



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA ARGENTINA

Ingeniería Agronómica

**Efecto del tratamiento con extractos de polisacáridos de la especie
Lotus tenuis sobre la proliferación de líneas celulares tumorales**

*Trabajo final de graduación para optar por el título de:
Ingeniero Agrónomo*

Autor: Bautista Piloni

Tutores:

Dra. Maria Elena Vago

Dra. Helena Sterle

Dra. Marina Cianza

Marzo 2024

<u>Resumen</u>	<u>4</u>
<u>Introducción</u>	<u>5</u>
<u>Polisacáridos.</u>	<u>5</u>
<u>Cáncer.</u>	<u>5</u>
<u>Tratamientos contra el cáncer.</u>	<u>6</u>
<u>Hidratos de carbono.</u>	<u>7</u>
<u>Clasificación de polisacáridos.</u>	<u>7</u>
<u>Efecto inmunomodulador y antitumoral de especies vegetales.</u>	<u>8</u>
<u>Lotus tenuis.</u>	<u>9</u>
<u>Respuesta inmunológica de las plantas.</u>	<u>10</u>
<u>Polisacáridos y pared celular.</u>	<u>10</u>
<u>Análisis de hidratos de carbono.</u>	<u>11</u>
<u>Hipótesis de trabajo.</u>	<u>12</u>
<u>Objetivo.</u>	<u>12</u>
<u>Materiales y Métodos.</u>	
1) <u>Extracción de los polisacáridos de las paredes celulares de tallos de Lotus tenuis</u>	<u>13</u>
2) <u>Solubilización y preparación de muestras:</u>	<u>14</u>
3) <u>Cultivo de líneas celulares tumorales</u>	<u>16</u>
4) <u>Ensayo de viabilidad celular (MTS)</u>	<u>18</u>
<u>Resultados y discusión.</u>	<u>22</u>
1.- <u>Evaluación del efecto de los extractos obtenidos con agua y con CDTA.</u>	<u>22</u>
1.1 <u>Efecto sobre la línea murina de cáncer de mama EO771</u>	<u>22</u>
1.2 <u>Efecto sobre la línea humana de cáncer de mama MDA-MB-231</u>	<u>23</u>
1.3 <u>Efecto sobre la línea murina de melanoma B16F10</u>	<u>25</u>
1.4 <u>Efecto sobre la línea humana de cáncer de colon CACO-2</u>	<u>26</u>
<u>Conclusión</u>	<u>28</u>
<u>Bibliografía</u>	<u>29</u>
<u>Anexo</u>	<u>35</u>

Resumen

El cáncer es la principal causa de muerte en todo el mundo y se produce cuando células normales que pueden ser de diversos tejidos y órganos del cuerpo se transforman en células tumorales a través de un proceso de varias etapas que suele consistir en la progresión de una lesión precancerosa a un tumor maligno. Si bien en la actualidad existen diversos tipos de tratamiento para el cáncer que dependen del tipo de cáncer y de lo avanzado que esté, la mayor parte de los pacientes reciben tratamientos como quimioterapia o radioterapia que presentan efectos secundarios indeseados. En la búsqueda de alternativas de tratamientos que tengan menores efectos secundarios, se ha demostrado que diversos polisacáridos de origen natural, de plantas, algas y hongos, presentan capacidad antitumoral. Teniendo esto en consideración y en base a trabajos previos de este grupo de investigación con polisacáridos de paredes celulares vegetales, se utilizaron para este estudio polisacáridos extraídos de las paredes celulares de *Lotus tenuis*. Esta especie de leguminosa forrajera aporta un interesante contenido proteico en ambientes marginales de una amplia zona de cría bovina en Argentina. La extracción se hizo en forma secuencial y se probaron los extractos obtenidos con agua, que contienen fundamentalmente pectinas poco retenidas en la pared, y extractos obtenidos con ácido trans-1,2-diamino-ciclohexano-N,N,N',N'-tetraacético (CDTA), que contiene aquellas pectinas que se encuentran unidas a la pared por interacción iónica. Estos extractos fueron utilizados en distintas concentraciones para evaluar su efecto antitumoral sobre células murinas (ratón) y humanas de cáncer de mama, de piel y de colon. Los resultados encontrados son significativos y promisorios con las concentraciones más altas utilizadas (1mg/ml), con mejores respuestas en las células humanas que en las murinas, especialmente para los extractos de agua. En estas condiciones, en la línea celular de cáncer de colon humano Caco-2 se observó una disminución del 41,06% de la viabilidad celular respecto al basal y en la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231, se observó una reducción del 25,69% de la viabilidad celular respecto al basal al ser tratadas con el extracto de agua en una concentración de 1mg/ml. Por otra parte, en cuanto a las líneas celulares murinas, en la línea celular de cáncer de mama EO771 se observó una reducción de 24,64% en la viabilidad respecto al basal utilizando la misma concentración de extractos (1mg/ml), mientras que en la línea celular de melanoma B16F10 se observó una reducción del 32%. Estos resultados preliminares muestran que estos extractos podrían ser una opción natural para el tratamiento del cáncer. Se debería continuar con la línea de investigación para poder profundizar en los mecanismos involucrados en los efectos antitumorales de los extractos de *Lotus tenuis* en cáncer y su potencial uso en el tratamiento de esta enfermedad.

Introducción

En las últimas décadas, los polisacáridos aislados de fuentes naturales (hongos, algas, líquenes y plantas superiores) han llamado mucho la atención en el campo biomédico debido a su amplio espectro de propiedades terapéuticas (Schepetkin & Quinn 2006). Existen varias publicaciones que refieren efectos inmunoestimuladores, antitumorales, bactericidas, anticoagulantes y otros efectos terapéuticos logrados con la utilización de extractos de origen vegetal y fúngico (Schepetkin & Quinn 2006; Fang 2015; Zhang et al. 2007). Estos resultados encontrados son prometedores para el tratamiento de diversas patologías. Los efectos antitumorales encontrados brindarán una nueva perspectiva para el tratamiento de enfermedades cancerígenas.

Cáncer es un término genérico utilizado para designar un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. Esta enfermedad se produce cuando células normales se transforman en células tumorales a través de un proceso de varias etapas que suele consistir en la progresión de una lesión precancerosa a un tumor maligno.

El cáncer es la principal causa de muerte en todo el mundo: en 2020 se atribuyeron a esta enfermedad casi 10 millones de defunciones. Los cánceres más comunes en 2020 fueron los siguientes: de mama (2,26 millones de casos); de pulmón (2,21 millones de casos); colorrectal (1,93 millones de casos); de próstata (1,41 millones de casos); de piel (1,20 millones de casos); y gástrico (1,09 millones de casos) (Ferlay 2020). Debido a su importancia se centró el estudio en el cáncer de mama, el cáncer colorrectal, también denominado cáncer de colon y el de piel.

El cáncer de mama es una neoplasia que se origina en las células del tejido mamario, caracterizado por la proliferación descontrolada de células malignas en la glándula mamaria. Es el tipo de cáncer más común entre las mujeres a nivel mundial. Los factores de riesgo incluyen antecedentes familiares, edad avanzada, exposición hormonal y genética. (<https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer.html>, American Cancer Society. 2022).

El cáncer de colon se origina en el intestino grueso y es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. Este tipo de cáncer se desarrolla a partir de pólipos pre-cancerosos que crecen en la mucosa del colon o del recto. Factores de riesgo incluyen la edad avanzada, antecedentes familiares, dieta rica en grasas y pobre en fibra, así como condiciones inflamatorias intestinales. (www.cancer.gov/types/colorectal. National Cancer Institute. 2022).

El melanoma es un tipo agresivo de cáncer de piel que se desarrolla a partir de los melanocitos, células que producen el pigmento melanina. Este cáncer puede surgir en la piel, los ojos y, ocasionalmente, en las membranas mucosas. La exposición excesiva a la radiación ultravioleta, antecedentes familiares y la presencia de lunares atípicos son factores de riesgo conocidos. (www.skincancer.org/skin-cancer-information/melanoma/. Skin Cancer Foundation. 2022).

A la fecha se cree que la propensión a tener cáncer sería el resultado de la interacción entre factores genéticos de la persona afectada y ciertas categorías posibles de agentes externos que pueden ser: carcinógenos físicos, como las radiaciones ultravioletas e ionizantes, entre otras; carcinógenos químicos, como el amianto, sustancias contenidas en el humo de tabaco, las aflatoxinas que contaminan los alimentos y el arsénico presente en el agua de bebida, entre otras; y carcinógenos biológicos, como determinados virus, bacterias y parásitos. También existen otros predisponentes como ser el sobrepeso y el sedentarismo (WCRF 2018; Ferlay 2020).

Si bien en la actualidad existen diversos tipos de tratamiento para el cáncer, éstos dependen del tipo de cáncer y de lo avanzado que esté. Algunas personas con cáncer solo recibirán un tipo de tratamiento. Sin embargo, la mayoría recibe una combinación de tratamientos como cirugía con quimioterapia o con radioterapia o inmunoterapia (Ju et al. 2023).

Los tratamientos contra el cáncer pueden tener varios efectos secundarios. Un efecto secundario ocurre cuando el tratamiento daña las células sanas. Los efectos secundarios pueden ser distintos en cada persona, y variar según los distintos medicamentos y tipos de tratamiento. Dentro de estos efectos secundarios se pueden reconocer: neutropenia (disminución en la cantidad de glóbulos blancos.), linfedema (inflamación en un brazo o una pierna ocasionada por una obstrucción del sistema linfático), pérdida de cabello, náuseas y vómitos, entre otros. Las terapias convencionales para el tratamiento de tumores implican tratamientos agresivos, por este motivo es que cada día las terapias holísticas o no invasivas toman más importancia a la hora de evaluar un tratamiento (www.cdc.gov/efectos secundarios del tratamiento contra el cáncer. Mayo 2023).

