

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia



“Estudio de las propiedades antitumorales de la especie nativa *Neltuma caldenia* (caldén) sobre líneas celulares de carcinoma mamario triple negativo”

Estudiante Ana Paula Pedersoli

Directora Dra. María Julia Ferronato

LABORATORIO DE BIOLOGÍA DEL CÁNCER - INIBIBB - CONICET- UNS

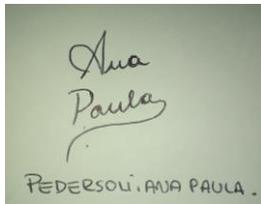
Mayo 2024

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia

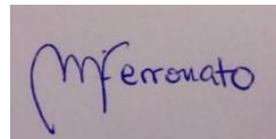
Tesis de grado para optar al título de Licenciada en Ciencias Biológicas

“Estudio de las propiedades antitumorales de la especie nativa *Neltuma caldenia* (caldén) sobre líneas celulares de carcinoma mamario triple negativo”



Handwritten signature of Ana Paula Pedersoli in black ink on a light green background. Below the signature, the name 'PEDERSOLI, ANA PAULA.' is printed in a small, black, sans-serif font.

.....
Ana Paula Pedersoli
Estudiante



Handwritten signature of Dra. M. Julia Ferronato in blue ink on a light purple background.

.....
Dra. M. Julia Ferronato
Directora

Mayo 2024

DEDICATORIA

Al héroe de todos mis cuentos, mi papá.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi directora de tesis, la Doctora María Julia Ferronato por su compromiso, dedicación y su paciencia para enseñarme todo lo necesario para la realización de esta tesis. También a todo el grupo del Laboratorio de Biología del Cáncer por abrirme las puertas y permitirme incursionar en la investigación, acompañándome en el proceso.

Al Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB-CONICET-UNS), por permitirme desarrollar el trabajo en sus instalaciones.

A mi profesora consejera Nora Sidorkewicj por haber estado presente para mí todo este tiempo y darme el consejo indicado en los momentos decisivos.

Por otro lado, quiero agradecer a mi familia. En especial a mi mamá, por su amor infinito y desinteresado, por la paciencia y el sacrificio que hizo para que hoy yo pueda estar donde estoy.

A mi hermana, por su compañía y su amor incondicional, por su aliento y por creer en mí siempre, incluso cuando yo no lo hacía. A mi abuela, por su inquebrantable apoyo todos estos años. A las tres, gracias por acompañarme en este camino y ser mi fuente constante de inspiración. Este logro es tanto mío como de ustedes. ¡Las amo!

A Fran, por ser un compañero increíble. Por estar siempre a mi lado, celebrando mis triunfos, y apoyándome en los momentos difíciles.

A los amigos que conocí gracias a la carrera, y que me acompañaron todos estos años, hicieron que mi paso por la universidad sea una experiencia hermosa. Especialmente a Uri y a Brune, que desde el primer día estuvieron para mí en cada momento. Y a Naza, Michi y Mica que fueron un gran apoyo este último tiempo.

A mis amigos de la vida, gracias por el apoyo, por el amor y por entender mis ausencias mientras estudiaba. Gracias por festejar cada uno de mis logros, como si hubiesen sido propios.

A mi pequeña Eva, por alegrarme todas las tardes de estudio. Y a Ziro, que, sin saberlo, fue lo más importante de todo este viaje.

ÍNDICE

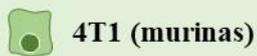
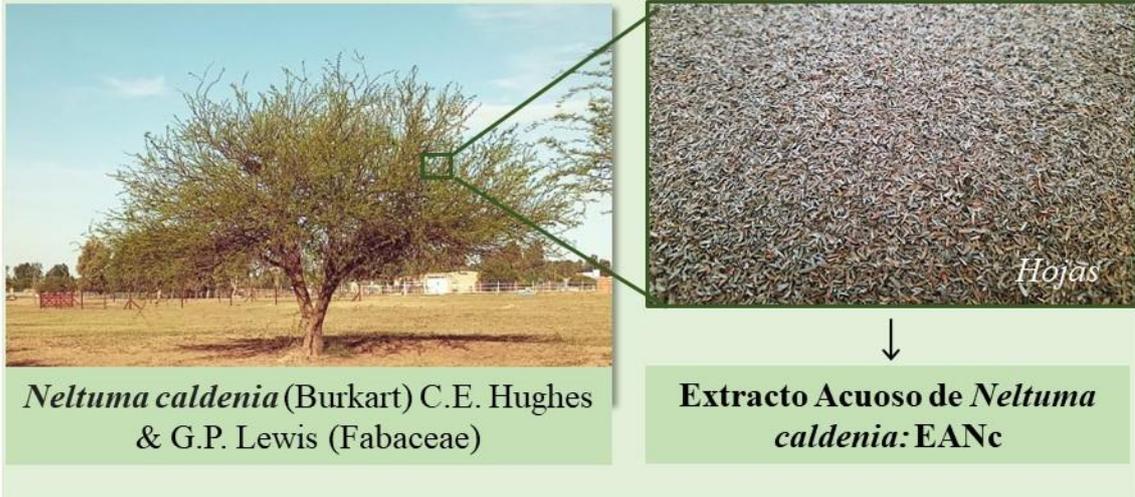
RESUMEN	6
ABREVIATURAS.....	8
INTRODUCCIÓN	9
HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	14
MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
➤ Material vegetal y obtención del extracto acuoso.....	15
➤ Ensayos de viabilidad celular.....	16
➤ Análisis del ciclo celular por citometría de flujo.....	17
➤ Detección de apoptosis celular.....	18
➤ Ensayos de migración celular.....	18
➤ Análisis estadísticos	19
RESULTADOS	20
➤ Efectos del EANc sobre la viabilidad de líneas celulares de CMTN y no-malignas de epitelio glandular mamario.....	20
➤ Evaluación del mecanismo celular implicado en los efectos antitumorales del EANc: análisis del ciclo celular y de la apoptosis mediante citometría de flujo.....	27
➤ Efectos del EANc sobre la migración de líneas celulares de CMTN y no-malignas de epitelio glandular mamario.....	30
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	33
BIBLIOGRAFÍA	38

RESUMEN

El cáncer de mama es la neoplasia maligna de mayor incidencia y mortalidad en las mujeres tanto a nivel mundial como en nuestro país. Los carcinomas mamarios triples negativos (CMTN) se caracterizan por ser tumores agresivos, con una mayor tasa de proliferación, de recurrencia local y de desarrollo de metástasis que los otros subtipos de CM. Actualmente, su tratamiento se basa en quimioterapia citotóxica con esquemas de medicamentos sintéticos combinados. Sin embargo, la efectividad muchas veces se ve comprometida por el desarrollo de quimiorresistencia, la aparición de metástasis y/o efectos secundarios graves que reducen la calidad de vida de las pacientes. En este contexto, existe una clara necesidad de contar con nuevas estrategias terapéuticas para el CMTN, que presenten una potente actividad antitumoral y una baja toxicidad. En los últimos años ha tomado relevancia el estudio científico de las plantas con fines medicinales, es decir, la fitomedicina. Dentro de esta disciplina, se han estudiado diferentes especies del mundo pertenecientes al género *Neltuma* (*ex-Prosopis*), desde el punto de vista biomédico y toxicológico. Sin embargo, a la fecha, no existen antecedentes científicos del potencial antitumoral de la especie nativa argentina, *N. caldenia*, comúnmente conocida como “caldén”. El objetivo general de este trabajo de tesis de grado es investigar mediante ensayos preclínicos el potencial antitumoral de un Extracto Acuoso (EA) obtenido a partir de hojas de *N. caldenia* (Nc) en células de CMTN. Para ello, evaluamos los efectos del EANc sobre la viabilidad y migración de las líneas celulares de CMTN 4T1 murina y MDA-MB-231 humana. También, contrastamos los efectos del EANc con los obtenidos en células de epitelio glandular mamario no-malignas HC11 murinas. Los resultados indican que el EANc presenta actividad antitumoral al reducir la viabilidad de ambas líneas celulares de CMTN. En cuanto a su mecanismo de acción celular, demostramos que el EANc presenta efectos anti-proliferativos y pro-apoptóticos. Además, el EANc es efectivo para reducir la capacidad migratoria de las células tumorales. Finalmente, concluimos que el EANc posee un accionar diferencial entre células no-malignas y tumorales dado que su efecto sobre la viabilidad de la línea celular HC11 fue menor con respecto al detectado en las células 4T1, así como tampoco afectó la migración celular al ser empleado a la misma concentración que en las células tumorales. En conclusión, los resultados obtenidos del desarrollo de esta tesis de grado aportan evidencia, por primera vez, del potencial antitumoral de la especie arbórea *N. caldenia* para el tratamiento del CMTN.

RESUMEN GRÁFICO

Evaluación del potencial antitumoral de *Neltuma caldenia* sobre células de CMTN



4T1 (murinas)



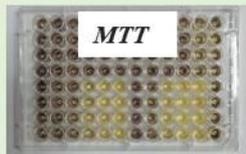
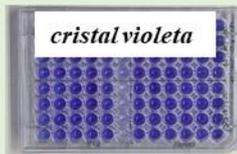
MDA-MB-231 (humanas)



HC11 (murinas)

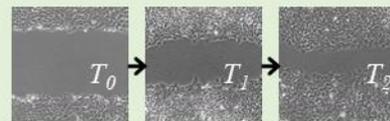
♦ Efectos sobre la viabilidad celular

Ensayos colorimétricos



♦ Efectos sobre la migración celular

Ensayos de "cierre de la herida"



♦ Efectos sobre el ciclo celular y la apoptosis

EANc:



❖ Efectos anti-proliferativos y pro-apoptóticos.

❖ Efectos anti-migratorios.



❖ Efecto menor sobre la viabilidad celular que en las células tumorales.

❖ Ausencia de efectos sobre la migración celular.

ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de la varianza
AV	<i>Annexin V</i> o Anexina V
CM	Cáncer de Mama
CMTN	Carcinoma Mamario Triple Negativo
CO ₂	Dióxido de carbono
CV	Cristal Violeta
DMEM F12	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EANc	Extracto Acuoso de <i>Neltuma caldenia</i>
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorter analysis</i>
h	horas
HCl	Ácido Clorhídrico.
HER2	<i>Human Epidemial Growth Factor Receptor-2</i> o Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2
IARC	<i>Internacional Agency for Research on Cancer</i>
IP	Ioduro de Propidio
min.	minutos
MTT	bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium
<i>p</i>	Probabilidad
PBS	Buffer fosfato salino
RE	Receptor de Estrógeno
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAasa	Ribonucleasa
RP	Receptor de Progesterona
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
SFB	Suero fetal bovino.
vs.	versus

INTRODUCCIÓN

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, del inglés *International Agency for Research on Cancer*) en su proyecto GLOBOCAN 2022 (IARC, GLOBOCAN 2022) estima que **Argentina se encuentra dentro del rango de países con una incidencia de cáncer media - alta** (187,5 - 258,5 x 100.000 habitantes; **Figura 1A**). Con la misma tendencia que a nivel mundial, el tipo de cáncer que presenta mayor incidencia en la población femenina de nuestro país (alejándose notablemente del resto) es el cáncer de mama (CM) (**Figura 1B**); siendo también el principal responsable de muerte por cáncer entre las mujeres argentinas (**Figura 1C**).

