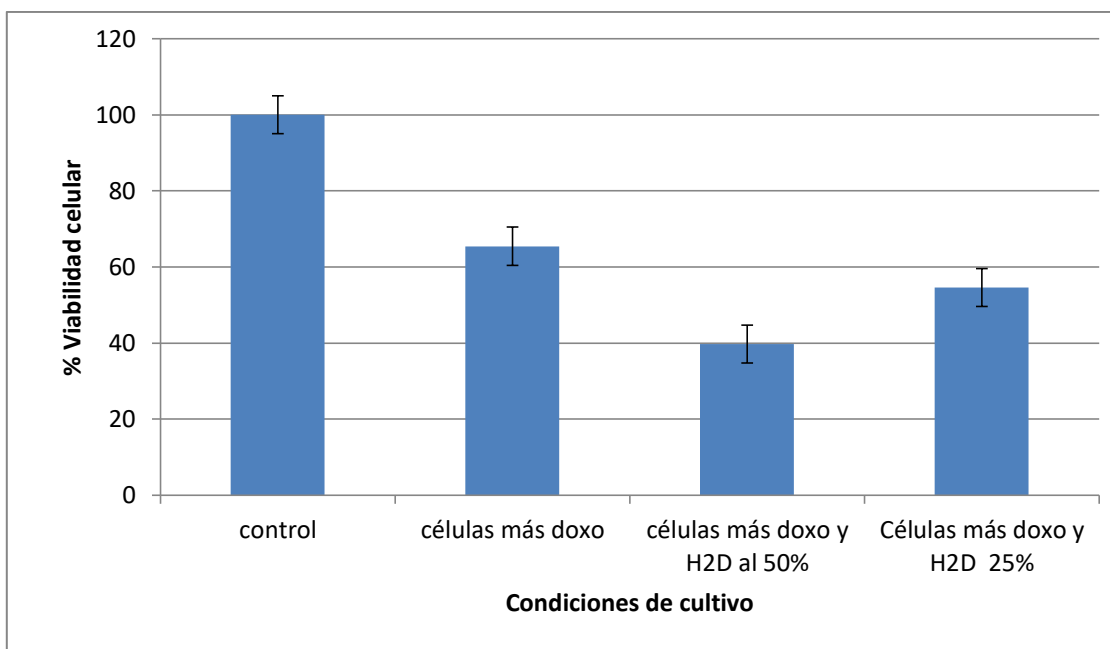


Figura 4. Porcentaje de viabilidad celular para cultivo control y diferentes condiciones de cultivo expuestos a Doxorubicina, y agua deuterada, transcurridas 48 h. de cultivo.

A continuación se realizó el ensayo para evaluar viabilidad celular de EP 1% en presencia de D_2O . Los resultados (Fig.5 y Tabla 2). muestran que en los cultivos con EP se alcanza un 71 % de viabilidad, en los cultivos con EP combinada con D_2O al 50% una viabilidad de 63%, la que se incrementó a 78% cuando se usó la EP en combinación con D_2O 25%. Estos resultados demuestran la acción antiproliferativa de la EP, que es mayor en combinación con agua deuterada, sugiriendo la participación de oxígeno singlete en el mecanismo antiproliferativo de EP.