La farmacoterapia con productos naturales es una alternativa que va despertando un mayor interés como terapia ante enfermedades y patologías que, en el futuro, podrá sustituir o ayudar a la terapia tradicional siendo nulos o escasos sus efectos secundarios (Yu et al. 2018). Especialmente en la cultura oriental existen muchos “remedios caseros”, de hierbas medicinales utilizadas ampliamente para evitar los efectos secundarios de los medicamentos quimioterapéuticos. Estos remedios incluyen diversos polisacáridos por lo que se creía que

tenían propiedades biológicas benignas. En los últimos años se ha demostrado experimentalmente que ciertos polímeros de hidratos de carbono poseen como potentes efectos inmunomoduladores y antitumorales (Tzianbos 2000; Schepetkin & Quinn 2006).

Dentro de los hidratos de carbono, los polisacáridos son polímeros compuestos por monosacáridos unidos entre sí mediante enlaces glicosídicos. Estas estructuras pueden ser lineales o contener cadenas laterales ramificadas. Los polisacáridos tienen una fórmula general de $C_x(H_2O)_y$, donde x suele ser un número grande entre 200 y 2500. Teniendo en cuenta que las unidades repetitivas en la cadena principal del polímero suelen ser monosacáridos de seis carbonos, la fórmula general también se puede representar como $(C_6H_{10}O_5)_n$ donde n puede presentar el siguiente rango de valores: $40 \leq n \leq 3000$.

Los polisacáridos se pueden clasificar en dos grupos según su origen. Los polisacáridos naturales se obtienen de diversos organismos, como algas, plantas, microorganismos y animales. En contraste, los polisacáridos semisintéticos son producidos por la modificación química o enzimática de las macromoléculas originales (Caliceti et al. 2010). Los polisacáridos obtenidos de diferentes fuentes y por diferentes metodologías de análisis, presentan una variedad de composiciones químicas, pesos moleculares y estructuras. Los polisacáridos poseen distintas propiedades fisicoquímicas que incluyen la posibilidad de formar geles, rangos de solubilidad diferentes, bajo efecto osmótico y diversas propiedades superficiales dependiendo de su composición y arquitectura (Chandra, et al. 1998, Meyers et al. 2008). Como una clase estructuralmente diversa de macromoléculas, los polisacáridos juegan papeles diversos e importantes en muchos procesos biológicos (Chandra, et al. 1998). Además de servir como reservas de energía (por ejemplo, almidón y glucógeno) y componentes estructurales (por ejemplo, celulosa en las plantas y quitina en los artrópodos), los polisacáridos y sus derivados participan en el reconocimiento de señales y la comunicación entre células y también desempeñan funciones clave en el sistema inmunitario, en la prevención de la patogenia, la coagulación de la sangre y el desarrollo del sistema inmune (Chandra, et al. 1998).

Existe evidencia acumulada que ha demostrado que los polisacáridos tienen un amplio espectro de efectos biológicos, como actividades antibióticas, antioxidantes, antimutantes, anticoagulantes e inmunoestimuladores (Alkahtani, et. al 2020). La eficacia anticancerígena de los polisacáridos fue reconocida por primera vez por Nauts et al. en 1946; quienes descubrieron que ciertos polisacáridos podían inducir la remisión completa en pacientes con cáncer como se hace referencia en diversas publicaciones (Zhang et al. 2010). Numerosos estudios han sugerido que los polisacáridos pueden inhibir el crecimiento tumoral a través de

los siguientes mecanismos comunes: (1) la prevención de la tumorigénesis mediante el consumo oral de preparaciones activas; (2) mediante una actividad anticancerígena directa, tal como la inducción de apoptosis de células tumorales; (3) mediante una actividad de inmuno potenciación (estimulación de los macrófagos) en combinación con quimioterapia; o (4) mediante la inhibición de la metástasis tumoral (Zong et al. 2012).

La actividad antitumoral de los polisacáridos puede estar asociada con efectos directos sobre las células tumorales o con efectos sobre diferentes componentes del microambiente tumoral, que conducen a la regulación de la progresión de los tumores. Se ha demostrado que los polisacáridos obtenidos de diversos vegetales inhiben el crecimiento de células tumorales tanto *in vitro* como *in vivo* en modelos animales. Los mecanismos implicados en estos efectos incluyen daño mitocondrial, inducción de apoptosis, detención del ciclo celular y daño al ADN, todos procesos que en última instancia conducen a la muerte de las células tumorales.

Además, se ha demostrado que algunos polisacáridos obtenidos de algas pueden regular la angiogénesis, reduciendo la proliferación y migración de las células endoteliales, inhibiendo la formación de nuevos vasos que alimentan a las células tumorales. Otro tipo de respuestas encontradas son los efectos sobre las respuestas inmunes antitumorales, estando estos efectos entre los más importantes en su actividad antitumoral. Existen diversas publicaciones que reflejan el efecto inmunomodulador y anticancerígeno de varias especies de plantas (Ju et al. 2023), algas (rojas, pardas, verdes, entre otras) (Zong et al. 2012), como también de algunos hongos (Zong et al. 2012).

Existen publicaciones que refieren el efecto inmunomodulador y antitumoral de especies vegetales (familia de las gramíneas, de las leguminosas, de las compuestas, entre otras) (Schepetkin & Quinn 2006). No hemos encontrado referencias respecto a la utilización de extractos de polisacáridos de paredes celulares de especies normalmente utilizadas como forrajes por rumiantes en pastoreo que tengan amplia distribución en el medio como puede ser la especie *Lotus tenuis*.

Lotus tenuis es una fabácea (leguminosa) nativa de la región del Mediterráneo. Fue introducida en la Argentina y se adaptó exitosamente a los ecosistemas de la Cuenca del Río Salado en la provincia de Buenos Aires y también en varias zonas del país en un proceso de naturalización inédito y sorprendente, convirtiéndose en una especie clave en la oferta forrajera de estos ambientes (Maguire et al. 2020). Es una forrajera muy valiosa, que mantiene altos niveles de digestibilidad a lo largo de su ciclo de crecimiento, presenta un alto contenido proteico, favorecido por su capacidad de establecer una relación simbiótica con rhizobios y micorrizas que el permiten fijar nitrógeno atmosférico y no produce empaste (García et al. 2008).

L. tenuis es una planta perenne herbácea, con reproducción sexual, y crecimiento postrado (Miñón et al. 1990). El tallo principal forma a partir del primer año de crecimiento una corona que posee numerosas yemas capaces de producir ramas herbáceas de crecimiento indefinido. Estos ejes primarios ramifican a partir de yemas ubicadas en las axilas de las hojas dando origen a ramas secundarias y terciarias (Miñón et al. 1990). Al finalizar el período reproductivo, las ramas mueren total o parcialmente y son reemplazadas en el próximo ciclo a partir de yemas de la corona (Miñón et al. 1990).

Las plantas han desarrollado en el tiempo estrategias anatómicas y químicas para resistir adversidades abióticas y bióticas. A diferencia de los animales, las respuestas inmunológicas de las plantas frente a los distintos tipos de estrés se basan en la respuesta de cada célula y señales sistémicas emanadas de los sitios afectados (Jones, & Dangl 2006; Dangl & Jones 2001; Ausubel 2005). Gran parte de estas resistencias se deben a sus paredes celulares, cuya función es darles forma, rigidez, resistencia mecánica y protección frente a organismos patógenos, depredadores y adversidades medioambientales (Buxton 1993; Brett & Waldrón 1990; Somerville et al 2004). Esas paredes celulares se encuentran constituidas principalmente por polisacáridos, proteínas y lignina (Aman 1993). Mientras que todas las paredes celulares comparten ciertas características químicas básicas, existen importantes diferencias entre los tejidos vegetales en concentración, composición y organización estructural de sus paredes celulares (Jung 2012).

Los polisacáridos de las paredes celulares de los forrajes son complejos difiriendo extensamente en propiedades físicas y efectos nutricionales (Graham et al. 1990). El desarrollo de métodos de análisis más sofisticados y exactos para el análisis de los polisacáridos de las paredes celulares vegetales se ha ido profundizando al observar que éstas no solo son componentes de rendimiento energético, sino que también pueden influir en la utilización de otros componentes de las dietas (Aman y Graham 1990).

La celulosa es el componente más abundante de las paredes celulares y está compuesta exclusivamente de cadenas lineares de β -D-glucosa. La molécula extendida forma una cinta plana, la cual adquiere rigidez por los enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares. Estos enlaces de hidrógeno producen una disposición cristalina regular de la cadena de unidades de glucosa, que controla las características físicas y químicas de la celulosa (Aman 1993).

El resto de los polisacáridos de la pared pueden separarse en dos grupos, hemicelulosas y pectinas (Jung 2012). Las hemicelulosas son un gran grupo de polisacáridos compartiendo básicamente la propiedad de poder ser extraídos de las paredes utilizando soluciones alcalinas y de ser capaces de enlazarse a la celulosa por múltiples enlaces hidrógeno (McNeill et al. 1984). Incluyen xilanos, xiloglucanos y mananos (Aman 1993). Somerville et al. (2004) indica que las hemicelulosas son polisacáridos ramificados, conteniendo un esqueleto de azúcares neutros, que pueden formar enlaces de hidrógeno con la superficie de las fibrillas de celulosa.