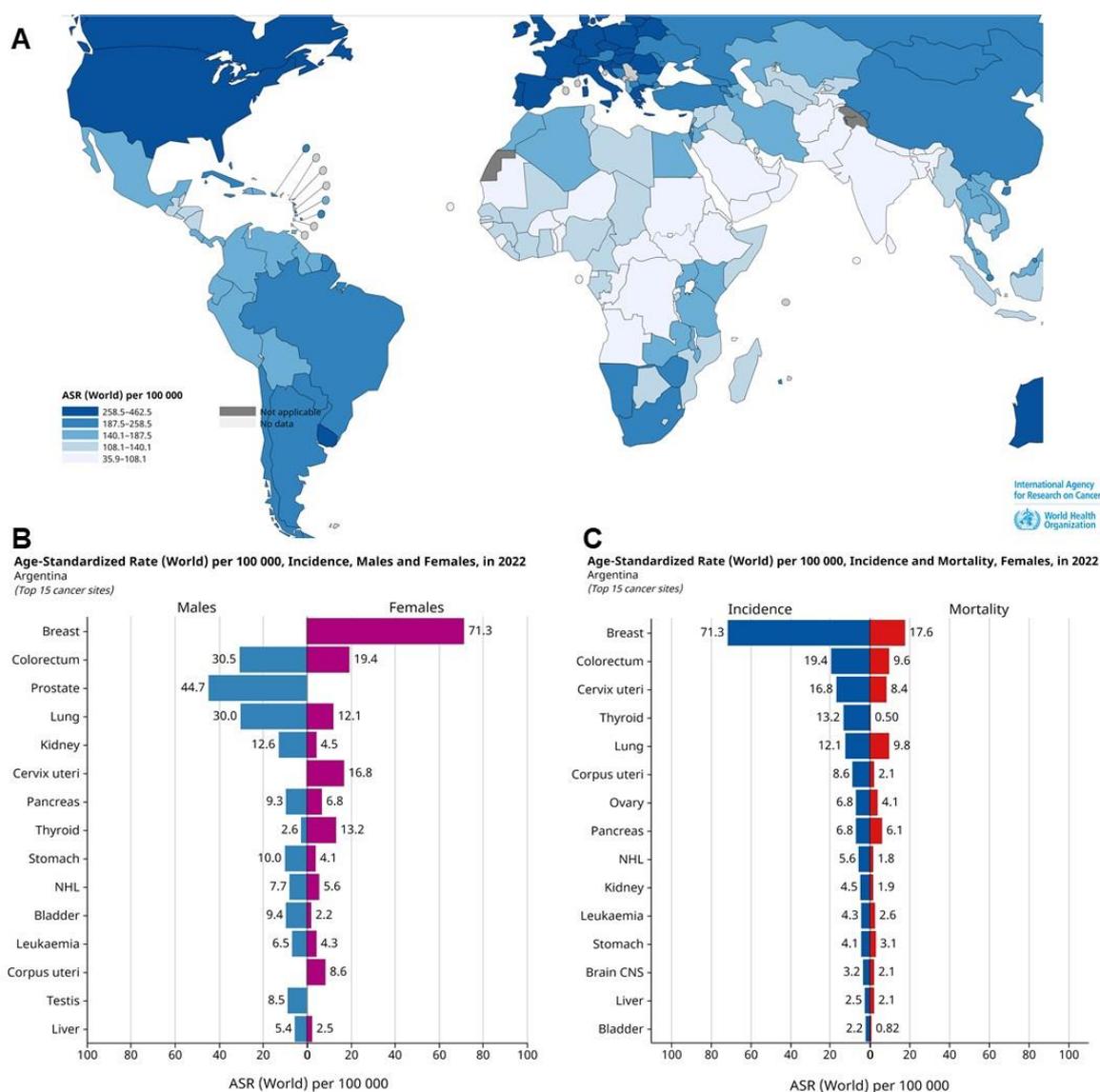


Figura 1. Tasas estandarizadas de A) incidencia a nivel mundial, para todos los tipos de cáncer, ambos sexos; B) incidencia en Argentina, ambos sexos y C) incidencia y mortalidad en Argentina, en mujeres, en el año 2022. Tomado de IARC, <https://gco.iarc.who.int/today/en>.

El CM es una enfermedad representada por un grupo heterogéneo de tumores con características morfológicas y biológicas variables y, por lo tanto, con diferente comportamiento clínico y respuesta al tratamiento. Actualmente, la toma de decisiones clínicas se basa en la clasificación histológica, la estadificación TNM y el inmunofenotipo del tumor mediante la evaluación de la expresión del receptor de estrógeno (RE), de progesterona (RP) y del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2, del inglés *Human Epidemial Growth Factor Receptor-2*). **El cáncer de mama triple negativo (CMTN)** es un subtipo de CM que incluye a todos los tumores que carecen de la expresión de RE, RP y de la sobre-expresión de HER2. Este subtipo tumoral corresponde aproximadamente al 10 - 20 % de los CM, está asociado con un pronóstico malo, presenta una tasa alta de recurrencia local y de metástasis y una mortalidad elevada en comparación con los otros subtipos de CM (Chun et al. 2017; Abu Samaan et al. 2019; Ocaña et al. 2020). Actualmente estos tumores son tratados con quimioterapia citotóxica como taxanos, en monoterapia o en combinación con antraciclinas o compuestos derivados del platino (Chun et al. 2017; Yao et al. 2017). A pesar de la disponibilidad de estos tratamientos, la quimioterapia presenta efectos secundarios adversos reduciendo la calidad de vida de las pacientes y, en muchos casos, su efectividad se ve comprometida por la aparición de focos metastásicos o de mecanismos de resistencia al quimioterápico empleado (Chun et al. 2017; Abu Samaan et al. 2019; Ocaña et al. 2020). Frente a ello, surge la necesidad de contar con nuevas estrategias terapéuticas que presenten una potente actividad antitumoral, baja toxicidad y sean incluso capaces de actuar como complemento de la terapia convencional, disminuyendo sus reacciones adversas y mejorando la calidad de vida de las pacientes.

En la actualidad, existe un interés creciente por **mejorar las terapias convencionales con alternativas terapéuticas naturales**, como a través del empleo de extractos o fracciones obtenidas a partir de plantas (Keene et al. 2019, Wode et al. 2019). Es así que en los últimos años ha tomado cada vez más relevancia el estudio científico de las plantas con fines medicinales (fitomedicina). En esta disciplina se pueden visualizar dos corrientes. Una de ellas implica el desarrollo de nuevos fármacos utilizando a las plantas medicinales como fuentes de compuestos, es decir, extraer de las mismas el/los compuesto/s activo/s responsables de la acción farmacológica asociada a la planta y posteriormente modificarlo/s y/o sintetizarlo/s químicamente. La otra corriente, en cambio, se basa en el uso de las **preparaciones herbales, en formato de extractos o infusiones, como terapia**. Esta estrategia es de especial interés en este trabajo y presenta varias *ventajas* con respecto a la primera. Por un lado, las preparaciones

herbales contienen una mezcla de metabolitos secundarios y la interacción entre ellos, muchas veces de forma aditiva o sinérgica, provoca el efecto farmacológico deseado. Además, los extractos vegetales, a diferencia de los compuestos puros, presentan menor cantidad de efectos no deseados o adversos, resultan menos tóxicos para la salud y son menos costosos, lo que facilita su acceso a la mayoría de la población. Asimismo, considerando que la resistencia a los medicamentos sintéticos es una de las principales causas del fracaso de la quimioterapia en la clínica, los extractos vegetales representan una alternativa muy prometedora debido a que al aportar varios fitoquímicos en simultáneo actúan de forma multi-específica, es decir, actúan sobre múltiples blancos al mismo tiempo con mayor probabilidad de ejercer el efecto terapéutico buscado. Por todo lo expuesto, en la actualidad se plantea el uso de extractos vegetales de forma directa como agentes terapéuticos que complementen a los regímenes de tratamiento estándar (Efferth et al. 2017; Herranz- López et al. 2018; Kumar et al. 2019).

Argentina se considera un país con una gran diversidad de especies y ecosistemas que constituyen un patrimonio único y un acervo de material genético exclusivo en el mundo (Zuloaga et al. 2019). En los últimos años, muchos de los **recursos fitogenéticos nativos** han comenzado a estudiarse y su uso tradicional ha sido validado por la ciencia. Algunos ejemplos de ello son los extractos de especies del género *Valeriana* endémicas de nuestro país, que han demostrado actividad antioxidante por su alto contenido de compuestos fenólicos (Marcucci et al. 2023) o combinaciones de especies de Jarilla del noroeste argentino con actividad antitumoral (Carabajal et al. 2020).

Neltuma caldenia (Burkart) C.E. Hughes & G.P. Lewis (Fabaceae), conocida comúnmente como caldén, es una especie arbórea de ambientes templados-semiáridos, endémica de Argentina, con una distribución geográfica que abarca a las provincias de Buenos Aires, Córdoba, La Pampa, Mendoza, Río Negro y San Luis (Instituto de Botánica Darwinion, <http://www.darwin.edu.ar/>) (**Figura 2 A y B**). Es una especie que le imprime al paisaje una fisonomía particular, considerándose el símbolo de la geografía cultural pampeana. Se desarrolla como árbol leguminoso de 8 a 12 metros de altura, caducifolio, espinoso. Presenta hojas compuestas, formadas por dos hileras de folíolos muy pequeños (2 a 5 mm) en número de 20 a 30 pares por hoja. Caen después de la primera helada (abril-mayo) y vuelven a brotar después de las últimas heladas (octubre-noviembre). Sus flores son de color amarillo pálido y su fruto tiene forma espiralada, de color amarillo a rojizo. Crece en suelo arenoso y árido y resiste a la sequía, desarrollando un sistema radicular extremadamente profundo (Giulietti,

2005). Por sus características y abundancia en la región, tradicionalmente la madera del caldén ha sido utilizada para construcciones, la corteza del tallo para teñir lana de color marrón y diversas partes de la planta como medicamento por los aborígenes Ranqueles (Steibel, 1997).