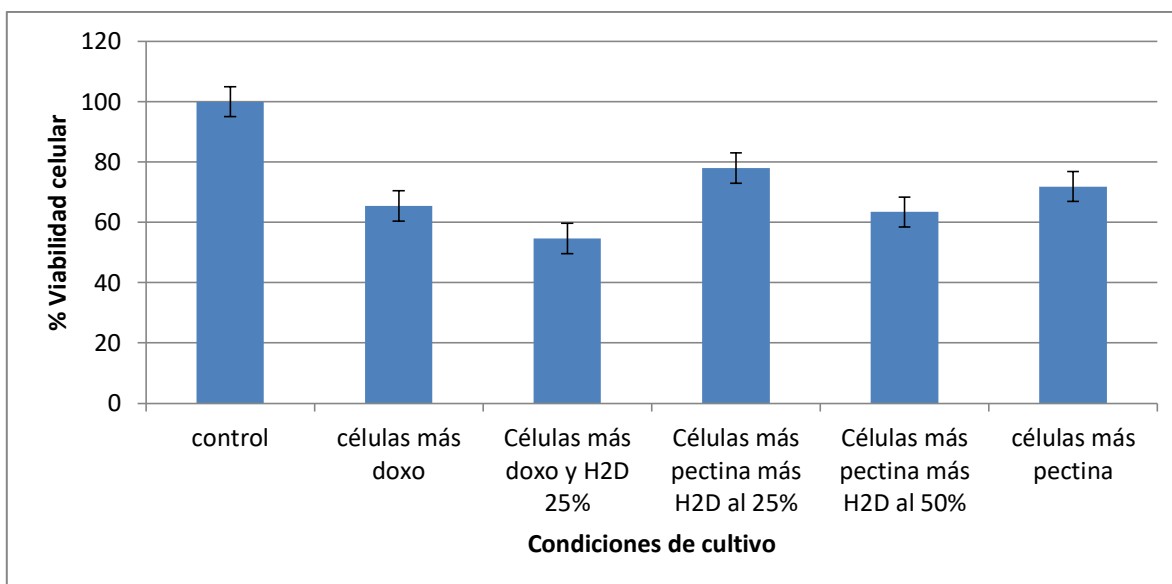


Figura 5. Porcentaje de viabilidad celular, de cultivo control y cultivos expuesto a doxorubicina, EP al 1%, y de ambas en combinación con agua deuterada, transcurridas 48 h. de cultivo.

TABLA 2.- Viabilidad celular (%) de células MCF-7 cultivadas en presencia de doxorubicina y EP

Condición de cultivo	% de Viabilidad celular
células más doxo	65,45
Células más doxo y H2D 25%	54,63
Células más pectina más H2D al 25%	77,98
Células más pectina más H2D al 50%	63,44
células más pectina	71,88

5.3.2. Detección de especies reactivas de oxígeno y/o nitrógeno

Para la evaluación de ERO y ERN se prepararon los cultivos celulares para las condiciones control, EP, doxorrubicina y APPH (control positivo) y se realizaron mediciones a tiempo 0 y sin exposición a luminol. Estas curvas representan los valores basales de luminiscencia de cada cultivo.

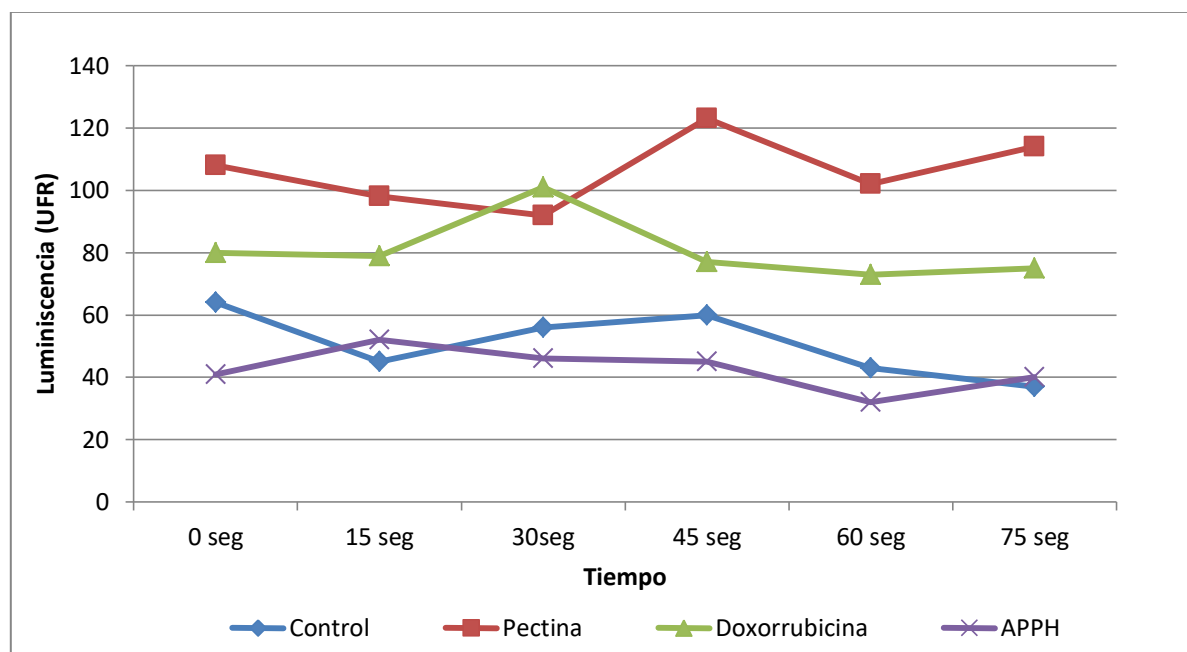


Figura N° 6. Cinética de la Luminiscencia en tiempo basal (sin adición de luminol), para diferentes condiciones de cultivo de células MCF-7.