Las pectinas son un conjunto de polisacáridos aún más diverso, compartiendo la propiedad de ser solubles en soluciones acuosas de quelantes de calcio, como el ácido oxálico (Jung 2012). Este grupo de polisacáridos se encuentra en la lámina media de la pared celular

primaria e interactúa con el entramado de hemicelulosas y celulosa. Son más abundantes en dicotiledóneas (por ejemplo, en leguminosas), que en las monocotiledóneas (por ejemplo, en las gramíneas). Las pectinas se caracterizan por la presencia de ácidos urónicos como principales componentes (Somerville et al. 2004). En ambas, dicotiledóneas y monocotiledóneas, se han caracterizado estructuralmente tres tipos de pectinas: ramnogalacturonano I, ramnogalacturonano II y homogalacturonanos (O'Neill et al. 1990). Las pectinas son importantes para el control de la porosidad de la pared, la adhesión de células continuas y en el control del ambiente iónico de la pared celular (Somerville et al., 2004). McNeil et al. (1984) indica que las pectinas sirven como moléculas de reconocimiento que señalan el desarrollo de respuestas frente a organismos simbióticos, patógenos e insectos.

Para analizar los hidratos de carbono componentes de las paredes celulares se utilizan diversas metodologías. Para la evaluación de especies forrajeras los productores y los nutricionistas habitualmente utilizan el sistema de detergentes de Van Soest (Van Soest 1994), ya que es un método relativamente sencillo que fracciona los componentes de la pared, separando una matriz insoluble y luego estima sus componentes. Esto permite obtener dos fracciones, fibra detergente neutro que se relaciona en forma inversa con el consumo voluntario y fibra detergente ácido que se relaciona en forma inversa con el coeficiente de digestibilidad (Mc Donald 2002). Pero si uno quisiera realizar una caracterización química más completa se puede utilizar un método más específico que es el análisis secuencial que permite la separación de extractos enriquecidos en los distintos componentes de estas paredes celulares mediante la utilización de distintos solventes y luego se realiza la caracterización química de esos componentes por espectrofotometría y cromatografía gaseosa (Vago 2019).

Este sistema de análisis de los componentes de las paredes celulares (Fry 1988) implica extracciones con etanol, acetona y éter para obtener un residuo insoluble en solventes orgánicos (RIA), libre de pigmentos, compuestos de bajo peso molecular, lípidos y otros componentes del contenido celular. Luego se realizan extracciones con distintos solventes, agua caliente, CDTA 0,05M, Na_2CO_3 0,05M, KOH 1M y KOH 4M. Cada uno de los pasos extractivos implica: dos extracciones con el solvente, la centrifugación de la muestra, un proceso de diálisis y el liofilizado de los residuos y de los extractos obtenidos (ver figura 01).

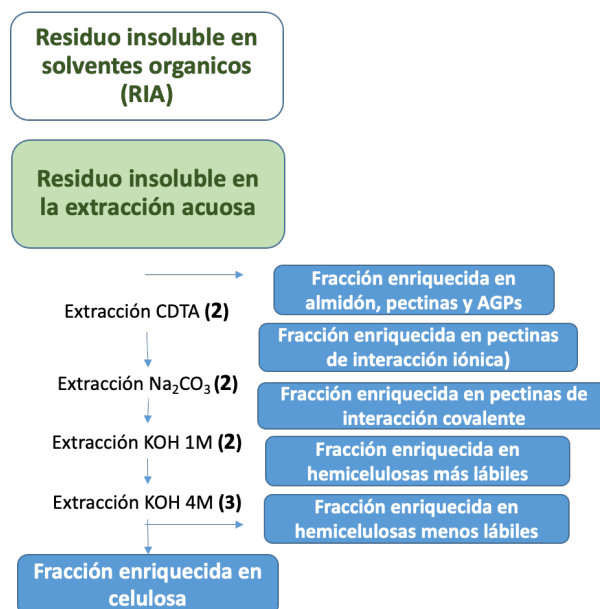


Imagen 01: Secuencia del análisis de los componentes de las paredes celulares partiendo del residuo insoluble (RIA) obtenido luego de las extracciones con solventes orgánicos (alcohol, acetona y éter etílico). AGP: arabinogalactanoproteínas; CDTA: ácido ciclohexano diamino tetraacético; Na₂CO₃: carbonato de sodio; KOH 1M-4M: hidróxido de potasio 1 molar y 4 molar.

Habiendo obtenido los extractos de las paredes celulares de los tallos de la forrajera *Lotus tenuis* y teniendo en cuenta lo presentado anteriormente se buscó estudiar si los extractos de las paredes celulares de esta especie presentan un efecto antitumoral en líneas celulares de cáncer de mama, melanoma y de colon.

Hipótesis de trabajo: Los polisacáridos obtenidos de las paredes celulares de *Lotus tenuis* tienen actividad citotóxica directa sobre distintos tipos de células tumorales. La magnitud de esta actividad dependerá del tipo de extracto utilizado y del tipo de célula tumoral tratada.

Objetivo general:

Evaluación del efecto de los polisacáridos obtenidos de las paredes celulares de *Lotus tenuis* sobre la viabilidad celular de diferentes líneas tumorales murinas y humanas.

- Objetivo 1: Evaluar el efecto del extracto acuoso de la extracción secuencial de tallos de *Lotus tenuis* en líneas celulares tumorales de cáncer de mama (murina y humana), melanoma (murina) y colon (humanas).
- Objetivo 2: Evaluar el efecto de extracto de CDTA de la extracción secuencial de *Lotus tenuis* en líneas celulares tumorales de cáncer de mama (murina y humana) y melanoma (murina).

- Objetivo 3: Comparar los resultados encontrados observando similitudes y diferencias entre los extractos utilizados. Determinar si los resultados son diferentes en las líneas humanas con respecto a las murinas.

De acuerdo a estos objetivos e hipótesis se avanzó con los materiales y métodos que se describen a continuación.

MATERIALES Y MÉTODOS

1) Extracción de los polisacáridos de las paredes celulares de tallos de *Lotus tenuis*

Para este trabajo se utilizaron tallos de plantas de *Lotus tenuis* que crecieron bajo invernáculo en condiciones controladas (100 plantas divididas en 20 macetas a razón de 5 plantas por macetas y separadas en cuatro bandejas para tener 4 repeticiones). La biomasa aérea fue cosechada cuando aparecieron las primeras flores. Se separó el material en tallos y hojas y se secó el material en estufa a 65°C hasta peso constante. Luego, los tallos fueron molidos en molino tipo Willey a 2mm. Sobre el material seco y molido se realizó una extracción secuencial para obtener los distintos componentes de la pared celular del modo descrito en la figura 1 siguiendo el procedimiento estándar (Fry 1988) para cada repetición. Para extraer los pigmentos y compuestos de bajo peso molecular, se efectuó una extracción con etanol 96% v/v (20g/150 ml) durante una hora en dos oportunidades consecutivas a temperatura ambiente. La suspensión obtenida fue centrifugada a 8000 rpm a 4 °C (Hermle Z 323 K, Germany), obteniendo un residuo, y dos sobrenadantes que se descartaron. El residuo fue extraído posteriormente en dos oportunidades consecutivas durante una hora con acetona a temperatura ambiente. La suspensión obtenida fue centrifugada a 8000 rpm a 4 °C, obteniendo un residuo y dos sobrenadantes. Estos sobrenadantes se descartaron. El residuo de la extracción con acetona fue extraído posteriormente con éter etílico durante una hora a temperatura ambiente. La suspensión obtenida fue centrifugada a 8000 rpm a 4 °C, obteniendo un residuo denominado insoluble en alcohol (AIR), que se secó al aire bajo campana durante una semana, y un sobrenadante que fue descartado. Como se presumía que esta fracción AIR contenía un alto porcentaje de glucosa proveniente de polisacáridos (α -glucanos) de reserva (almidón), se realizó un tratamiento con α -amilasa. Para el tratamiento con α -amilasa el residuo AIR fue disuelto en buffer fosfato 0,1 M (pH 6,9) y la enzima (α -amilasa tipo VI-B, origen: páncreas bovino; Sigma) se incorporó en tres agregados a lo largo de 24 hs con agitación constante a temperatura ambiente. La cantidad de α -amilasa necesaria se determinó de acuerdo al contenido de glucosa de la muestra y los datos de actividad de la

enzima provistos por el fabricante. La muestra fue luego dializada (MWCO 3500) y liofilizada. La extracción con agua se hizo realizando dos tratamientos sucesivos durante 3hs en agua destilada (20 g/L) a 100 °C y la suspensión obtenida fue centrifugada a 8500 rpm a 4 °C, obteniendo un residuo y dos sobrenadantes que fueron dializados (MWCO 6-8,000) en agua corriente durante 72 hs y luego en agua destilada por 4 hs, después fueron liofilizados. Los residuos luego fueron secuencialmente extraídos del mismo modo y en dos oportunidades sucesivas cada uno con ácido ciclohexano-trans-1,2-diamino-N,N,N',N'-tetraacético (CDTA) 0.05 M. En cada caso, cada suspensión obtenida fue centrifugada a 9500 rpm a 4 °C (Hermle Z 323 K, Germany) obteniendo un residuo y dos sobrenadantes (extractos), que se trataron separadamente. De este modo se obtuvieron el extracto acuoso (rico en pectinas poco retenidas en las paredes celulares y el extractos de CDTA (ricos en pectinas retenidas por interacciones iónicas).

2) Solubilización y preparación de muestras:

Los pooles de extractos obtenidos con ácido ciclohexano-trans-1,2-diamino-N,N,N',N'-tetraacético (CDTA) y agua caliente fueron mantenidos en un desecador al vacío.