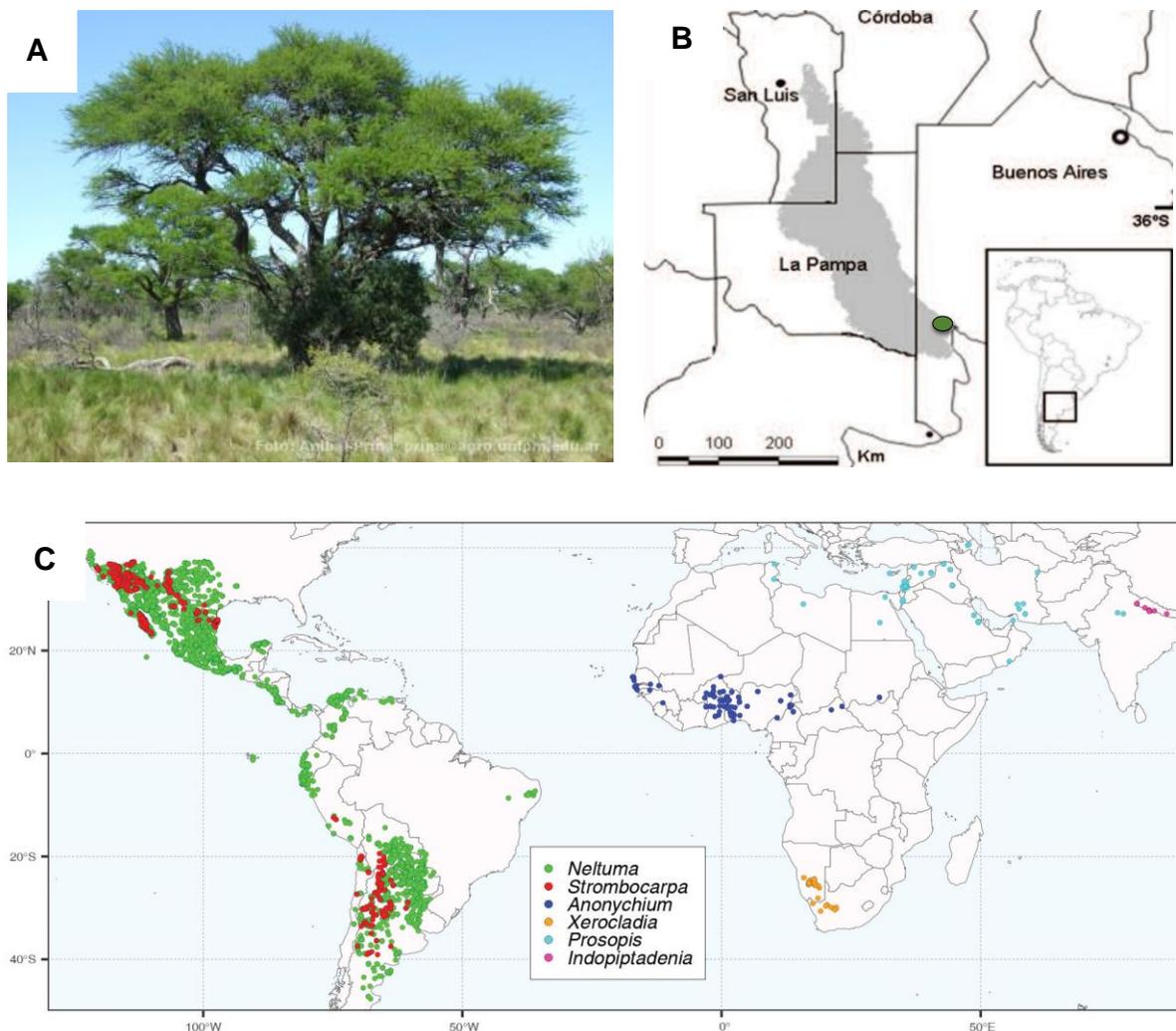


Figura 2. A) Ejemplar de *Neltuma caldenia*. Foto tomada de <https://buscador.floraargentina.edu.ar/> B) Distribución geográfica de *Neltuma caldenia* (sombreado gris) y sitio de recolección del material vegetal utilizado en el plan de trabajo (circulo verde). Tomado y adaptado de Dussart et al. 2015. C) Distribución de los nuevos géneros que anteriormente estaban unificados todos como *Prosopis spp.* Tomado de Hughes et al. 2022.

Hasta mediados del año 2022, *N. caldenia* se encontraba incluida dentro del género *Prosopis*; sin embargo, estudios filogenómicos recientes aportaron evidencia que llevó a la modificación del género (Hughes et al. 2022). De esta manera, las especies del continente americano que pertenecían a *Prosopis spp.*, quedaron distribuidas en los dos nuevos géneros: *Neltuma* y *Strombocarpa* (**Figura 2C**). *Neltuma spp.* (ex- *Prosopis spp.*) cuenta con 45 especies nativas de las Américas que se distribuyen desde el suroeste y centro de los Estados Unidos a través de México, América Central, el Caribe y América del Sur, hasta la región sur Argentina

(Cardozo et al. 2010; Aguilar et al. 2023). En nuestro país, tiene una amplia difusión en diversas regiones fitogeográficas, extendiéndose desde la Pre-puna hasta la Patagonia, principalmente en las Provincias del Monte, Chaco y Espinal (Cardozo et al. 2010; Joseau et al. 2023).

Se han atribuido una amplia variedad de propiedades farmacológicas a extractos, fracciones o compuestos aislados desde diferentes especies del género *Neltuma* y *Strombocarpa* (ambos *ex-Prosopis*), como son efectos antimicrobianos, antifúngicos, antiparasitarios, antioxidantes y, recientemente, **antitumorales** (Henciya et al. 2017; Gonzalez-Montemayor et al. 2018; Zhong et al. 2022). En relación a este último aspecto, y para el género *Neltuma*, se ha estudiado el potencial antineoplásico de las especies *N. laevigata*, *N. juliflora* y *N. glandulosa* (Senthil Kumar et al. 2011; Utage et al., 2018; Elbehairi et al. 2020; Ibarra-Berumen et al. 2023). Sin embargo, ninguna de estas tres especies es nativa de nuestro país. La especie nativa que sí ha sido estudiada es el retortuño: *Strombocarpa strombulifera* (*ex- Prosopis strombulifera*). Los estudios científicos muestran que un *extracto acuoso obtenido a partir de las hojas del retortuño* ha demostrado actividad citotóxica *in cultivo* contra las líneas celulares de cáncer mamario y colorrectal, MCF-7 y HCT-116, respectivamente. Además, en un estudio de toxicidad oral sub-crónica realizado en ratones BALB/c con dosis de extracto de hasta 150 mg/animal/día, no provocó letalidad, ni alteraciones neurológicas, anatomo-patológicas, serológicas o bioquímicas (Hapon et al. 2014). Asimismo, en ratones C57BL6, el extracto acuoso aumentó significativamente la mediana de supervivencia en un modelo de cáncer colorrectal inducido por 1,2-dimetilhidrazina y redujo el volumen y el peso tumoral final de un modelo animal de melanoma realizado con células B16-F0 (Persia et al. 2020). Finalmente, el estudio de la composición química del extracto arrojó que los compuestos fenólicos son los principales responsables de las actividades antitumorales anteriormente descritas (Persia et al. 2020). Existen varios reportes en la bibliografía que demuestran la capacidad de los compuestos fenólicos obtenidos de plantas para regular distintos *hallmarks* del cáncer (Zhou et al. 2016; Sharma et al. 2018; Lachance et al. 2020); por ejemplo, los flavonoides actúan sobre las especies reactivas de oxígeno, participan en el arresto del ciclo celular, inducen apoptosis y autofagia y suprimen la invasividad de las células cancerosas (Kopustinskiene et al. 2020).

En conclusión, en el presente trabajo se propone investigar las propiedades antitumorales de *N. caldenia* - caldén; especie arbórea argentina de la cual hasta el momento no se disponen de estudios científicos que hayan evaluado su potencial antitumoral.

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

La **HIPÓTESIS DE TRABAJO** que se desea contrastar es que los metabolitos presentes en un extracto acuoso (EA) obtenido a partir de hojas de la especie nativa *Neltuma caldenia* (Nc) modulan eventos claves de la progresión tumoral y la diseminación metastásica del CMTN.

El **OBJETIVO GENERAL** de este plan de trabajo es investigar mediante ensayos preclínicos el potencial antitumoral del EANc en CMTN.

Particularmente, y como **OBJETIVOS ESPECÍFICOS** de esta tesis de grado, nos proponemos:

1. Caracterizar los efectos de EANc sobre la viabilidad de líneas celulares de CMTN y no-malignas de epitelio glandular mamario.
2. Elucidar el mecanismo celular implicado en los efectos antitumorales del EANc.
3. Evaluar los efectos de EANc sobre la migración celular de líneas celulares de CMTN y no-malignas de epitelio glandular mamario.

MATERIALES Y MÉTODOS

La tesis de grado se realizó en el Laboratorio de Biología del Cáncer, dirigido por los Dres. Facchinetti y Curino, perteneciente al Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB) - CONICET – UNS. El plan de tesis fue financiado por subsidios de la Universidad Nacional del Sur (PGI 24/ZB91), de la Agencia (PICT-2021-I-A-00144; PICT-2020-SERIEA-03807; PICT 2018-01678) y de la Fundación Florencio Fiorini.

1. Material vegetal y obtención del extracto acuoso

Para la localización de la población de *N. caldenia* se utilizó la información relevada a través del acceso a los ejemplares del Herbario del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia (BBB) de la UNS, se analizó la bibliografía especializada (Zuloaga et al. 2019) y se consultó a un referente botánico regional (Dr. Carlos Villamil, Profesor Consulto (UNS) y director del Herbario BBB). La población de interés para este estudio fue geo-referenciada y se tomaron registros fotográficos. El material fue recolectado durante el año 2021, en la localidad de Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina (38°41'36"S, 62°18'46"W) (**Figura 2B**). Se colectaron hojas jóvenes que se secaron en estufa durante siete días a 40 °C, los primeros tres días con extractor de humedad forzado. Una vez seco, el material se almacenó en cajas cerradas con sílica gel hasta el momento de su utilización.

Para la preparación del extracto, se tomó como la metodología descrita en Persia et al. (2020). Las hojas se autoclavaron en agua destilada (50 gramos / 500 ml) durante 1 hora a 121°C. Luego de la separación de sólidos por filtración, se procedió a realizar la liofilización completa del extracto (**Figura 3**) obteniéndose un producto seco que se conservó al abrigo de la luz, a -20°C, en envases secos y correctamente tapados para evitar el ingreso de humedad. Al momento de su uso, se preparó una solución madre con PBS 1X estéril de concentración: 25 mg/ml. Antes de su uso, el EANc se esterilizó por autoclavado durante 30 min a 121°C.

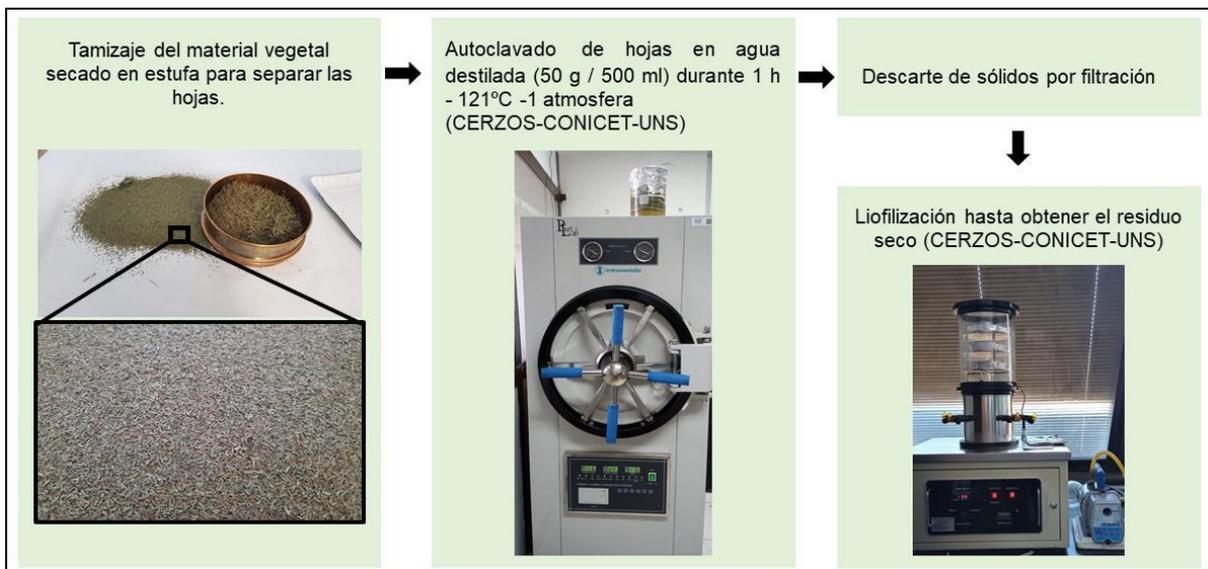


Figura 3. Pasos generales para la obtención del extracto acuoso de *Neltuma caldenia*.