Los resultados obtenidos en presencia de luminol se presentan en la fig. 7, donde se grafican las cinéticas resultantes de la oxidación de luminol, producidas por ERO y ERN para cada condición. Se observan diferencias a lo largo del tiempo medido y entre las condiciones estudiadas, donde el control positivo, APPH, mostró los mayores valores para ERO y ERN, luego los cultivos con doxorrubicina y pectina exhibieron valores cinéticos a de luminiscencia cercanos 250 (UFR), por lo que se deduce que la actividad es comparable, y finalmente el cultivo control muestra los menores valores de luminiscencia, cercanos a 100 (UFR), comparables con las observadas en las condiciones basales.

Los resultados obtenidos para oxígeno singlete junto con los de esta sección permiten sugerir que el mecanismo de acción de la pectina como antiproliferativo podría ser vinculado a la acción de estrés oxidativo.

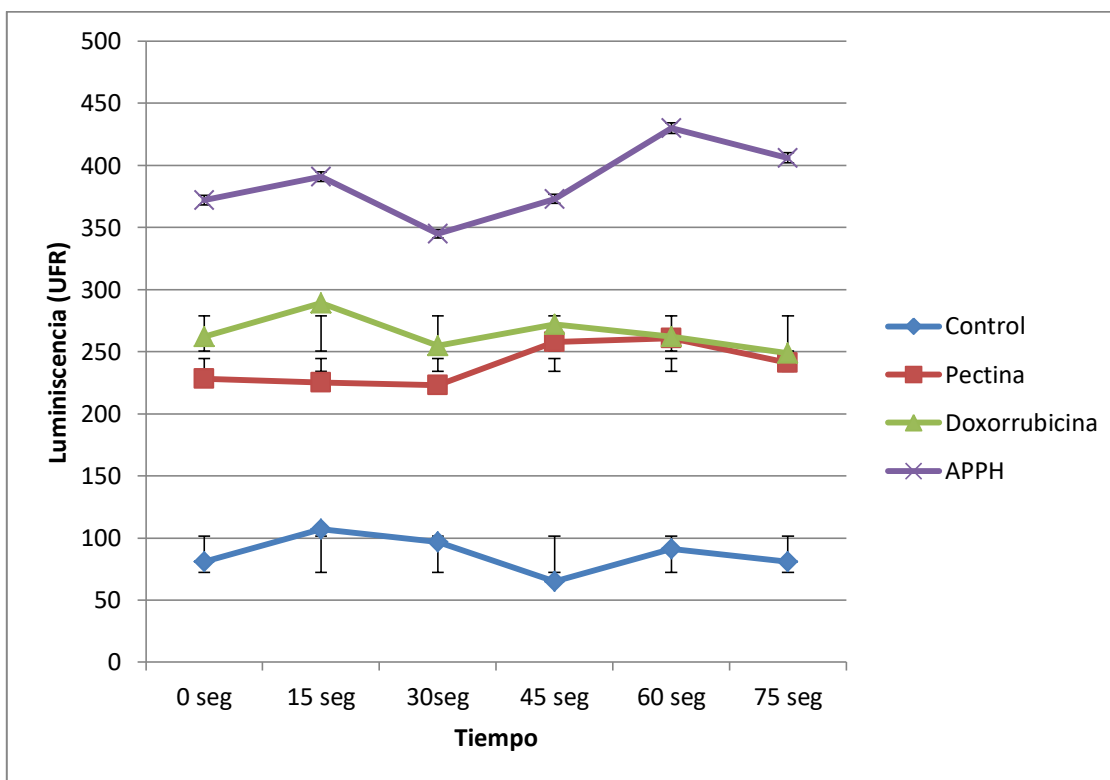


Figura 7. Cinética de Luminiscencia en cultivos de células MCF-7 luego de 1 h de exposición a luminol, en sobrenadante con diferentes condiciones de cultivo. Control (cultivo sin tratamiento), EP, Doxorubicina (cultivo expuesto a doxorubicina), APPH (cultivo expuesto a 2',2'-azobis-2-metilpropionamida).

5.4. Determinación de actividades enzimáticas

5.4.1 Detección de actividad superóxido de dismutasa

La actividad de SOD se determinó en un lisado de las células MCF-7, de los cultivos control y de otros expuestos a las condiciones con EP y doxorubicina. La figura 8 presenta la actividad enzimática por cada condición de estudio. Se observa que tanto EP como doxorubicina conducen a una reducción en la actividad SOD con respecto a la situación control. Esto implica que ambos reducen esta vía de defensa antioxidante.