Para realizar los ensayos, se pesaron 2 mg de cada extracto en un vial de vidrio, luego se agregó 1 ml de PBS 1 x y una barra magnética a cada vial y se dejó agitando durante 24 hs.



Ilustración 02. Muestras con PBS y barras magnéticas sobre la placa de agitación.

Al día siguiente se pusieron los viales en un baño de bloque seco (Thomas Sc.) a una temperatura de 90° C durante 5 minutos. Luego, se volvieron a colocar en la placa de agitación hasta el momento de su uso.

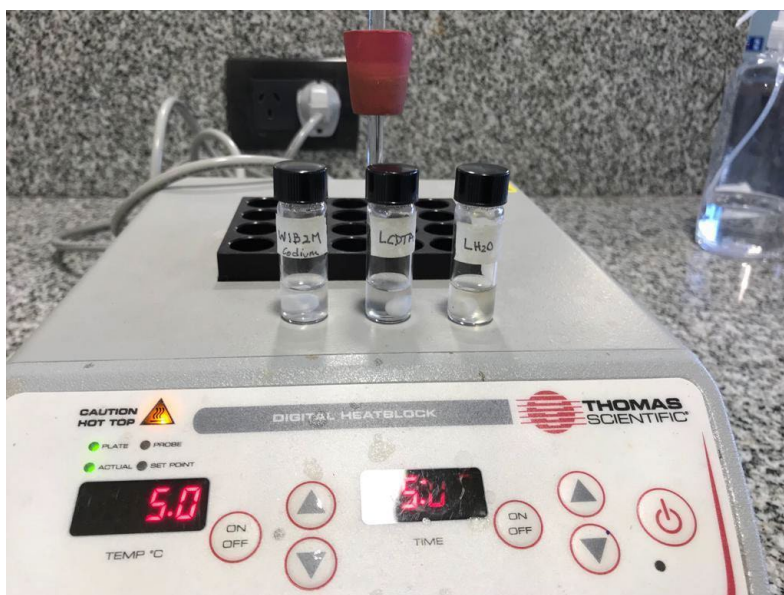


Ilustración 03. Muestras preparadas para colocar en el baño de bloque seco.



Ilustración 04. A: Incubadora B: Recipiente con células tumorales de ratón

Cada extracto fue filtrado a través de filtros para jeringa de membrana PES ($0.22\mu\text{m}$) para asegurar su esterilidad. Se realizaron ensayos a diferentes concentraciones de cada extracto de: 0.1, 0.25, 0.5 y 1 mg/ml.

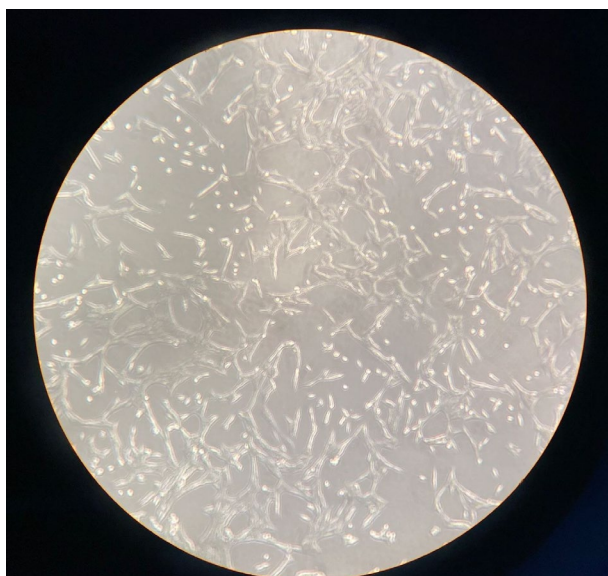


Ilustración 05. Células tumorales de ratón en microscopio

3) Cultivo de líneas celulares tumorales

Para llevar a cabo los experimentos realizados en este trabajo de tesis se utilizaron las siguientes líneas celulares:

- Células murinas de cáncer de mama EO771
- Células humanas de cáncer de mama MDA-MB-231
- Células de melanoma murino B16F10
- Células humanas de cáncer de colon Caco-2

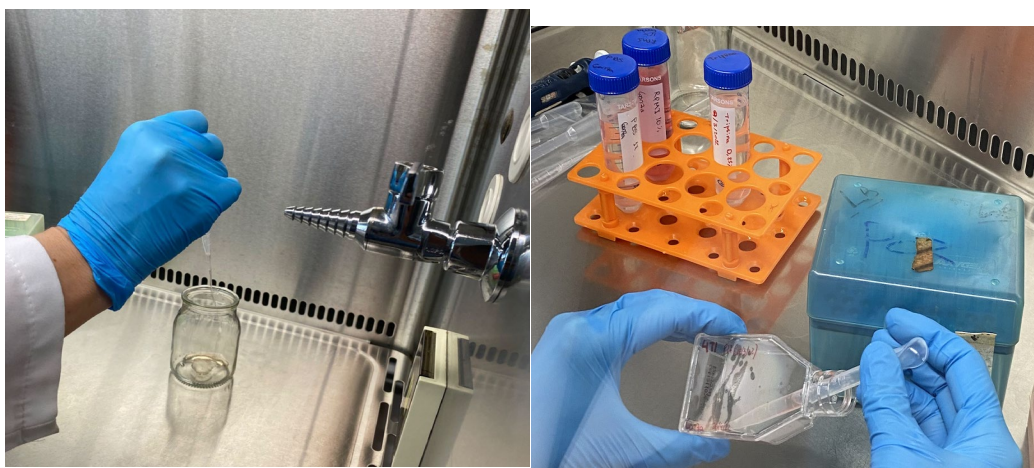


Ilustración 06. A: Medio de cultivo en recipiente de descarte. B: Extracción de medio de cultivo.

Los ensayos de cultivo celular fueron realizados en condiciones de esterilidad en una cabina de flujo laminar clase 2 (ESCO). Todas las líneas celulares se cultivaron en medio RPMI-1640

(Gibco) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SFB, Natocor), 2% de glutamina (Gibco), y 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco). Se mantuvieron en estufa gaseada a 37 °C, en atmósfera de CO₂ al 5% saturada de humedad (Thermo Fisher Scientific). Las líneas celulares utilizadas en este trabajo se adhieren a una superficie sólida formando una monocapa. Para realizar subcultivos se las debe disociar y crear suspensiones, para ello se utilizó una solución de tripsina: EDTA (0,25% P/V tripsina (Gibco), 0,02% P/V EDTA en PBS).

Para realizar los experimentos, las diferentes líneas celulares fueron expandidas en frascos de cultivo T-25 (Biofil) hasta alcanzar un 90-100% de confluencia. Luego, se descartó el sobrenadante del cultivo y se lavó la monocapa de células con PBS (solución tampón de fosfato que es isotónica para la célula) durante unos segundos a temperatura ambiente, con el fin de eliminar factores antitripsina que pudieran estar presentes en el SFB. Después de eliminar la solución de lavado, se agregó la solución de tripsina y se dejó actuar cinco minutos a 37°C hasta lograr el desprendimiento de las células adheridas. Luego, se adicionó el medio de cultivo, neutralizando la acción de la tripsina, se homogenizó la suspensión celular y se transfirió a un tubo de centrifuga de 15 ml (Falcon). Se centrifugó a 400 g durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se conservó el pellet de células.

4) Ensayo de viabilidad celular (MTS)

Para determinar si los extractos de polisacáridos provenientes del *Lotus tenuis* afectan la actividad metabólica en las líneas tumorales estudiadas, se realizó el ensayo de viabilidad MTS. Este método consiste en la reducción, por parte de las células viables, del compuesto tetrazolio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (o MTS). En la reacción también se agrega el agente acoplante de electrones metosulfato de fenazina (PMS). El producto de la reducción del MTS, el formazan, es soluble en el medio de cultivo. Esta reacción sólo tiene lugar cuando las enzimas reductasas mitocondriales están activas y, por tanto, la conversión está directamente relacionada con la viabilidad de las células en cultivo.

Para ello, en primer lugar, se realizó el conteo de células, para lo cual se utilizó una cámara de Neubauer. Esta consiste en un portaobjetos especial para contar células bajo el microscopio. La cuadrícula de recuento está formada por 9 cuadrados grandes, cada uno de ellos con una superficie de 1 mm². Para realizar el recuento de células se utilizan los cuatro cuadrados grandes de las esquinas, que están, a su vez, formados por 16 cuadrados medianos para facilitar el conteo. Se cuenta el número de células totales en estos 4 cuadrados y se determina la concentración de células (N) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$N \text{ (cél/ml)} = \text{N}^\circ \text{ de células contadas} \times 10^4 \times \frac{1}{4} \times (\text{dilución})^{-1}.$$

Un total de 5×10^3 células fueron sembradas en cada pocillo de una placa de 96 pocillos y fueron incubadas en RPMI suplementado con 10% SFB (v/v) por 24 h a 37°C. A cada pocillo se le agregó luego una la dilución del extracto correspondiente a una fracción y concentración determinadas. Se utilizaron diferentes concentraciones de cada extracto de: 0.1, 0.25, 0.5 y 1 mg/ml. Las células fueron incubadas en estas condiciones por 48 o 72 h a 37°C.

Para el ensayo de MTS/PMS primero se descongelaron las soluciones MTS y PMS a temperatura ambiente. En un tubo de ensayo se añadió 2 ml de solución MTS (Promega) y 100 µl de solución PMS (Sigma) y se mezcló suavemente. Luego se agregaron 20 µl del reactivo MTS/PMS a cada pocillo de la placa de 96 que contiene 100 µl de células en medio de cultivo. Se incubó la placa durante 3-5 h a 37°C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5%.