2. Ensayos de viabilidad celular

Para realizar los ensayos de viabilidad celular se trabajó con placas de 96 pocillos. Se emplearon células de CMTN 4T1 (murinas) y MDA-MB-231 (humanas) y células de epitelio glandular mamario no-malignas HC11 (murinas). Según la línea celular estudiada y el tiempo de cultivo, las células fueron sembradas con una densidad de 1.500 a 6.000 células por pocillo en 100 μ l de medio e incubadas a 37 °C en atmósfera húmeda de 5 % de CO₂. Las células MDA-MB-231 se cultivaron en medio de cultivo DMEM F12 (del inglés *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Sigma) y las células 4T1 y HC11 en el medio de cultivo RPMI (del inglés *Roswell Park Memorial Institute Medium*, Sigma). Ambos suplementados con 10 % de suero fetal bovino (SFB, Gibco) y 1 % de penicilina (Gibco, 100 U/ml) y estreptomycin (Gibco, 100 μ g/ml). El medio correspondiente a las células HC11 fue suplementado con insulina (5 μ g/ml, Gibco).

Transcurridas 24 h desde su siembra, las células se trataron con diferentes concentraciones de EANc (0,001- 0,01- 0,1- 1,0- 2,5 mg/ml) o PBS 1X estéril (control) durante 19, 48 y 72 horas (h). Al finalizar el tiempo de tratamiento se procedió a remover el medio de la placa por inversión. Se fijaron las células con 100 μ L de metanol 100 % en cada pocillo durante 10 minutos (min). Se descartó el contenido de la placa y se lavó cada pocillo tres veces con agua destilada. A continuación, se agregó a cada pocillo 100 μ L de Cristal Violeta (CV) 0,1 % y se dejó actuar 30 min. Luego, se lavó la placa con agua destilada un mínimo de tres veces. Por último, una vez seca la placa, se agregó 100 μ L de ácido acético 10 % a cada pocillo. Una vez removido el colorante desde las células fijadas, se midió la absorbancia en un lector

de placas de 96 pocillos a 560 nm. Los valores brindados por el lector fueron analizados con el programa *GraphPad Prism* versión 5.0.

Para validar los resultados obtenidos con el método de tinción con CV empleamos el ensayo colorimétrico de MTT (sal de tetrazolio: bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium, Merck 475989). Para ello, una vez realizados los tratamientos con EANc o vehículo (PBS 1X) durante 48 y 72 h, se retiró el medio de cada pocillo e incubó con el MTT a una concentración de 5 mg/ml en medio sin SFB durante 4 h en oscuridad. En este tiempo, el MTT es reducido por las enzimas intracelulares a cristales de formazán. Luego, se procedió a descartar el medio y disolver los cristales por el agregado de 100 µL SDS 20 % en HCl 0,01 M a cada pocillo e incubación en agitación y oscuridad durante 24 h. La cuantificación de la reducción de MTT se determinó espectrofotométricamente a 570 nm, restando el valor de la absorbancia a 650 nm correspondiente a proteínas y restos celulares. Los resultados fueron expresados como porcentaje del valor control.

3. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo

El análisis del ciclo celular fue realizado por FACS (del inglés *Fluorescence-Activated Cell Sorter analysis*). Las células 4T1 y MDA-MB-231 fueron tratadas con una concentración de 1,0 mg/ml de EANc o vehículo (PBS 1X) durante 48 y 72 h, luego tripsinizadas y resuspendidas en el medio de cultivo completo correspondiente. La suspensión celular se centrifugó a 2.000 r.p.m. durante 5 min, se lavó el pellet generado con 1 ml de PBS 1X y se centrifugó nuevamente a 2.000 r.p.m. por 5 min. Los nuevos pellets fueron resuspendidos en 1,5 ml de PBS 1X más el agregado gota a gota de 3,5 ml de etanol 100 % frío para la fijación. Las células se almacenaron a -20 °C durante 24 h, como mínimo, y por un período no mayor a 15 días. Al momento del análisis, las células fijadas fueron centrifugadas a 2.000 r.p.m. por 5 min, lavadas con 1,5 ml de PBS 1X y nuevamente centrifugadas a 2.000 r.p.m. por 5 min. Finalmente, el pellet obtenido fue resuspendido en 0,5 ml de PBS 1X conteniendo 50 µg/ml de Ioduro de Propidio (IP) y 100 µg/ml RNAasa A. Se realizó una incubación máxima de 1 h a 37 °C en oscuridad. El IP empleado se intercala en la cavidad mayor de la doble cadena del DNA y produce un aducto altamente fluorescente que puede ser excitado a 488 nm con un ancho de emisión centrado en alrededor de 600 nm. El empleo de RNAasa se debe a que el IP también puede unirse al RNA y por lo tanto es necesario degradarlo para una óptima resolución del DNA.

Las muestras se llevaron al servicio de citometría del INBIOSUR-CONICET-UNS para su análisis en un citómetro de flujo FACSCalibur seteado en una longitud de onda de excitación de 488 nm y de emisión de 585 nm. Se empleó un programa para histogramas (ModFit LT *cell cycle analysis software*) con el cual se graficó el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular. El ensayo se realizó por triplicado. El procesamiento descrito de las muestras se llevó a cabo de la misma manera a la que se trabaja habitualmente en el laboratorio (Ferronato et al. 2015).

4. Detección de apoptosis celular

Las células apoptóticas fueron analizadas por empleo de Anexina V (AV) -FITC (BD Pharmingen) mediante citometría de flujo. Para ello, las células MDA-MB-231 tratadas con el EANc (1,0 mg/ml; 72 h) o vehículo, fueron tripsinizadas y resuspendidas en el medio de cultivo completo correspondiente. La suspensión de células se centrifugó a 2.000 rpm durante 5 min, se lavó el pellet generado con 1 ml de PBS 1X y se centrifugó nuevamente a 2.000 rpm durante 5 min. Los nuevos pellets fueron resuspendidos en buffer de binding 1X en una concentración de 1×10^6 células/ml. Se tomaron 100 μ L de la suspensión para realizar la marcación con 3 μ L de AV-FITC y/o 10 μ L de IP (50 μ g/ml) según corresponda. Se homogeneizó la suspensión y se incubó en oscuridad a temperatura ambiente (25 °C) por 15 min. Finalmente se agregaron 400 μ l de buffer de binding 1X a cada tubo.

El análisis se realizó en un citómetro de flujo FACSCalibur del INBIOSUR-CONICET-UNS durante el transcurso de la hora siguiente y sobre una población de 20.000 células. Se realizaron los siguientes controles para establecer las compensaciones y los cuadrantes: 1) células sin teñir, 2) células teñidas solamente con AV-FITC (sin IP) y 3) células teñidas solamente con IP (sin AV-FITC). Cada ensayo se realizó por triplicado. Los datos fueron analizados con el software *Cell Quest (Becton Dickinson)*. Se graficó el % de células con marcación AV+/IP+ (apoptosis tardía), AV+/IP- (apoptosis temprana), AV-/IP+ (necrosis) y AV-/IP- (células viables).

5. Ensayos de migración celular

Para evaluar el efecto del EANc sobre la capacidad migratoria de las células se realizó el ensayo de cierre de la herida, también conocido como “wound healing”, de la manera habitual como se realiza en el laboratorio (Ferronato et al. 2019). Para ello, las células de CMTN y no-malignas, se sembraron en placas de 35 mm y se cultivaron por 24 h hasta la formación de una monocapa. Dichas placas presentan una cuadrícula en su cara inferior externa la cual permite

el seguimiento de la herida en puntos específicos a lo largo del tiempo. Luego, sobre la monocapa celular, se realizó una herida con un tip dejando al descubierto una sección de la misma. Se retiró el medio de cultivo y se añadió medio de cultivo nuevo con el vehículo (PBS 1X) o con el EANc a una concentración de 0,1 o 1,0 mg/ml según la línea celular en estudio. La herida fue observada con un microscopio invertido NIKON ECLIPSE TE 2000S y fotografiada con una cámara digital Sony Coolpix acoplada al microscopio. Las fotos se tomaron al inicio del tratamiento (0 h) y antes del tiempo de duplicación de la línea celular estudiada, todas en un aumento de 200x. Los tiempos de duplicación de las líneas celulares empleadas fueron determinados previamente en el laboratorio, los cuales son de 16 h para las células 4T1, 28 h para las MDA-MB-231 y 17 h para las HC11, aproximadamente. El programa *ImageJ* se empleó para medir el área de la herida para cada condición en los distintos tiempos evaluados. Se realizaron gráficos con el programa *GraphPad* representando el área de la herida de cada condición y en cada tiempo como porcentaje del área a tiempo 0 h.

6. Análisis estadísticos

El software *GraphPad Prism* versión 5.0 (San Diego California USA) fue utilizado para la recolección, procesamiento y análisis estadístico de los datos. Se realizó un análisis de ANOVA con posterior test de Bonferroni. Los valores de p menores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS

Efectos del EANc sobre la viabilidad de líneas celulares de CMTN y células no-malignas de epitelio glandular mamario.

Para dar respuesta al primer objetivo específico de este trabajo evaluamos los efectos del EANc sobre la viabilidad de dos líneas celulares de CMTN: células murinas 4T1 y humanas MDA-MB-231. Realizamos curvas de concentración - respuesta con un rango de concentraciones crecientes de EANc: 0,001- 0,01- 0,1- 1,0- 2,5 mg/ml y evaluando la respuesta a 48 y 72 h de tratamiento.

Definimos operativamente a la variable *viabilidad celular* como la proporción de células que sobreviven a alguna situación particular; específicamente aquí se refiere al número de células vivas o viables luego del tratamiento con el EANc. Si el número de células hallado en la condición experimental es menor al de la condición control, esto podría deberse a que el EANc produjo una inhibición del ciclo celular y/o un incremento de la muerte de las células en estudio.

La *selección de las concentraciones y los tiempos de tratamiento* utilizados se realizó en base a la bibliografía existente en relación a los efectos antitumorales provocados por un extracto acuoso de otra especie nativa de Argentina perteneciente al género *Strombocarpa* (ex-*Prosopis*) y en base a ensayos preliminares realizados con el EANc.

Empleamos el método colorimétrico de CV y, posteriormente, el método de MTT para validar de una manera independiente los resultados obtenidos.

En primera instancia evaluamos los efectos del EANc sobre la viabilidad de las células de CMTN de origen murino **4T1**. Como se puede observar en la **Figura 4**, el EANc redujo la viabilidad de las células en las concentraciones de 0,01; 0,1; 1,0 y 2,5 mg/ml; tanto a 48 h como a 72 h de tratamiento. Teniendo en cuenta los efectos obtenidos, se evaluó la existencia de diferencias estadísticas entre la misma concentración de EANc a ambos tiempos de tratamiento y se registró una diferencia significativa a la concentración de 1,0 mg/ml (48 h: $34,25 \pm 1,03$ % vs. 72 h: $22,11 \pm 0,70$ %; * $p < 0,05$).