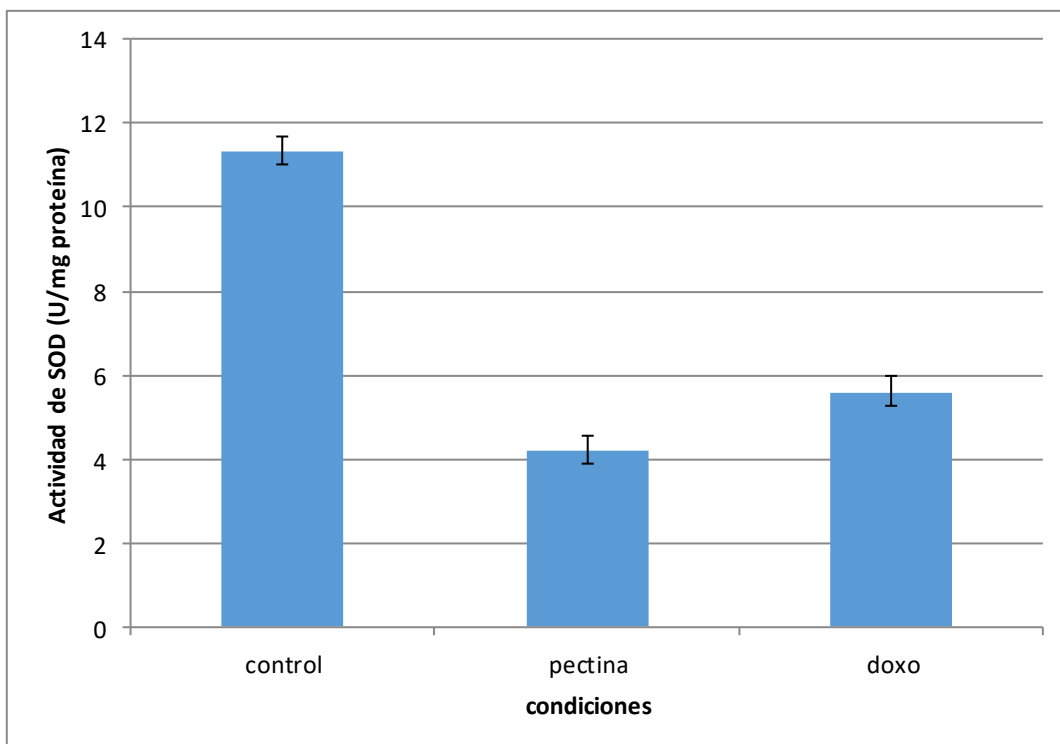


Figura 8: Actividad Superoxido dismutasa en lisados celulares de MCF-7 en distintas condiciones de cultivo. Control (medio de cultivo convencional), doxo (doxorubicina), EP.

5.4.2 Actividad de enzima catalasa

La actividad de catalasa se determinó de igual manera que para SOD, en lisado de células MCF-7 en cultivo, para control, cultivo con EP y la condición con doxorubicina. La actividad enzimática se representa en la Fig. 9 y se evidencia la mayor actividad en los cultivos con la pectina en estudio, en comparación con doxorubicina.