Los ensayos se realizaron por triplicado, empleando como control negativo células mantenidas con medio de cultivo sin la adición de extractos y como control positivo, células tratadas con DMSO al 10%.

Se midió la absorbancia a 490 nm mediante un espectrofotómetro para microplacas Multiskan (Thermo Scientific). Los resultados se expresaron en términos de porcentaje de inhibición de la viabilidad con respecto al control (células no tratadas).

Preparación del reactivo MTS/PMS:

MTS-(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium). Promega-PMS (5-Methylphenazinium methyl sulfate) marca: Sigma

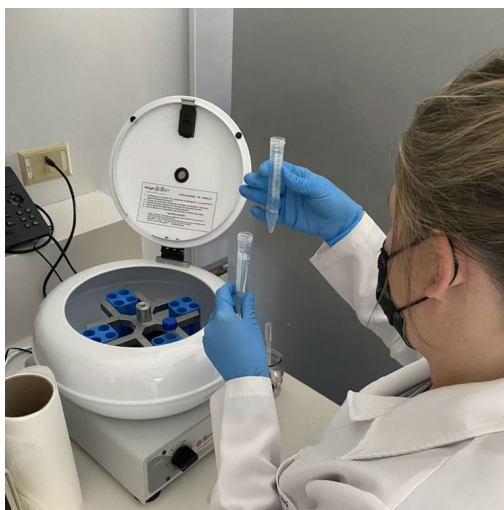


Ilustración 07. Centrifugado para eliminar los restos de medio y tripsina

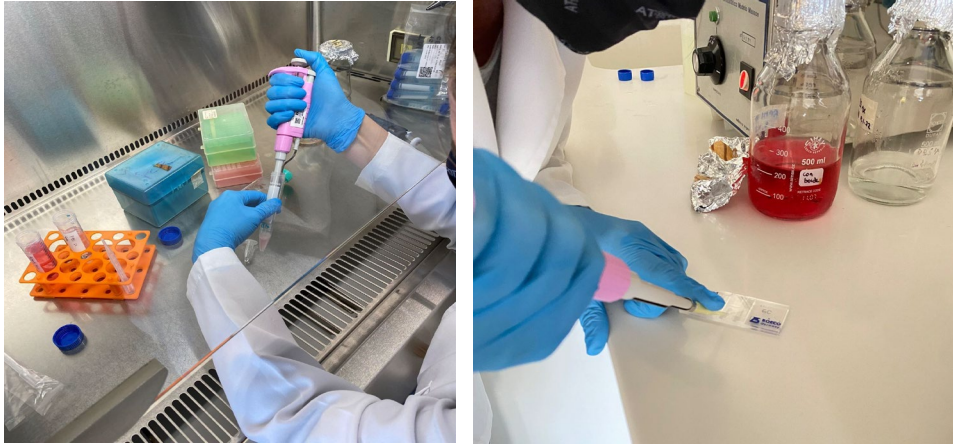


Ilustración 08. A: Dilución de la muestra. B: Cámara Neubauer para conteo de células.



Ilustración 09. Lectura de placa en espectrofotómetro.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó con el programa Graphpad Prism 8.0.1. Se realizó un ANOVA seguido de la prueba de Tukey. y se consideraron diferencias estadísticamente significativas para $p < 0,05$.

Reactivo MTS 2 mg/ml:

En un vaso de precipitado se pesó 0,4000 g $\pm$ 3% (entre 0,3880 – 0,4120 g) de MTS y se agregó 200 ml PBS 1X, medidos con probeta.

Se filtró por jeringa con filtro de 0,2 μ m estéril bajo campana de flujo laminar (seguridad biológica). Se fraccionaron 8 ml en tubos de 15 ml envueltos en papel aluminio. Se conservó a -20° C (vencimiento: 6 meses).

Reactivo PMS 0,92 mg/ml (fenazinmetosulfato):

En un vaso de precipitado se pesó 0,0230g $\pm$ 3% (entre 0,0224 – 0,0236 g) de PMS, y se agregó 25 ml de PBS 1X medidos con probeta. Se filtró por jeringa con filtro de 0,2 μ m estéril bajo campana de flujo laminar (seguridad biológica). Se fraccionó 1 ml en criotubos de 1,5 ml, envueltos en papel aluminio. Se conservó a -20° C. (vencimiento: 6 meses).

Resultados y discusión

A continuación, se presentan los resultados encontrados de acuerdo a los extractos de polisacáridos utilizados y las distintas líneas celulares tumorales empleadas. No se encontraron diferencias significativas en ninguna de las líneas tumorales analizadas con las concentraciones: 0.1 y 0.25 mg/ml. Se encontraron diferencias significativas utilizando las concentraciones 0.5 y 1 mg/ml en las distintas líneas celulares estudiadas.

Cabe destacar que en la fracción denominada como extracto agua se encuentran pectinas muy poco retenidas del extracto AIR de las paredes celulares de tallos de *Lotus tenuis* que se solubilizan con agua caliente, (el almidón presente en este extracto se eliminó utilizando una α -amilasa). El extracto denominado pectinas corresponde a la fracción obtenida luego de la extracción con CDTA en el cual se encuentran mayoritariamente pectinas que estaban unidas a las paredes celulares por medio de interacciones débiles (Vago 2019).

1.- Evaluación del efecto de los extractos obtenidos con agua y con CDTA sobre la viabilidad celular de las diferentes líneas tumorales murinas y humanas.

1.1 Efecto sobre la línea murina de cáncer de mama EO771

Se evaluó la citotoxicidad en la línea murina EO771 mediante el ensayo de MTS luego de 48 horas de exposición a los extractos Agua y CDTA en concentraciones de 0.5 y 1.0 mg/ml.

Se observó una disminución significativa de la viabilidad celular tumoral respecto al basal cuando se aplicó el tratamiento de 1 mg/ml de extracto con agua (Fig. 10), obteniendo una reducción de 24,6% en la viabilidad de las células tumorales respecto al basal. Por el contrario, no se observaron diferencias significativas al utilizar el extracto de CDTA, rico en pectinas de interacción iónica (ver figura 10 B).

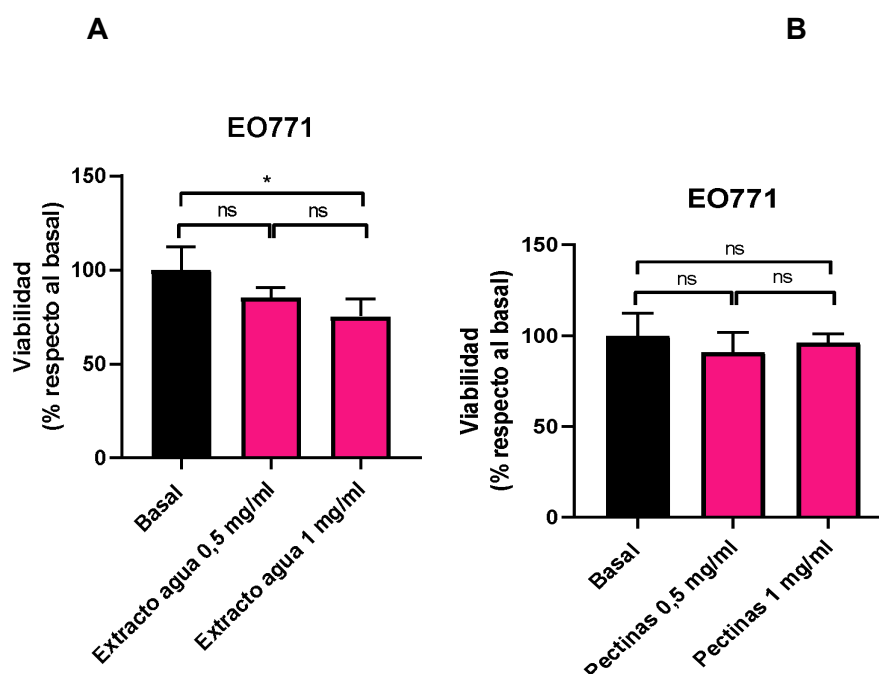


Figura 10. Efecto de la utilización de distintos tipos de pectinas extraídas de las paredes celulares de *Lotus tenuis* en la viabilidad de células tumorales de cáncer de mama murino EO771. Pectinas poco retenidas (extracto agua) (A) y pectinas retenidas con interacciones iónicas (CDTA), (B). (*) Diferencia significativa ($p < 0.5$); (ns): sin diferencia significativa.

1.2 Efecto sobre la línea humana de cáncer de mama MDA-MB-231

El cáncer de mama es uno de los tipos de cáncer más comunes que afecta a los hombres y en mayor medida a las mujeres (cerca del 30% de casos por año). Si bien gracias a campañas de prevención y detección temprana ayudan a disminuir la tasa de mortalidad, los índices son altos y los tratamientos tienen efectos secundarios adversos para el organismo y para la calidad de vida (Liu et al. 2019). Si bien, las líneas murinas, son las más utilizadas para el estudio de este tipo de cáncer por su facilidad de obtención y trabajo, no son las más representativas del tejido mamario humano (Mihevc et al 2013). Por tal motivo, se propuso analizar si los extractos obtenidos podrían tener algún efecto inhibitorio en células de cáncer de mama de origen humano. Para ello, se realizó el ensayo de MTS en la línea MDA-MB-231. Como se puede observar en la Fig. 11 A se encontraron diferencias significativas cuando se incubaron las células con 1 mg/ml de los extractos de polisacáridos obtenidos con agua (pectinas poco retenidas) durante 48 hs. Se redujo la viabilidad en un 25,7% respecto al basal. Sin embargo, no se hallaron diferencias cuando fueron tratadas las células con 0,5 mg/ml del mismo extracto.