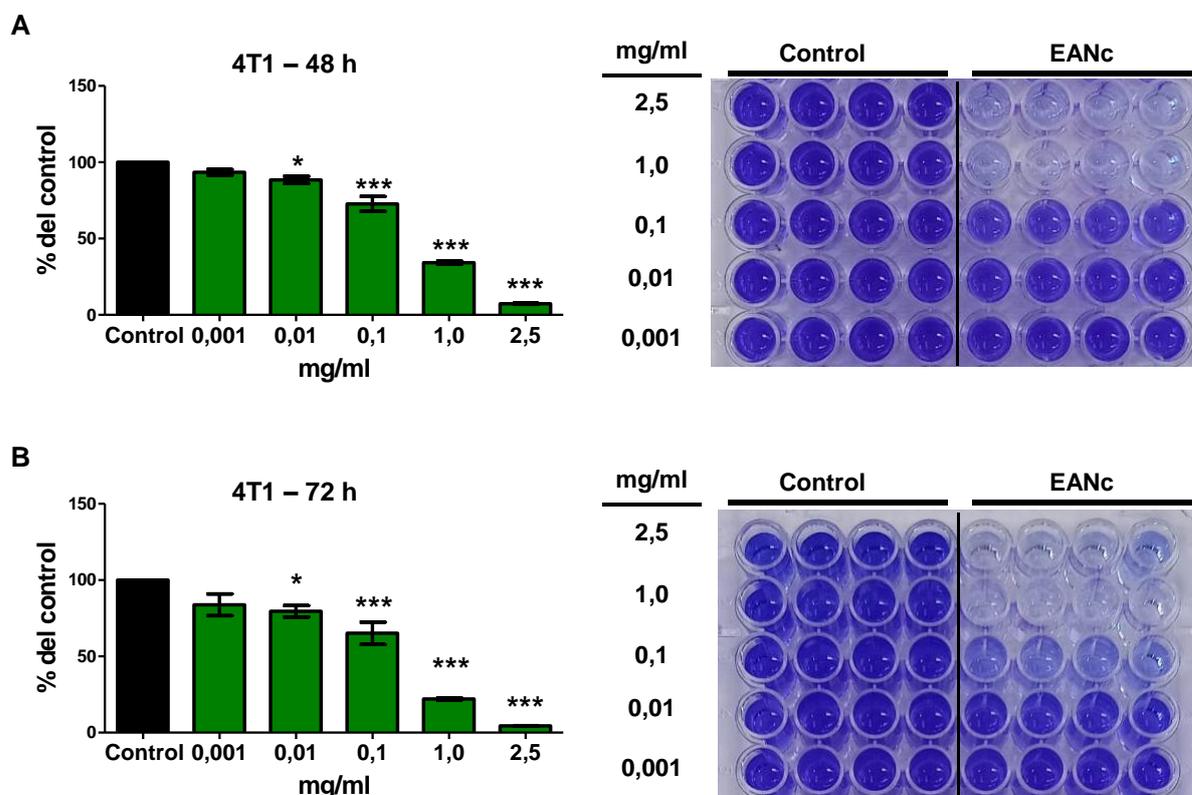


Figura 4. Efecto del EANc sobre la viabilidad de células 4T1 mediante ensayos colorimétricos con CV. Las células fueron expuestas a las concentraciones indicadas de EANc (barras verdes) o vehículo (control: PBS 1X) durante A) 48 h y B) 72 h de tratamiento. Los resultados se analizaron mediante ANOVA con posterior test de Bonferroni. Las barras representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes (** $p < 0,001$; * $p < 0,05$ respecto del control). A la derecha se muestran fotos de una placa *multiwell* correspondiente a uno de los experimentos realizado.

Posteriormente, se repitieron los ensayos de viabilidad celular para evaluar los efectos del EANc por empleo del método colorimétrico de MTT. Como se puede observar en la **Figura 5**, el EANc redujo la viabilidad de las células 4T1 de una manera similar a la obtenida con la tinción de CV: el EANc disminuyó la viabilidad en las concentraciones de 0,01; 0,1; 1,0 y 2,5 mg/ml; tanto a 48 h como a 72 h de tratamiento.

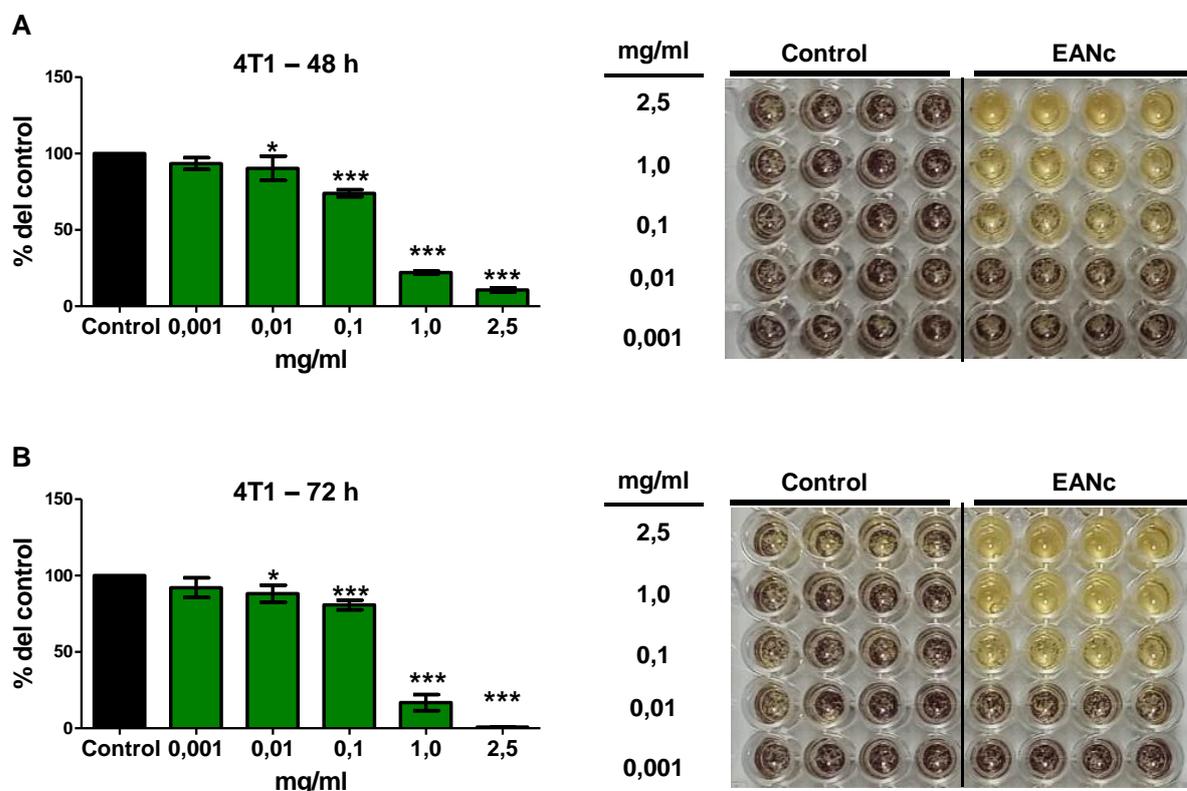


Figura 5. Efecto del EANc sobre la viabilidad de células 4T1 por ensayos colorimétricos con MTT. Las células fueron expuestas a las concentraciones indicadas de EANc (barras verdes) o vehículo (control: PBS 1X) durante A) 48 h y B) 72 h de tratamiento. Los resultados se analizaron mediante ANOVA con posterior test de Bonferroni. Las barras representan la media \pm SD de cuatro replicas (** $p < 0,001$; * $p < 0,05$ respecto del control). A la derecha se muestran fotos de la placa *multiwell* post- incubación con el MTT.

A continuación, evaluamos los efectos del EANc sobre la línea celular de CMTN humana **MDA-MB-231**. El EANc redujo la viabilidad de estas células en las concentraciones de 1,0 y 2,5 mg/ml a ambos tiempos de tratamiento (**Figura 6 A y B**), y en la concentración de 0,1 mg/ml a las 72 h de tratamiento (**Figura 6B**). Además, se hallaron diferencias significativas al comparar los efectos de la misma concentración de EANc (0,1; 1,0 o 2,5 mg/ml) entre ambos tiempos de tratamiento. Estas diferencias estadísticas para las diferentes concentraciones efectivas de EANc son:

- 0,1 mg/ml= 48 h: $100,3 \pm 1,35$ % vs. 72 h: $87,18 \pm 3,24$ %; ** $p < 0,01$.
- 1,0 mg/ml= 48 h: $75,05 \pm 2,15$ % vs. 72 h: $61,49 \pm 1,06$ %; *** $p < 0,001$.
- 2,5 mg/ml= 48 h: $69,67 \pm 1,14$ % vs. 72 h: $38,76 \pm 4,33$ %; *** $p < 0,001$.

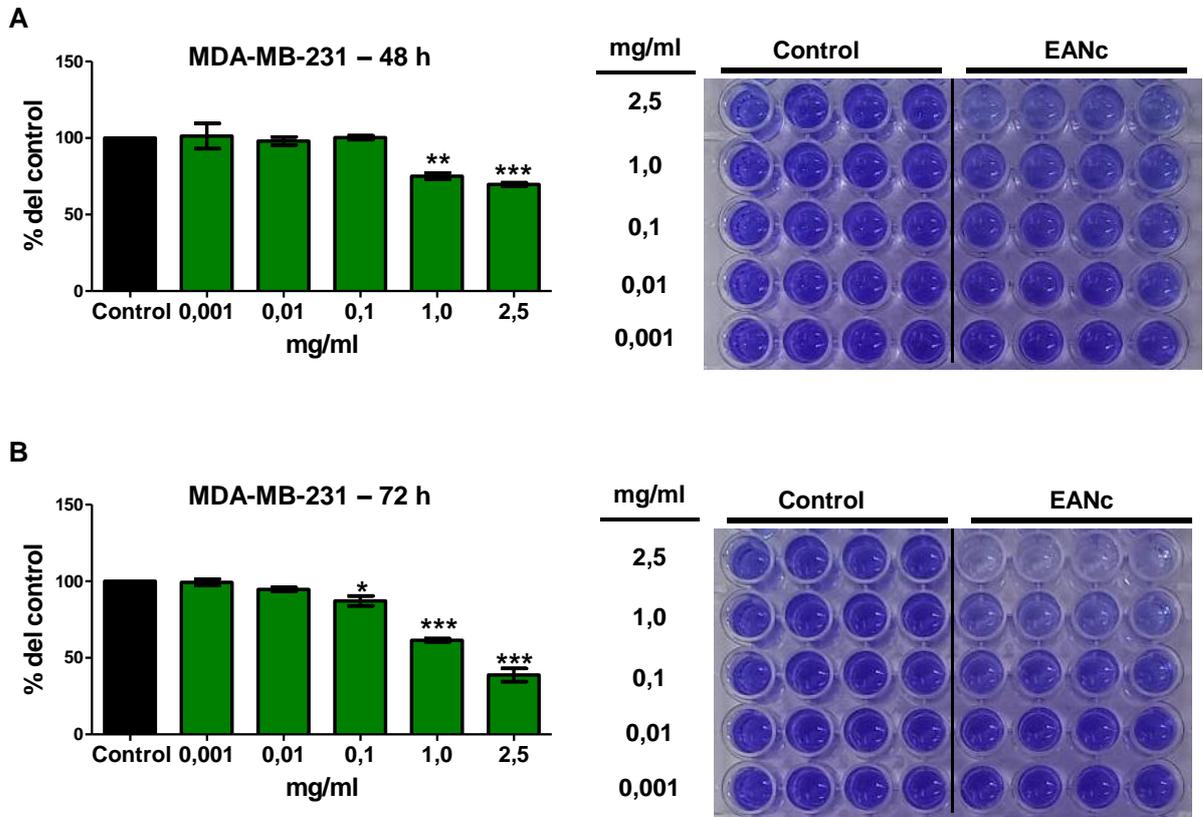


Figura 6. Efecto del EANc sobre la viabilidad de células MDA-MB-231 mediante ensayos colorimétricos con CV. Las células fueron expuestas a las concentraciones indicadas de EANc (barras verdes) o vehículo (control: PBS 1X) durante A) 48 h y B) 72 h de tratamiento. Los resultados se analizaron mediante ANOVA con posterior test de Bonferroni. Las barras representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes (***) $p < 0,001$; **) $p < 0,01$; *) $p < 0,05$ respecto del control). A la derecha se muestran fotos de una placa *multiwell* correspondiente a uno de los experimentos realizado.