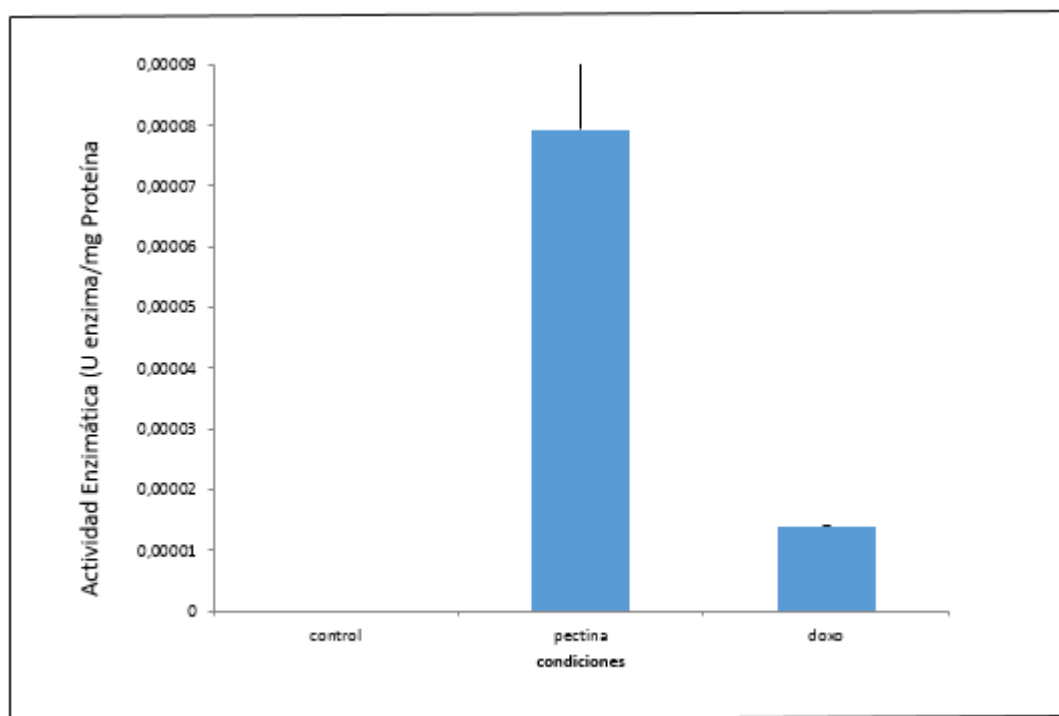


Figura 9. Actividad de catalasa en lisados celulares expuestos a distintas condiciones. Control (medio de cultivo convencional) Doxo (doxorubicina), EP.

6. DISCUSION

El primer objetivo a desarrollar en esta investigación se basó en la determinación de fenoles en el extracto péctico de coseta que se utilizó. Esta técnica para medir polifenoles se basa en la capacidad que tienen éstos para reducir (donar un electrón) el Mo(VI) a Mo(V) presente en el complejo molibdotungstato que caracteriza al reactivo de Folin. Si bien todos los métodos disponibles que emplean el reactivo de Folin aseguran la oxidación total de todos aquellos

compuestos capaces de reducirlo, éstos difieren en cuanto a las concentraciones de dicho reactivo empleadas, al tipo de base y concentración empleada para alcalinizar el medio (carbonato versus hidróxido de sodio), a los tiempos de incubación necesarios para hacer cuantitativa la reducción del reactivo (3-120 min), y las temperaturas de incubación de las muestras durante su análisis (20-50 °C) (Prior et al.2005), basado en este procedimiento se puede sugerir que el extracto no contiene polifenoles. Considerando que las pectinas como polisacáridos del tipo heteropolisacarido, contienen ácido ferúlico, por lo que se esperaba que los resultados fueran positivos para fenoles, se puede inferir que la fracción con que se trabajó no contiene esta molécula, lo que explica los resultados negativos e implica que las actividades informadas para los EP no se atribuyen a polifenoles.

Estos resultados difieren de la amplia información aportada por otros autores que han encontrado fenoles en distintas pectinas, extraídas por ejemplo de residuos de la industria chocolatera, en que pectinas de la cascarilla de *Theobroma cacao* L. presentaron niveles cercanos al 9,6 % de fenoles (Suarez D. y Orozco D. 2014). Por otro lado en este trabajo se discute sobre la importancia en los métodos de extracción de las pectinas y se destaca como más eficiente el método que usa ácido cítrico, por sobre el realizado con EDTA y ácido clorhídrico. Sin embargo, en esta investigación se usa una pectina fragmentada enzimáticamente lo que puede remover los grupos fenólicos presentes y observados por otros autores.

La técnica ORAC no sólo refleja el contenido total de los compuestos antioxidantes, sino también, la interacción aditiva, sinérgica o de potenciación que resulta de la simultánea presencia de estos, dando como resultado un valor que refleja la capacidad global o actividad antioxidante de un alimento (Prior et al. 2003). Se detectó una actividad antioxidante que no fue directamente proporcional a la concentración utilizada, pero si dependiente de ella, lo que es esperable según lo descrito por otros autores. Los efectos pro-oxidantes o antioxidantes de algunos antioxidantes dependen de su concentración, su

potencial redox; la presencia de otros antioxidantes, un ejemplo de ello es la oxidación producida al ADN, por el beta-caroteno en altas concentraciones, (Villanueva et al, 2012) La ausencia de polifenoles permite señalar que la actividad antioxidante detectada para EP como ORAC en equivalentes trolox se debe atribuir a componentes no fenólicos, como por ejemplo el ácido urónico (Wu et al.2013)