Por otro lado, a diferencia de lo obtenido con la línea murina, se observaron diferencias significativas en los cultivos tratados por 48 hs con el extracto de CDTA, que contiene las pectinas retenidas con uniones iónicas, tanto a una concentración de 0,5 como de 1 mg/ml. La reducción de la viabilidad de las células con respecto al basal fue mayor que 19% (- 25.7% 0,5 mg/ml – 19.4% 1 mg/ml) (Figura 11 B).

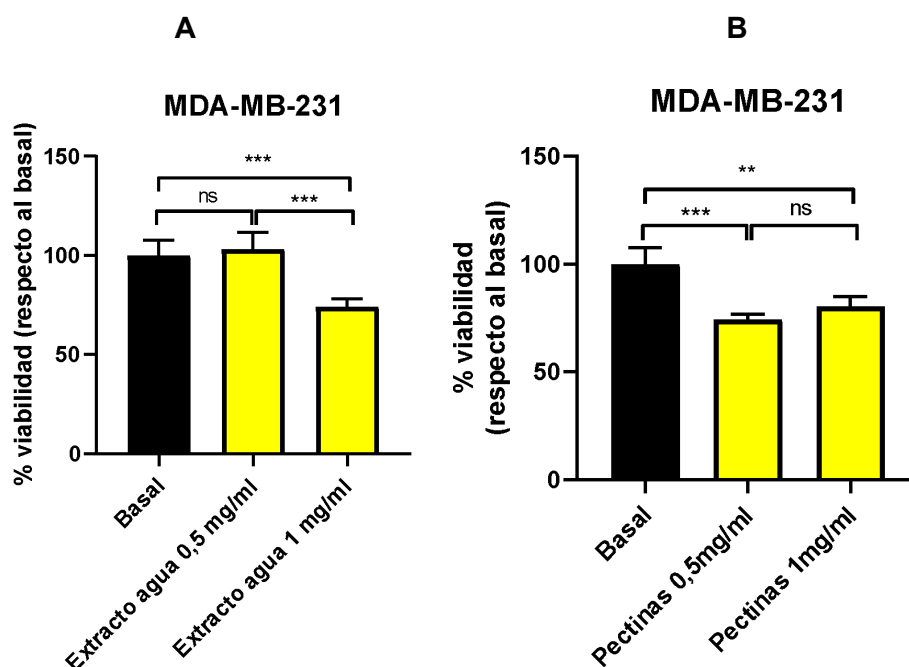


Figura 11. Efecto de distintos tipos de pectinas extraídas de las paredes celulares de *Lotus tenuis* en la viabilidad de células tumorales de cáncer de mama humano MDA-MB-231. Pectinas poco retenidas (extracto agua) (A) y pectinas retenidas con interacciones iónicas (CDTA), (B). (*) Diferencia significativa ($p < 0.5$); (ns): sin diferencia significativa.

Los resultados obtenidos concuerdan con los hallados previamente cuando utilizaron extractos de polisacáridos de *Astragalus sp.* (familia fabáceas) y extractos acuosos del hongo *Trametes robiniophila* (Huaier) en líneas de cáncer de mama humanas MCF-7 y MDA-MB-231. En estos ensayos se obtuvo una reducción significativa de la viabilidad de las células tumorales luego de 48 o más horas de administrados los extractos. Se observó que la disminución de la viabilidad dependía de la dosis y tiempo de cultivo, dado que, a 24 h de incubación y a dosis más bajas (0.25 y 0.5 mg/ml) no hubo inhibiciones significativas (Zhang et al. 2010; Liu et al. 2019).

Otros trabajos refieren diferencias significativas en líneas murinas observándose una marcada disminución de la viabilidad de las células tumorales en relación con la dosis del

polisacárido de la raíz de *Millettia pulchra* (Yulangsan) perteneciente a la familia de las fabáceas), agregado (Quin et al. 2018).

1.3 Efecto sobre la línea murina de melanoma B16F10

En base a los resultados obtenidos anteriormente, se propuso estudiar si los extractos de los polisacáridos tendrían efectos similares en otro tipo de células tumorales. Para ello, se utilizó una línea murina de melanoma, la B16F10. Melanoma, es un tipo de cáncer muy agresivo que ocurre frecuentemente en la piel y que posee un alto potencial de metástasis, por lo cual puede extenderse rápidamente a otros órganos y una muy alta resistencia a los agentes citotóxicos usados en su tratamiento. Debido a esto su tasa de mortalidad e incidencia es muy alta, siendo sus mejores antagonistas, la prevención y el control temprano que permite el tratamiento quirúrgico.

Se midió el efecto inhibitorio de la actividad metabólica por el ensayo de MTS con las mismas condiciones de tratamiento usadas anteriormente, mismas concentraciones de los extractos (0,5 y 1 mg/ml) y mismo tiempo de exposición (48 hs).

De acuerdo con los resultados encontrados, se pudo observar que el tratamiento con 1 mg/ml del extracto agua (pectinas más solubles) produjo una reducción de la viabilidad celular en un 19% con respecto al basal. Mientras que, utilizando 0,5 mg/ml no se observaron diferencias significativas (ver figura 12 A).

Con el agregado del extracto de pectinas de interacción iónica (CDTA) no se observaron diferencias significativas utilizando una concentración de 1 mg/ml, pero se observó una disminución significativa del 32,8% con respecto a la basal cuando se utilizó una concentración de 0,5 mg/ml (ver figura 12 B). Assef et al. no hallaron diferencias en los ensayos *in vitro* cuando trataron las células B16F10 con polisacáridos extraídos de algas pardas *Dictyota caribaea*, pero sí encontraron respuesta en los modelos *in vivo* (Assef et al. 2021).

A

B

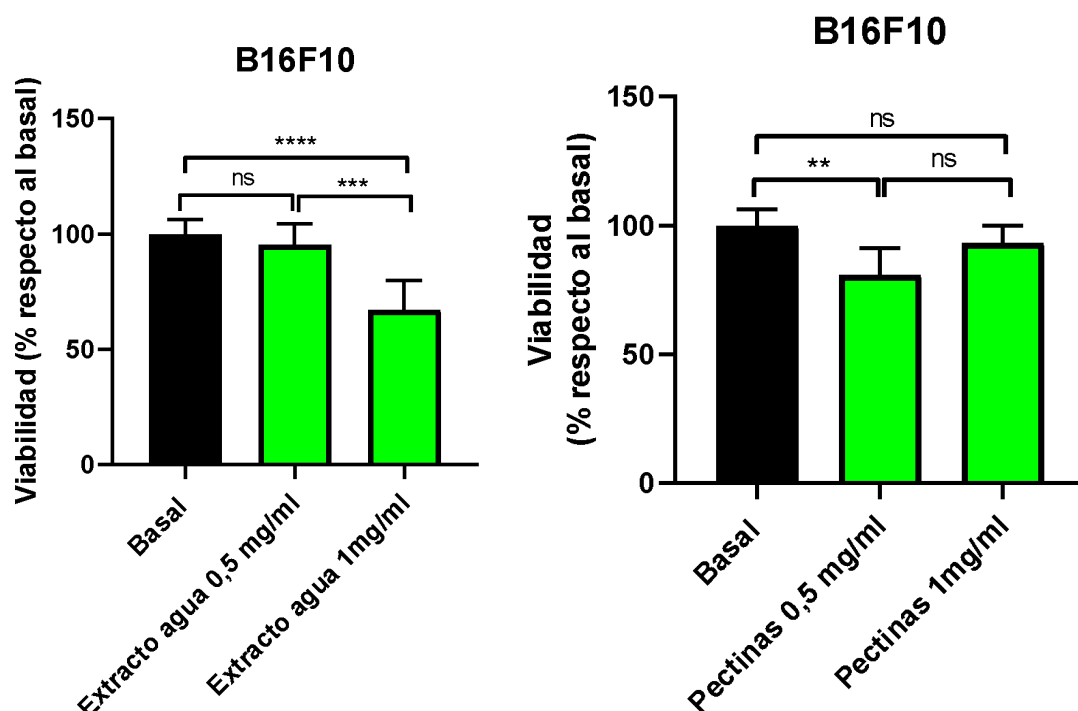


Figura 12. Efecto de la utilización de distintos tipos de pectinas extraídas de las paredes celulares de *Lotus tenuis* en la viabilidad de células tumorales de cáncer de piel murino B16F10. Pectinas poco retenidas (extracto agua) (A) y pectinas retenidas con interacciones iónicas (CDTA), (B). (*) Diferencia significativa ($p < 0.5$); (ns): sin diferencia significativa.

Resultados similares se han obtenido en líneas celulares de melanoma que fueron tratadas con polisacáridos obtenidos del fruto de la planta *Zizyphus jujuba* (familia *Rhamnaceae*), donde el tratamiento durante 24hs con concentraciones de 4 mg/ml de dichos polisacáridos mostraron un efecto antiproliferativo. Este efecto se vio relacionado con un arresto del ciclo celular en la fase G2/M y un aumento de la apoptosis celular (Hung et al. 2012).

1.4 Efecto sobre la línea humana de cáncer de colon CACO-2

En base a resultados previos de nuestro grupo de investigación, que aún no han sido publicados, y con la posibilidad de poder suministrar los extractos de los polisacáridos junto con el alimento, se decidió analizar la respuesta en alguna línea tumoral del tracto gastrointestinal. Para ello, se consiguió una línea de adenocarcinoma colorrectal humano denominada CACO-2. El cáncer de colon es un tipo de cáncer que afecta tanto a hombres como a mujeres, sobre el cual se están realizando muchas campañas de divulgación, como en el caso de cáncer de mama, que buscan promover la detección temprana para reducir su incidencia.