Con respecto a los ensayos de viabilidad celular empleando el método colorimétrico de MTT, los resultados obtenidos (**Figura 7**) se encuentran en concordancia con los descriptos anteriormente. De esta manera, se validó el efecto del EANc sobre la reducción de la viabilidad de las células MDA-MB-231 a las concentraciones y tiempos evaluados por el método de tinción con CV.

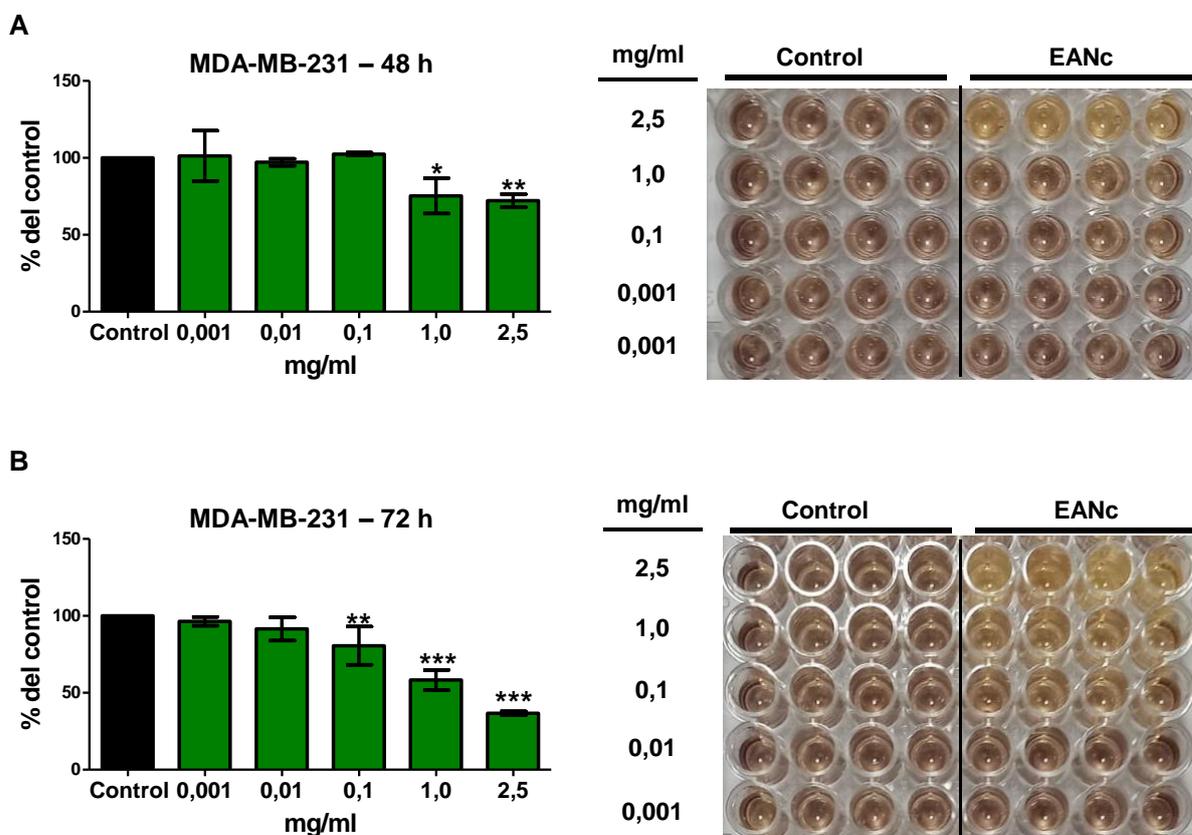


Figura 7. Efecto del EANc sobre la viabilidad de células MDA-MB-231 por ensayos colorimétricos con MTT. Las células fueron expuestas a las concentraciones indicadas de EANc (barras verdes) o vehículo (control: PBS 1X) durante A) 48 h y B) 72 h de tratamiento. Los resultados se analizaron mediante ANOVA con posterior test de Bonferroni. Las barras representan la media \pm SD de cuatro replicas (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$ respecto del control). A la derecha se muestran fotos de la placa *multiwell* post- incubación con el MTT.

Por otro lado, para conocer el efecto del EANc sobre células no-malignas de epitelio glandular mamario, y contrastarlo con el obtenido sobre las células tumorales, realizamos las curvas de concentración – respuesta empleando las células **HC11**. Como se detalló en la sección Materiales y Métodos, estas células son de origen murino, al igual que las células tumorales 4T1.

Los resultados obtenidos en los ensayos de viabilidad con CV indican que el EANc disminuye la viabilidad de las células HC11 en la concentración de 2,5 mg/ml a las 48 y 72 h de tratamiento (** $p < 0,001$; **Figura 8 A y B**) y, además, el EANc redujo la viabilidad al tratar las células con 1,0 mg/ml durante 72 h (** $p < 0,01$; **Figura 8B**). No se hallaron diferencias significativas en los efectos provocados por EANc con la concentración de 2,5 mg/ml entre 48 y 72 h de tratamiento (48 h: $28,97 \pm 5,71$ % vs. 72 h: $24,48 \pm 10,20$ %; $p > 0,05$).

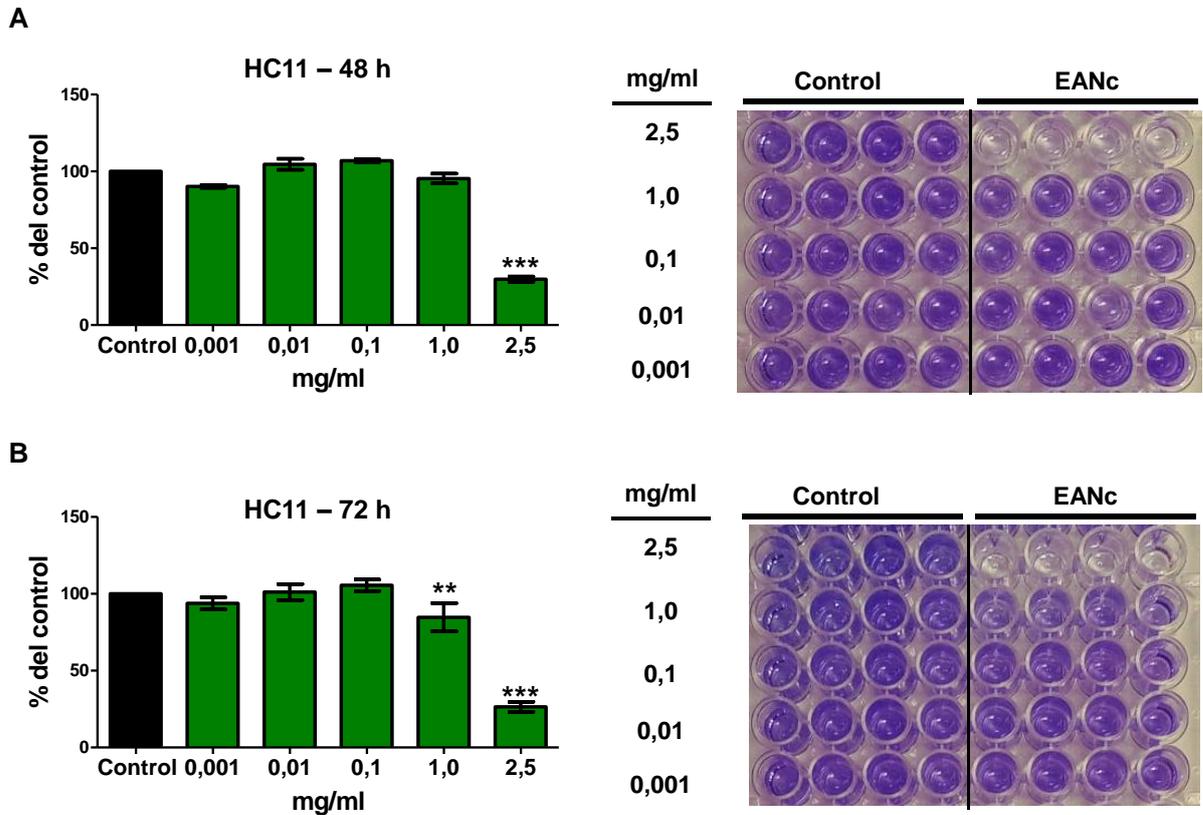


Figura 8. Efecto del EANc sobre la viabilidad de células mamarias no-malignas HC11 mediante ensayos colorimétricos con CV. Las células fueron expuestas a las concentraciones indicadas de EANc (barras verdes) o vehículo (control: PBS 1X) durante A) 48 h y B) 72 h de tratamiento. Los resultados se analizaron mediante ANOVA con posterior test de Bonferroni. Las barras representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes (***) $p < 0,001$; **) $p < 0,01$ respecto del control). A la derecha se muestran fotos de una placa *multiwell* correspondiente a uno de los experimentos realizado.

Luego, al realizar los ensayos con el método de MTT, el EANc redujo la viabilidad de las células HC11 en las concentraciones de 1,0 y 2,5 mg/ml, a ambos tiempos de tratamiento (***) $p < 0,001$; **Figura 9**). También, los análisis estadísticos indican diferencias significativas al comparar los efectos de la misma concentración de EANc (1,0 o 2,5 mg/ml) entre ambos tiempos de tratamiento:

- 1,0 mg/ml= 48 h: $85,26 \pm 1,67$ % vs. 72 h: $63,38 \pm 5,64$ %; ** $p < 0,01$.
- 2,5 mg/ml= 48 h: $72,72 \pm 3,73$ % vs. 72 h: $23,04 \pm 2,61$ %; *** $p < 0,001$.