La determinación del estrés oxidativo involucra por una parte la determinación de la disminución de la acción antioxidante y por otra la demostración de la presencia de radicales libres, basado en esto es que se utilizó la técnica del agua deuterada (D_2O) para determinar oxígeno singulete, fundamentado en que el agua deuterada disminuye la velocidad desactivación del estado singulete aproximadamente en un orden de magnitud debido a que las frecuencias vibracionales disminuyen (Valenzuela A. 1983). Por lo tanto, se pudo demostrar que la producción de oxígeno singulete es parte del mecanismo de acción de inhibición de la proliferación celular con los datos obtenidos de los cultivos con agua deuterada y ya que se logró una mayor inhibición de la proliferación de las células MCF-7 a una mayor concentración de D_2O , en la cual se han estabilizado las especies oxígeno singulete.

Los resultados obtenidos para el efecto antiproliferativo de las EP son similares a los descritos para otras pectinas, se destaca un estudio en células MCF-7 y Caco-2 con pectinas aisladas desde raps desgrasados, donde las MCF-7 exhibieron mayor sensibilidad que las Caco-2 a la inhibición de la proliferación, por otra parte los resultados más notables fueron obtenidos con un preparado comercial (Cobbs et al. 2015).

La droga anticancerígena, doxorubicina, usada como control positivo, exhibió un gran poder antiproliferativo disminuyendo la viabilidad celular tanto cuando se cultivó células sólo con esta droga (llegando a un 65% de viabilidad celular), como cuando se combinó Doxorubicina con D_2O al 25%, siendo este último cultivo 10%

más antiproliferativo que la droga sola. Se ha descrito que ejerce su actividad antiproliferativa y pro apoptótica, entre otros mecanismos, por acción de los radicales libres y peróxido de hidrógeno que produce, ya que estos provocarían una peroxidación de la membrana celular y un aumento de la liberación de calcio del retículo endoplásmico hacia el citoplasma Lanore D. (2004), datos que sustentan el uso de doxorubicina como control positivo en el estudio de RL y cáncer.

No se encontró en la literatura investigaciones que relacionen las pectinas con la producción de oxígeno singlete ni con otras especies reactivas de oxígeno y/o nitrógeno. Existe un estudio que *evaluò* combinaciones de pectinas con aceite de pescado, demostrando que aumentan la apoptosis en el colonocito por la modulación del ambiente redox celular en un modelo *in vitro* de ratas (Sanders I & Henderson C. 2004). Por otra parte, las pectinas modificadas pueden inhibir células tumorales dependiendo del origen celular o la bio-distribución de fragmentos pépticos, asimismo las pectinas cítricas modificadas reducen las tasas de crecimiento de tumores en colon (LSLiM6) y cáncer de mama (MDA-MB-435) (Nangia-Makker et al. 2002; Platt D & Raz A. 1992). En un modelo de ratón con expresión de cáncer de colon, la metástasis al hígado se redujo por la ingesta de pectinas cítricas modificadas dependiente de la dosis (Liu et al. 2008). Se ha descrito recientemente una investigación en que se informa el efecto antiproliferativo exacerbado, al suministrar pectinas modificadas como fibra dietética, que inhibieron el crecimiento tumoral, indujo la apoptosis y suprimió la metástasis (Zhang et al., 2015).

Foot et al. (1995) y Martínez G. (2005) sugieren que el efecto citotóxico de la pectina es mediado por la producción de especies reactivas de oxígeno y/o nitrógeno y de oxígeno singlete lo que resulta consistente con los hallazgos presentados en esta investigación.

Por su parte se ha descrito en la literatura que un mediador de citotoxicidad originada por la exposición a oligosacáridos podría ser el anión radical superóxido, ya que la evidencia revela que el anión superóxido participa en respuestas fisiológicas celulares como proliferación y apoptosis. En el estudio de Hernández-Saavedra D. (2008) se destaca la presencia de respuestas divergentes y que pueden explicarse en términos de dosis-respuesta que ejemplifican la importancia del balance oxidativo. Un aumento descontrolado del nivel oxidativo puede causar la muerte o daños irreversibles de las células, por lo tanto el anión superóxido en altas concentraciones provoca muerte celular por apoptosis. Por su parte, esta investigación concluye que la actividad de la enzima Superoxido dismutasa, la cual es capaz de neutralizar la acción oxidativa del anión superóxido se ve claramente disminuida por acción de la pectina en estudio. Esto es relevante, ya que la pectina puede de esta manera contribuir a la destrucción de la célula tumoral.