Se trabajó con pectinas del extracto obtenido con agua, que son las más fácilmente solubles, en las mismas concentraciones utilizadas en los ensayos anteriores para observar el efecto sobre la viabilidad de células tumorales humanas de cáncer de colon (adenocarcinoma).

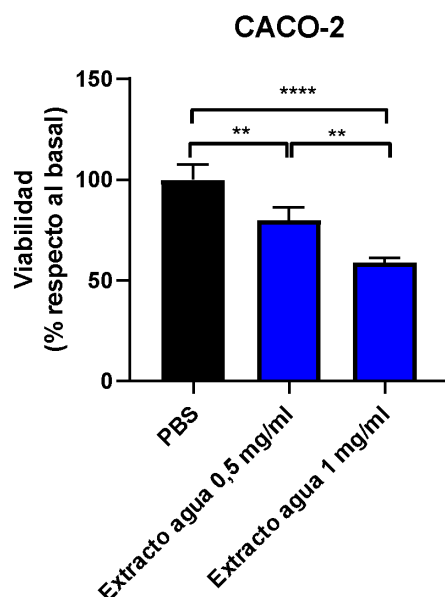


Figura 13. Efecto de la utilización de distintos tipos de pectinas extraídas de las paredes celulares de *Lotus tenuis* en la viabilidad de células tumorales de cáncer de colon humano Caco-2. Pectinas poco retenidas (extracto agua) (*) Diferencia significativa ($p < 0.5$); (ns): sin diferencia significativa.

De acuerdo con los resultados, se observaron diferencias significativas para las dos concentraciones utilizadas, encontrando una reducción de la viabilidad de las células tumorales del 9.54% utilizando una concentración de 0,5 mg/ml y una reducción del 41,06% utilizando 1 mg/ml de extracto agua con respecto a la basal mostrando una marcada relación entre la respuesta y la dosis de polisacárido utilizado (ver Figura 13). La utilización de alimentos ricos en fibra y particularmente, determinados polisacáridos podría ser una alternativa de fácil implementación por su consumo en forma oral, para disminuir la incidencia o la proliferación de esta enfermedad. En este sentido, Kravchenko et al. utilizaron polisacáridos de algas rojas (*A. flabelliformis* and *M. pacificus*) sobre líneas celulares de cáncer colorrectal HT-29, DLD-1, HCT-116, obteniendo resultados promisorios. En este trabajo no encontraron una disminución en la proliferación de las células tumorales a las 24 hs de ensayo, pero sí a las 72 hs con una concentración de 1 mg/ml, reduciendo la viabilidad celular entre 20 y 49,8% (Kravchenko et al. 2023). La línea HCT-116 de cáncer de colon mostró mayor sensibilidad al tratamiento con los extractos y en ella se evaluó también la respuesta positiva del agregado de los extractos utilizados en el proceso de migración celular

(importante en la metástasis del cáncer) encontrando reducciones en relación con la dosis utilizada y el tiempo de incubación, y mayor efecto antiproliferativo relacionado con un arresto del ciclo celular en la fase SubG0 y un aumento de la apoptosis celular (Kravchenko et al. 2023).

Conclusión

De acuerdo con los resultados obtenidos para estas líneas celulares y en las condiciones utilizadas, podemos concluir que los polisacáridos de los extractos acuosos y de CDTA, ricos en pectinas, obtenidos de las paredes celulares de la especie forrajera *Lotus tenuis* presentaron una promisorio actividad antitumoral. Esta actividad antitumoral resultó

dependiente de la concentración empleada encontrando mejores respuestas al utilizar una concentración de 1mg/ml de extracto. Las respuestas antitumorales fueron superiores en las líneas tumorales humanas utilizando el extracto acuoso, presentándose una reducción en la viabilidad tumoral del: 41,1% para la línea celular de cáncer de colon humano Caco-2, de un 25,7% para la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231, de un 24,6% para la línea celular de cáncer de mama murino EO 771 y de un 19,0% para la línea celular de melanoma murino B16 F10. Al utilizar el extracto de CDTA, si bien los resultados fueron también prometedores, la reducción en la viabilidad tumoral fue menor obteniendo las mejores respuestas en la línea celular B16 F10. En virtud de las observaciones realizadas, se debería profundizar en la investigación de los mecanismos involucrados con el accionar antitumoral de estos extractos de *Lotus tenuis*, ya que podrían ser utilizados como una herramienta natural, sin efectos adversos para ayudar en el tratamiento de distintos tipos de cáncer.

Bibliografía

Albersheim, P., Darvill, A., Roberts, K., Sederoff, R., & Staehelin, A. (2010). *Plant cell walls*. Garland Science.

Alkahtani, J., Elshikh, M. S., Almaary, K. S., Ali, S., Imtiyaz, Z., & Ahmad, S. B. (2020). Anti-bacterial, anti-scavenging and cytotoxic activity of garden cress polysaccharides. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(11), 2929-2935.

Aman, P., 1993. Composition and structure of cell wall polysaccharides in forages. *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*, pp.183–199.

Aman, P. and Graham, H. 1990. Chemical evaluation of polysaccharides in animal feeds. p. 161-177. In J. Wiseman and D. J. Cole (ed.) *Feedstuff evaluation*. Butterwoths, London.

Ausubel, F. M. (2005). Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved?. *Nature immunology*, 6(10), 973-979.

Assef, A. N. B., da Costa, B. B., Moreira, T. A., do Carmo, L. D., de Souza, T. D. F. G., Alencar, N. M. N., ... & Wilke, D. V. (2021). Antitumor and immunostimulating sulfated polysaccharides from brown algae *Dictyota caribaea*. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 2, 100142.

Bao, X., Yuan, H., Wang, C., Liu, J., & Lan, M. (2013). Antitumor and immunomodulatory activities of a polysaccharide from *Artemisia argyi*. *Carbohydrate Polymers*, 98, 1236–1243.

Barsanti, L., & Gualtieri, P. (2019). Paramylon, a potent immunomodulator from WZSL mutant of *Euglena gracilis*. *Molecules*, 24(17), 3114.

Buxton, D.R., Casler, M.D. Environmental and genetic effects on cell wall composition and digestibility, P. 685-714 In: *Forage cell wall Structure and digestibility*. 1993 ASA-CSSA-SSSA, 677 Madison, WI 53711, USA}

Brett, C. and Waldron, K. (1990). *Physiology and biochemistry of plant cell walls*. Unwin Hyman.

Caliceti, P., Salmaso, S., & Bersani, S. (2010). Polysaccharide-based anticancer prodrugs. *Macromolecular anticancer therapeutics*, 163-219

Chandra, R. & Rustgi, R. 1998. et al. 2011. Biodegradable polymers. *Progress in polymer science*, 23(7), 1273-1335.

Dangl, J. L., & Jones, J. D. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *nature*, 411(6839), 826-833.

Di, T., Chen, G., Sun, Y., Ou, S., Zeng, X., & Ye, H. (2017). Antioxidant and immunostimulating activities in vitro of sulfated polysaccharides isolated from *Gracilaria rubra*. *Journal of Functional Foods*, 28, 64-75.

Fang, Q., Wang, J. F., Zha, X. Q., Cui, S. H., Cao, L., & Luo, J. P. (2015). Immunomodulatory activity on macrophage of a purified polysaccharide extracted from *Laminaria japonica*. *Carbohydrate Polymers*, 134, 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.070>

Fry, S. C. (1988). The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis. Longman Group Limited.

Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F (2020). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <https://gco.iarc.fr/today>, accessed [10/05/2023].

Fry S.C. (1988) The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis. In: Longman Scientific & Technical H (ed) Harlow, Essex, England, pp 102–187.

García, I., Mendoza, R., & Pomar, M. C. (2008). Deficit and excess of soil water impact on plant growth of *Lotus tenuis* by affecting nutrient uptake and arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant and soil*, 304, 117-131.

Graham, H., Aman, P. and Petterson D. (1990). Chemical analysis and nutritional aspects of dietary fibres. *Comp. Physiol.* 5:242-253.

Hung, C. F., Hsu, B. Y., Chang, S. C., & Chen, B. H. (2012). Antiproliferation of melanoma cells by polysaccharide isolated from *Zizyphus jujuba*. *Nutrition*, 28(1), 98-105.

Jiao, L., Li, X., Li, T., Jiang, P., Zhang, L., Wu, M., & Zhang, L. (2009). Characterization and anti-tumor activity of alkali-extracted polysaccharide from *Enteromorpha intestinalis*. *International immunopharmacology*, 9(3), 324-329.

Jung, H.G. (2012). Forage Digestibility: The intersection of cell Wall lignification and Plant Tissue Anatomy. Dept. of Agronomy and Plant Genetics, Dept. of Animal Science, University of Minnesota.

Jones, J.D.G. and Dangl, J.L. The plant immune system Vol 444/16 November 2006/dol:10.1038/nature05286 Nature Publishing Group

Ju, H., Yu, C., Zhang, X. D., Liu, W., Wu, Y. C., Gong, P. X., ... & Li, H. J. (2023). Recent trends in anti-cancer activities of terrestrial plants-based polysaccharides: A review. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 100341.

Kravchenko, A. O., Menchinskaya, E. S., Isakov, V. V., Glazunov, V. P., & Yermak, I. M. (2023). Carrageenans and Their Oligosaccharides from Red Seaweeds *Ahnfeltiopsis flabelliformis* and *Mastocarpus pacificus* (Phyllophoraceae) and Their Antiproliferative Activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(8), 7657.