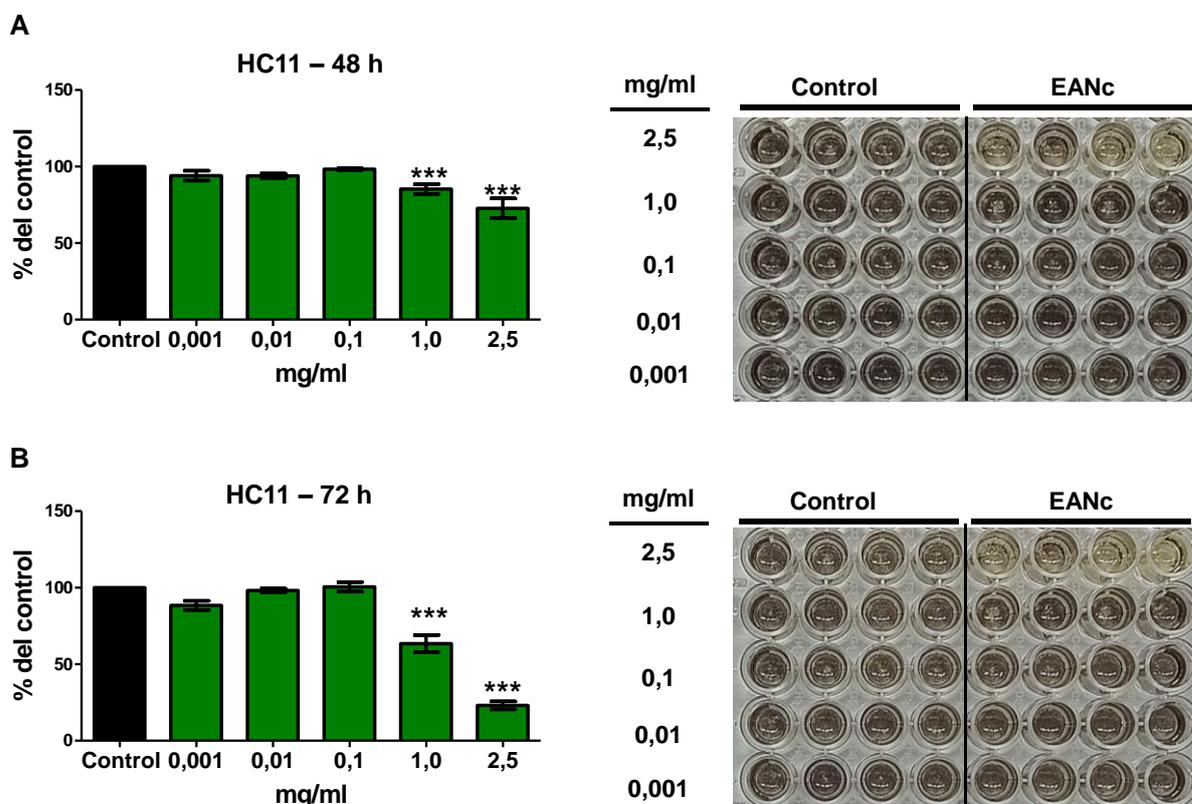


Figura 9. Efecto del EANc sobre la viabilidad de células mamarias no-malignas HC11 por ensayos colorimétricos con MTT. Las células fueron expuestas a las concentraciones indicadas de EANc (barras verdes) o vehículo (control: PBS 1X) durante A) 48 h y B) 72 h de tratamiento. Los resultados se analizaron mediante ANOVA con posterior test de Bonferroni. Las barras representan la media \pm SD de cuatro replicas (***) $p < 0,001$ respecto del control). A la derecha se muestran fotos de la placa *multiwell* post- incubación con el MTT.

Finalmente, para conocer si existen diferencias en los efectos del EANc entre células no-malignas y tumorales, comparamos los resultados obtenidos con ambas líneas celulares de origen murino. Como puede observarse en la **Figura 10**, el EANc presentó un efecto diferencial entre las células HC11 y 4T1. Si bien el EANc disminuyó la viabilidad de ambas líneas celulares, su efecto fue menor sobre las células mamarias no-malignas en las concentraciones de 0,01; 0,1; 1,0 y 2,5 mg/ml tanto a 48 h como 72 h de tratamiento.

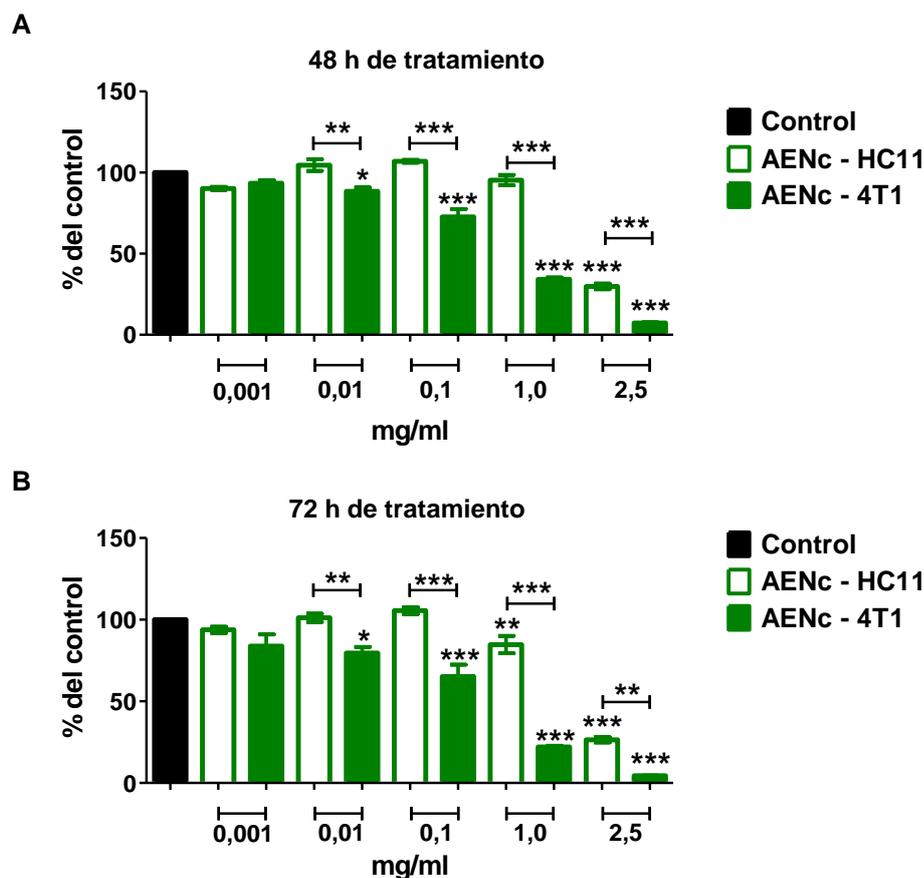


Figura 10. Comparación de los efectos del EANC sobre la viabilidad entre células mamarias murinas no-malignas HC11 (barras blancas) y tumorales 4T1 (barras verdes) a A) 48 h y B) 72 h de tratamiento. Los resultados de los ensayos de CV se analizaron mediante ANOVA con posterior test de Bonferroni; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Evaluación del mecanismo celular implicado en los efectos antitumorales del EANC: análisis del ciclo celular y de la apoptosis mediante citometría de flujo.

Teniendo en cuenta los resultados hasta aquí obtenidos, y para dar respuesta al segundo objetivo específico de este trabajo de tesis, se comenzó a profundizar en el estudio de los mecanismos celulares por los cuales el EANC provocó la reducción de la viabilidad de las células tumorales. Para ello, estudiamos la distribución de la población de células en las distintas etapas del ciclo celular por citometría de flujo. En primera instancia, evaluamos el efecto del EANC sobre células pre-tratadas con 1,0 mg/ml durante 48 h y teñidas con IP el día de su análisis. Decidimos emplear dicha concentración para estos estudios dado que, como se mencionó en la sección anterior, en las células 4T1 se registró una diferencia significativa en esta concentración de 1,0 mg/ml al comparar los dos tiempos de tratamiento (48 h vs. 72 h: * $p < 0,05$); dicha diferencia también se encuentra presente en las células MDA-MB-231, y es muy significativa (48 h vs. 72 h: *** $p < 0,001$).

Como se puede observar en la **Figura 11A**, el tratamiento de las células 4T1 con el EANc durante 48 h provocó un aumento significativo del porcentaje de células en la fase S del ciclo celular en comparación con el control (EANc: $49,51 \pm 0,24$ % vs. control: $35,92 \pm 0,67$ %; *** $p < 0,001$). Dicho aumento fue acompañado de una disminución en el porcentaje de células en la fase G₀/G₁ (EANc: $30,94 \pm 0,63$ % vs. control: $46,81 \pm 1,63$ %; *** $p < 0,001$). En cuanto a las células MDA-MB-231 (**Figura 11B**), se obtuvo un efecto similar al hallado sobre las células 4T1. Es decir, el tratamiento con 1,0 mg/ml del EANc durante 48 h produjo una disminución del porcentaje de células en fase G₀/G₁ (EANc: $27,88 \pm 0,75$ % vs. control: $37,32 \pm 0,35$ %; *** $p < 0,001$) acompañado de un aumento de la población celular en fase S en comparación con el control (EANc: $43,62 \pm 1,15$ % vs. control: $37,19 \pm 0,41$ %; *** $p < 0,001$).

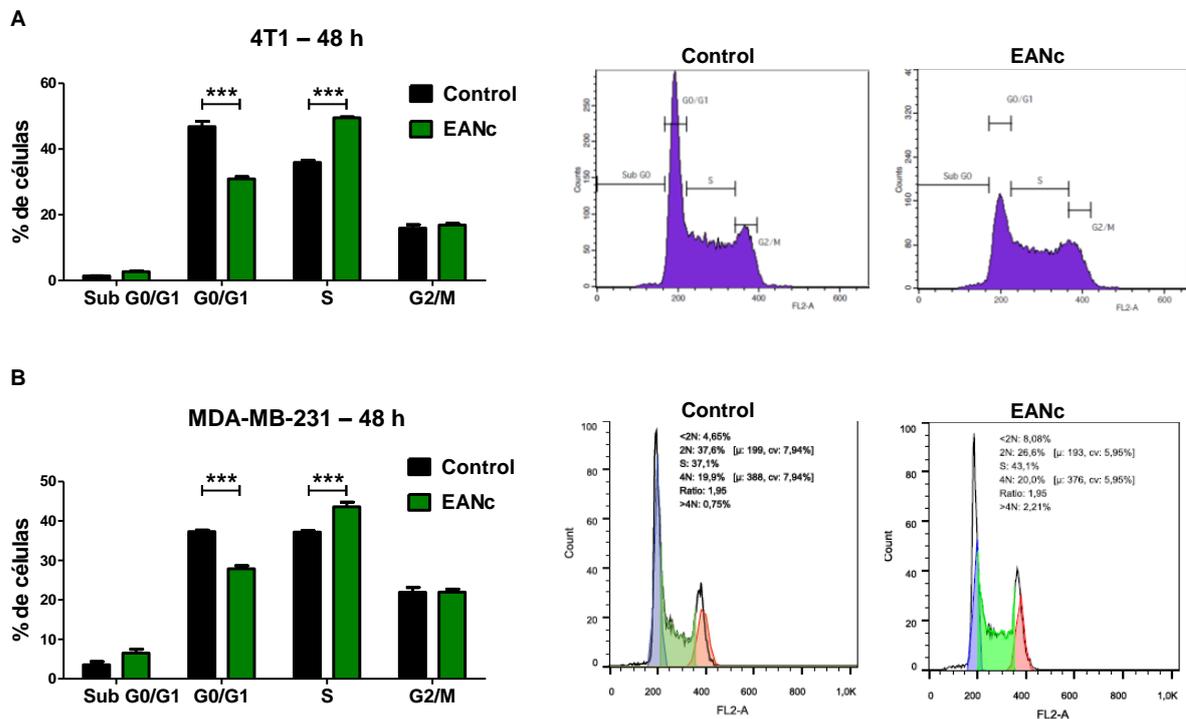


Figura 11. Análisis de la distribución de células A) 4T1 y B) MDA-MB-231 en las distintas fases del ciclo celular por citometría de flujo. Las células fueron tratadas con EANc (1,0 mg/ml) o vehículo (PBS 1X) durante 48 h. Los gráficos de barras representan el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular. El ensayo fue realizado por triplicado. A la derecha se muestran histogramas representativos de cada condición. Se aplicó el test de ANOVA de dos vías, con posterior test de Bonferroni, *** $p < 0,001$.