Por su parte la importancia de evaluar la actividad de la catalasa, fue significativa no solo para demostrar la presencia de estrés oxidativo, si no que también para poder observar que los mecanismos oxidativos pueden diferir ampliamente ya que al comparar la acción de la pectina y la doxorubicina con respecto a la actividad de catalasa, la primera indujo un aumento y la segunda una reducción. Sin embargo, es necesario puntualizar que en general toda la actividad catalasa observada se encontró en niveles bajos en relación a lo reportado por otros autores (ref, aceite de pescado y otras).

Este estudio contribuye a explicar parcialmente el mecanismo de acción antiproliferativo de las pectinas, como complejos de polisacáridos de plantas, a través de la inducción de estrés oxidativo que se manifiesta en la producción de oxígeno singlete y ERO y ERN y reducción de la actividad SOD. Esto implica que pueden ser protagonistas o coprotagonistas de terapias contra el cáncer.

7. CONCLUSIÓN

Existen mecanismos relacionados con el estrés oxidativo involucrados en la actividad antiproliferativa de los oligosacáridos pécticos derivados de la coqueta agotada de remolacha.

BIBLIOGRAFIA

- Ames BN. Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science* 1983;221:1256-64.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993;90:7915-22.
- Ames BN. Gold LS. Environmental pollution, pesticides, and the prevention of cancer: misconceptions. *FASEB J.* 1997;11:1041-52.
- Aranda Malaves R. Efectos del ejercicio físico agotador sobre el estrés oxidativo asociado al envejecimiento. [Tesis Doctoral].Valencia: Universitat de Valencia:2003.
- Bellezza, I., A.L. Mierla and A. Minelli, 2010. Nrf2 and NF-κB and their concerted modulation in cancer pathogenesis and progression. *Cancers*, 2: 483-497.
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot (Lond)* 91: 179-194
- Cobs M, Concha J, Weinstein C, Zúñiga ME. Assessment of antiproliferative activity of pectic substances obtained by different extraction methods from rapeseed cake on cancer cell lines. *Carbohydrate Polymers*. Volume 117, 6 March 2015, Pages 923–932
- Concha, J and Zuñiga M. (2009) Enzymatic production of depectinated lignocellulosic material from sugar-beet pulp. *New Biotechnology* , S 177-178
- Czapski G. Reaction of .OH. *Methods Enzymol* 1984;105:209-15.

- David, R., & Ades, T. (2006). Complementary and alternative methods. *A cancer journal for clinicians*, 51, 316-320.
- Deder Lanore, C. D. (2004) Efectos secundarios de la Quimioterapia. *Quimioterapia Anticancerosa*. p. 58.
- Foote CS, Clennan (1995) EL. Properties and reactions of singlet oxygen. In: *Active oxygen in chemistry*. pp 105-140.
- Freeman BA, Crapo J. Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982; 47:412-26.
- Gaube, F., Wolfl, S., Pusch, L., Kroll, T., Hamburger, M. (2007). Gene expression profiling reveals effects of *Cimicifuga racemosa* (L.)NUTT. (black cohosh) on the estrogen receptor positive human breast cancer cell line MCF-7. *Bio med Central Pharmacology* , 1-19.
- Giménez Llorca A. Púrpura de Schölein-Henoch y estrés oxidativo [Tesis Doctoral]. Barcelona: Universidad de Barcelona;2004.
- Gonda, T.A., S. Tu and T.C. Wang, 2009. Chronic inflammation, the tumor microenvironment and carcinogenesis. *Cell Cycle*, 8: 2005-2013
- Grivennikov, S.I., F.R. Greten and M. Karin, 2010. Immunity, inflammation and cancer. *Cell*, 140: 883-899
- Gutiérrez, J. (2002) "Daño oxidativo, Radicales Libres y Antioxidantes" 31: 126–33.
- Gutowski, M. and S. Kowalczyk, 2013. A study of free radical chemistry: Their role and pathophysiological significance. *Acta Biochim*. Vol., 60: 1-16
- Halliwell B. and Gutteridge J. (1999). Free radicals in biology and medicine. 3ª Edición. Oxford University Press
- Halliwell, B., 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.*, 141: 312-322