Liu, C., Li, H., Wang, K., Zhuang, J., Chu, F., Gao, C., ... & Sun, C. (2019). Identifying the antiproliferative effect of *Astragalus* polysaccharides on breast cancer: coupling network pharmacology with targetable screening from the cancer genome atlas. *Frontiers in oncology*, 9, 368.

Maguire, V., Campestre, M. P., Antonelli, C., & Ruiz, O. A. (2020). El mejoramiento de especies forrajeras del género *Lotus* spp y su importancia económica y ambiental en los pastizales de la pampa deprimida del salado.

McNeill, M., Darvill, A.G., Fry, S. C. and **Albersheim**, P. (1984). Structure and function of the primary cell walls of plants. *Ann. Rev. Biochem.* 53, 625-663.

McDonald, P. (2002). *Animal nutrition*. Pearson Education India.

Meyers, M. A., Chen, P. Y., Lin, A. Y. M., & Seki, Y. (2008). Biological materials: Structure and mechanical properties. *Progress in materials science*, 53(1), 1-206.

Miñón D., Sevilla. G., Montes L., Fernandez O. (Mayo 1990). *Lotus tenuis* leguminosa forrajera para la pampa deprimida. Boletín técnico 98, ISSN 0522 - 0548.

Mihevč, S. P., & Peter, D. O. V. Č. (2013). Mammary tumors in ruminants. *Acta Agriculturae Slovenica*, 102(2), 83-86.

Miñón D. P., Sevilla G. H., Montes L. and Fernandez O. 1990. *Lotus tenuis*: leguminosa forrajera para la Pampa Deprimida. [*Lotus tenuis*: a forage legume for the Flooding Pampas]

CERBAS INTA. Unidad Integrada Balcarce. Facultad de Ciencias Agrarias – Estación Experimental Agropecuaria. *Boletín Técnico*, No 98. 16 p.

Nauts, H. C., Swift, W. E., & Coley, B. L. (1946). The treatment of malignant tumors by bacterial toxins as developed by the late William B. Coley, MD, reviewed in the light of modern research. *Cancer research*, 6(4), 205-216.

O'NEILL, M. A. L. C. O. L. M., Albersheim, P., & Darvill, A. (1990). The pectic polysaccharides of primary cell walls. In *Methods in plant biochemistry* (Vol. 2, pp. 415-441). Academic Press.

Qin, N., Lu, S., Chen, N., Chen, C., Xie, Q., Wei, X., ... & Huang, R. (2019). Yulangsang polysaccharide inhibits 4T1 breast cancer cell proliferation and induces apoptosis in vitro and in vivo. *International journal of biological macromolecules*, 121, 971-980.

Russo, R., Barsanti, L., Evangelista, V., Frassanito, A. M., Longo, V., Pucci, L., ... & Gualtieri, P. (2017). *Euglena gracilis* paramylon activates human lymphocytes by upregulating pro-inflammatory factors. *Food Science & Nutrition*, 5(2), 205-214.

Schepetkin, I. A., & Quinn, M. T. (2006). Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. In *International Immunopharmacology* (Vol. 6, Issue 3, pp. 317–333).

Somerville, C., Bauer, S., Brininstool, G., Facette, M. (2004). Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science* Vol 306: 2206-2271

Sterle, H.A., et al., The thyroid status reprograms T cell lymphoma growth and modulates immune cell frequencies. *J Mol Med (Berl)*, 2016. 94(4): p. 417-29).

Sterle, H. A., Nicoud, M. B., Massari, N. A., Taquez Delgado, M. A., Herrero Ducloux, M. V., Cremaschi, G. A., & Medina, V. A. (2019). Immunomodulatory role of histamine H4 receptor in breast cancer. *British journal of cancer*, 120(1), 128-138.

Sterle HA, Hildebrandt X, Valenzuela Álvarez M, Paulazo MA, Gutierrez LM, Klecha AJ, Cayrol F, Díaz Flaqué MC, Rosembliit C, Barreiro Arcos ML, Colombo L, Bolontrade MF, Medina VA, Cremaschi GA. (2021) Thyroid status regulates the tumor microenvironment delineating breast cancer fate. *Endocr Relat Cancer*. 28(7):403-418

Tzianabos AO. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biological function. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:523 – 33.

Van Soest, P. J. (1994). Nutritional ecology of the ruminant. Cornell university press.

Vago, M. E. (2019). *Influencia del estrés abiótico y biótico sobre la composición de la pared celular de Lotus tenuis* (Doctoral dissertation, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Agronomía. Escuela para Graduados).

www.cdc.gov/Efectos secundarios del tratamiento contra el cáncer. Mayo 2023

www.cancer.gov/types/colorectal. National Cancer Institute. 2022

www.cancer.org/cancer/breast-cancer.html, American Cancer Society. 2022

www.skincancer.org/skin-cancer-information/melanoma/. Skin Cancer Foundation. 2022

World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. (2018). Continuous update project expert report 2018. *Diet, Nutrition, Physical Activity and Colorectal Cancer*.

Yu, Y., Shen, M., Song, Q., & Xie, J. (2018). Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: A review. *Carbohydrate polymers*, 183, 91-101.

Yu, R., Yin, Y., Yang, W., Ma, W., Yang, L., Chen, X., ... & Song, L. (2009). Structural elucidation and biological activity of a novel polysaccharide by alkaline extraction from cultured *Cordyceps militaris*. *Carbohydrate polymers*, 75(1), 166-171.

Zhang, N., Kong, X., Yan, S., Yuan, C., & Yang, Q. (2010). Huaier aqueous extract inhibits proliferation of breast cancer cells by inducing apoptosis. *Cancer science*, 101(11), 2375-2383.

Zong, A., Cao, H., & Wang, F. (2012). Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. In *Carbohydrate Polymers* (Vol. 90, Issue 4, pp. 1395–1410). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.07.02>

Anexo

Valores de absorbancia y cálculo del porcentaje respecto al basal.

E0771					
Absorbancia 490 nm	Basal	Agua 0,5 mg	Agua 1 mg	Pectinas 0,5mg	Pectinas 1 mg
	0,539	0,54	0,461	0,608	0,615
	0,695	0,632	0,587	0,7	0,64
	0,721	0,601	0,569	0,648	0,698
	0,713	0,556	0,446	0,505	0,678
	0,758	0,592	0,519	0,654	0,665
Promedio	0,6852	0,5842	0,5164	0,623	0,6592

E0771					
% del basal	Basal	Agua 0,5 mg	Agua 1 mg	Pectinas 0,5 mg	Pectinas 1 mg
	78,66316404	78,80910683	67,27962639	88,73321658	89,75481611
	101,4302393	92,23584355	85,66841798	102,1599533	93,40338587
	105,2247519	87,71161705	83,04144775	94,5709282	101,8680677
	104,0572096	81,14419148	65,09048453	73,70110917	98,94921191
	110,6246351	86,39813193	75,74430823	95,44658494	97,05195563
Promedio	100	85,25977817	75,36485698	90,92235844	96,20548745

B16F10					
Absorbancia 490 nm	Basal	Agua 0,5 mg	Agua 1 mg	Pectinas 0,5 mg	Pectinas 1 mg
	1,211	1,193	1,119	0,697	1,136
	1,136	0,987	0,809	1,052	1,299
	1,283	1,109	1,026	0,734	1,087
	1,157	1,061	0,909	0,771	1,033
	1,089	1,135	0,894	0,697	1,052
Promedio	1,1752	1,097	0,9514	0,7902	1,1214

B16F10					
% del basal	Basal	Agua 0,5 mg	Agua 1 mg	Pectinas 0,5 mg	Pectinas 1 mg
	103,04629	101,5146358	95,21783526	59,30905378	96,66439755
	96,66439755	83,98570456	68,83934649	89,51667801	110,5343771
	109,1729067	94,36691627	87,30428863	62,45745405	92,49489449
	98,45132743	90,28250511	77,34853642	65,60585432	87,89993193
	92,66507828	96,57930565	76,07215793	59,30905378	89,51667801
Promedio	100	93,34581348	80,95643295	67,23961879	95,42205582

Caco2			
Absorbancia 490 nm	Basal	Agua 0,5 mg	Agua 1 mg
	0,775		0,459
	0,758	0,58	0,485
	0,744	0,688	0,465
	0,879	0,971	0,48
		0,616	0,436
Promedio	0,789	0,71375	0,465

Caco2			
% del basal	Basal	Agua 0,5 mg	Agua 1 mg
	98,22560203		58,17490494
	96,07097592	73,51077313	61,47021546
	94,29657795	87,19898606	58,93536122
	111,4068441	123,0671736	60,8365019
		78,07351077	55,25982256
Promedio	100	90,4626109	58,93536122

MDA-MB-231					
% del basal	Basal	Agua 0,5 mg	Agua 1 mg	Pectinas 0,5 mg	Pectinas 1 mg
	104,4319918	96,79062659	71,82883342	77,1777891	77,68721345
	97,80947529	99,84717269	79,2154865	73,35710647	78,1966378
	104,4319918	112,8374936	75,64951605	72,33825777	79,72491085
	105,7055527		70,55527254		86,85685176
	87,62098828				
Promedio	100	103,158431	74,31227713	74,29105111	80,61640346

MDA-MB-231					
Absorbancia 490 nm	Basal	Agua 0,5 mg	Agua ;1 mg	Pectinas 0,5 mg	Pectinas 1 mg
	0,410	0,380	0,282	0,303	0,305
	0,384	0,392	0,311	0,288	0,307
	0,410	0,443	0,297	0,284	0,313
	0,415		0,277		0,341
	0,344				
Promedio	0,393	0,405	0,292	0,292	0,317