- Hernandez-Saavedra, D. (2008) Proliferación y apoptosis de linfocitos humanos cultivados inducidas por anión superóxido. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* , 533-538
- Jimenez I, Speisky C, Noran C. Radicales libres y antioxidantes en la prevención de enfermedades: II mecanismo de defensa antioxidantes. *Rev Chil Nutr* 2000; 27 (2): 210-9.
- Jimenez de la Jara J., Bastias G., Ferreccio C., Moscoso C., Sagues S., (2015). A snapshot of cancer in Chile: analytical frameworks for developing a cancer policy. *Biological Research*. 48:10
- Kalam S, Zahoor M, Singh R y Ankat A. Free Radicals: Implications in Etiology of Chronic Diseases and Their Amelioration through Nutraceuticals, *Pharmacology* Volume 6 Issue 1, 2015
- Koriem K, Arbid M, Emamd K. Therapeutic effect of pectin on octylphenol induced kidney dysfunction, oxidative stress and apoptosis in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. Volume 38, Issue 1, July 2014, Pages 14–23
- Levenson AS, J. V. (1997). MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. *Perspectives in Cancer Research* , 57; 3071-3078.
- Liu, H. Y., Huang, Z. L., & Yang, G. H. (2008). Inhibitory effect of modified citrus pectin on liver metastases in a mouse colon cancer model. *Journal of Practical Oncology*, 23, 509–514
- López-Alarcón C, Lissi E: (2005) Interaction of pyrogallol red with peroxy radicals. A basis for a simple methodology for the evaluation of antioxidant capabilities. *Free Radical Research*, 39:729-736.
- López-Alarcón C. Lissi E. (2006) Novel and simple ORAC methodology based on the interaction of Pyrogallol red with peroxy radicals. *Free Radical Research* 979-985;

- Nangia-Makker, P., Hogan, V., Honjo, Y., Baccarini, S., Tait, L., Bresalier, R., et al. (2002). Inhibition of human cancer cell growth and metastasis in nude mice by oral intake of modified citrus pectin. *Journal of the National Cancer Institute*, 94, 1854-1862.
- Martínez, G. (2005) “Especies reactivas del oxígeno y balance redox, Parte I: Aspectos Básicos Y Principales Especies Reactivas Del Oxígeno.” *Revista Cubana de Farmacia* 39, no. 3: 0–0
- Miranda CE, Capote RK, Janer LN, Martí CN. Un acercamiento a la teoría de los radicales libres y el stress oxidativo en el envejecimiento. *Rev Cubana de Invest Biomed* 2000;19(3):186-87
- Peralta, O.. (2002) Cáncer de mama en Chile, datos epidemiológicos . *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología*, 439-445.
- Pieczenik, S.R. and J. Neustadt, 2007. Mitochondrial dysfunction and molecular pathways of disease. *Exp. Mol. Pathol.*, 83: 84-92
- Platt, D., & Raz, A. (1992). Modulation of the lung colonization of B16-F1 melanoma cells by citrus pectin. *Journal of the National Cancer Institute*, 84(6), 438-442.
- Prior RL, Hoang H, Gu L, Wu X, et al. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC(FL))) of plasma and other biological and food samples. *J Agric Food Chem.* 2003; 51(11):3273-3279.
- Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem.* 2005; 53(10):4290-4302.
- Ray, G. and S.A. Husain, 2002. Oxidants, antioxidants and carcinogenesis. *Indian J. Exp. Biol.*, 40: 1213-1232

- Sanders I., Henderson C.,(2004) An Increase in Reactive Oxygen Species by Dietary Fish Oil Coupled with the Attenuation of Antioxidant Defenses by Dietary Pectin Enhances Rat Colonocyte Apoptosis. *The journal of nutrition*. 134; 3238-3233
- Singleton V.L., (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocateu reagent. *Methods Enzymol* , 152-178
- Sosaa V, Molinéa T, Somozaa R, Paciuccib R, Kondohc H, LLeonarta M. Oxidative stress and cancer: An overview. *Ageing Research Reviews*. Volume 12, Issue 1, January 2013, Pages 376–390
- Valenzuela, A. (1983). Citotoxicidad del Oxígeno:Aspectos Biologicos y Medicos. *Revista Médica de Chile*, 111, 829-836.
- Venereo JR. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cubana Med Milit* 2002;31(2):126-33.
- Zapata S, Piedrahita A, Rojano B. Capacidad atrapadora de radicales oxígeno (ORAC) y fenóles totales de frutas y hortalizas de Colombia. *Perspectivas en nutrición humana* .Vol. 16, N° 1, enero-junio de 2014, p. 25-36
- Zhang W, Xub P, Zhanga H. Pectin in cancer therapy: A review. *Trends in Food Science & Technology*. Volume 44, Issue 2, August 2015, Pages 258–271.