Luego, continuamos con la evaluación del efecto del EANc sobre las células tumorales humanas MDA-MB-231 estudiando el ciclo celular a las 72 h de tratamiento. Como se observa

en la **Figura 12A**, el EANc provocó una disminución significativa del porcentaje de células en la fase G₀/G₁ (EANc: 48,63 ± 0,75 % vs. control: 52,21 ± 0,35 %; *** $p < 0,001$), un aumento significativo en la fase S (EANc: 33,17 ± 0,37 % vs. control: 31,71 ± 0,16 %; * $p < 0,05$) y, también, un aumento en la fase Sub G₀/G₁ (EANc: 3,78 ± 0,25 % vs. control: 2,17 ± 0,12 %; ** $p < 0,01$). Este aumento en Sub G₀/G₁ es indicativo de que el EANc provoca la muerte celular de esta línea tumoral.

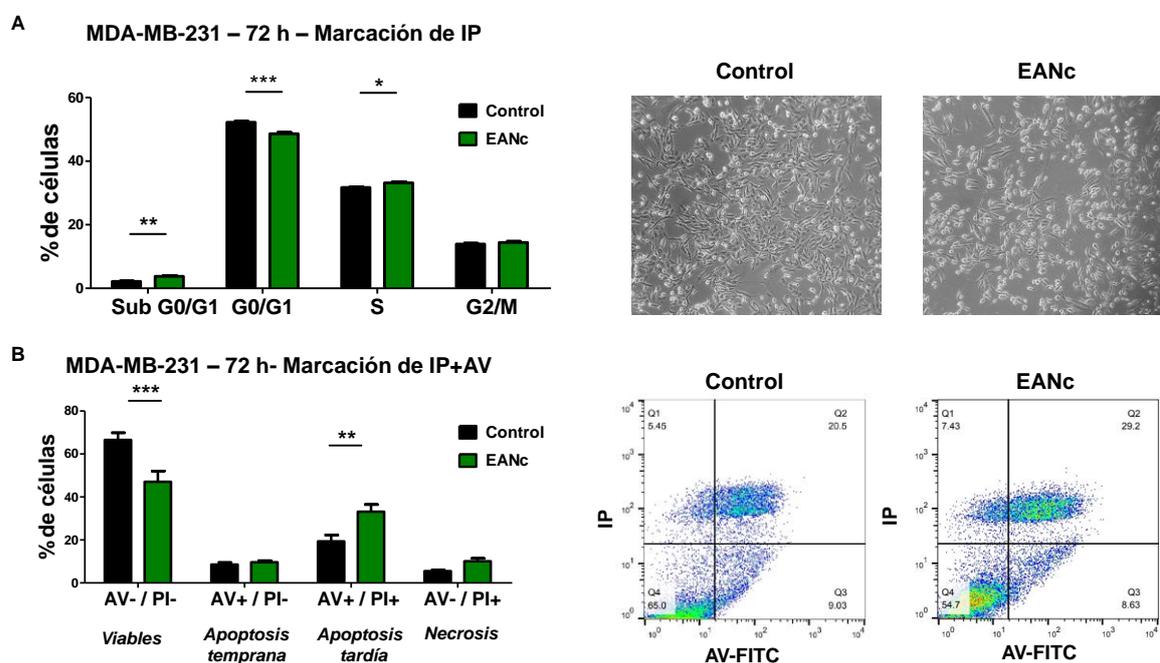


Figura 12. Cuantificación de células MDA-MB-231 marcadas con A) IP y B) IP + AV-FICT por citometría de flujo. Las células fueron tratadas con EANc (1,0 mg/ml) o vehículo (PBS 1X) durante 72 h. Los gráficos de barras representan el porcentaje de células en A) las distintas fases del ciclo celular y con B) las marcaciones indicadas. Cada barra representa el promedio de tres repeticiones ± SD. A la derecha se muestran células en el microscopio de contraste de fases (100x) y gráficos de puntos representativos de cada condición. Se aplicó el test de ANOVA de dos vías, con posterior test de Bonferroni, *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

A continuación, con el objeto de evaluar si el incremento de la población celular en Sub G₀/G₁ producido por el EANc es consecuencia de un aumento de muerte celular por apoptosis, marcamos las células MDA-MB-231 (1,0 mg/ml; 72 h) con IP y AV-FICT para analizarlas por citometría de flujo. Como se observa en la **Figura 12B**, la población apoptótica (AV+ / IP+) incrementó de 19,33 ± 2,97 % en las células tratadas con el vehículo, a 33,17 ± 3,34 % en las células tratadas con el EANc (** $p < 0,01$). Estos resultados indican que el EANc disminuye la viabilidad celular mediante la inducción de apoptosis.

Efectos del EANc sobre la migración de líneas celulares de CMTN y células no-malignas de epitelio glandular mamario.

Para dar respuesta al tercer objetivo específico de este trabajo, evaluamos los efectos del EANc sobre la migración de las líneas celulares de CMTN. Para ello, empleamos los ensayos de cierre de la herida o “wound healing”, de la manera descrita en la sección de Materiales y Métodos. En estos ensayos es importante tener en cuenta, por un lado, el empleo de tiempos de tratamiento menores al tiempo de duplicación de la línea celular en estudio y, por otro, que la concentración de EANc no afecte la viabilidad celular para, de esta manera, asegurarnos de solo cuantificar el efecto sobre la capacidad migratoria de las células. Por lo tanto, en primera instancia, evaluamos el efecto del EANc sobre la viabilidad a 19 h de tratamiento en las tres líneas celulares en estudio, para poder seleccionar las concentraciones a emplear en los ensayos de cierre de la herida. Como se puede observar en la **Figura 13A**, el EANc disminuyó la viabilidad de las células 4T1 significativamente en las concentraciones de 1,0 y 2,5 mg/ml, por lo que decidimos emplear la concentración de 0,1 mg/ml para los estudios de migración celular. Para poder contrastar los efectos con las células tumorales, empleamos esta misma concentración con las células murinas HC11; concentración que no provocó efectos sobre la viabilidad (**Figura 13B**). En las células MDA-MB-231, ninguna de las concentraciones provocó efectos sobre la viabilidad celular a las 19 h de tratamiento (**Figura 13C**).

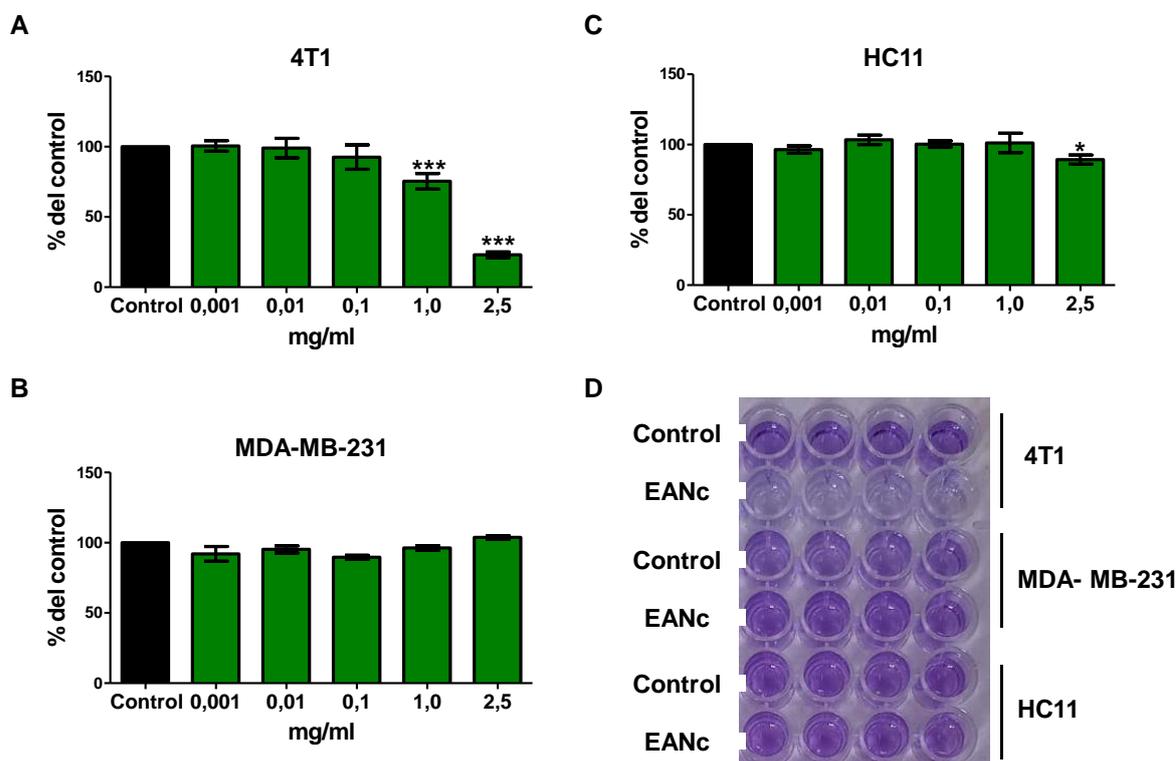


Figura 13. Efecto del EANc sobre la viabilidad de las diferentes líneas celulares mamarias a 19 h de tratamiento. Las células A) 4T1, B) MDA-MB-231 y C) HC11 fueron expuestas a las concentraciones indicadas de EANc (barras verdes) o vehículo (control: PBS 1X) durante 19 h de tratamiento y se cuantificó la viabilidad celular por el método de CV. Los resultados se analizaron mediante ANOVA con posterior test de Bonferroni. Las barras representan la media \pm SEM de dos experimentos independientes ($***p < 0,001$; $*p < 0,05$ respecto del control). D) Se muestran pocillos de la concentración de 1 mg/ml correspondientes a una placa *multiwell* de uno de los experimentos.

Comenzamos con la evaluación de los efectos del EANc sobre la migración de las células 4T1. El extracto al ser empleado a una concentración de 0,1 mg/ml redujo la capacidad migratoria de la línea celular (**Figura 14A**). Tal efecto se observó a las 15 h de tratamiento, tiempo en el cual el área de la herida en las células tratadas con el EANc fue del $48,0 \pm 2,30$ % en comparación con el área del vehículo de $35,77 \pm 2,69$ % ($*** p < 0,001$).

En las células MDA-MB-231, el EANc también produjo una disminución de la migración al tratar a las células con 1,0 mg/ml (**Figura 14B**). Se detectó una diferencia muy significativa a las 16 y 19 h de tratamiento:

- 16 h: EANc: $41,02 \pm 2,95$ % vs. control: $11,25 \pm 2,54$ %; $*** p < 0,001$.
- 19 h: EANc: $29,36 \pm 3,34$ % vs. control: $5,65 \pm 1,82$ %; $*** p < 0,001$.

Por último, se estudiaron los efectos del EANc sobre la migración de la línea celular mamaria no-maligna murina HC11. Como se observa en la **Figura 14C**, el EANc empleado a 0,1 mg/ml no provocó efectos sobre la capacidad migratoria de las células a los tiempos estudiados de 8 y 17 h en comparación con el control:

- 8 h: EANc: $66,12 \pm 8,34$ % vs. control: $59,67 \pm 9,45$ %; $p > 0,05$.
- 17 h: EANc: $58,22 \pm 7,36$ % vs. control: $48,11 \pm 9,87$ %; $p > 0,05$.

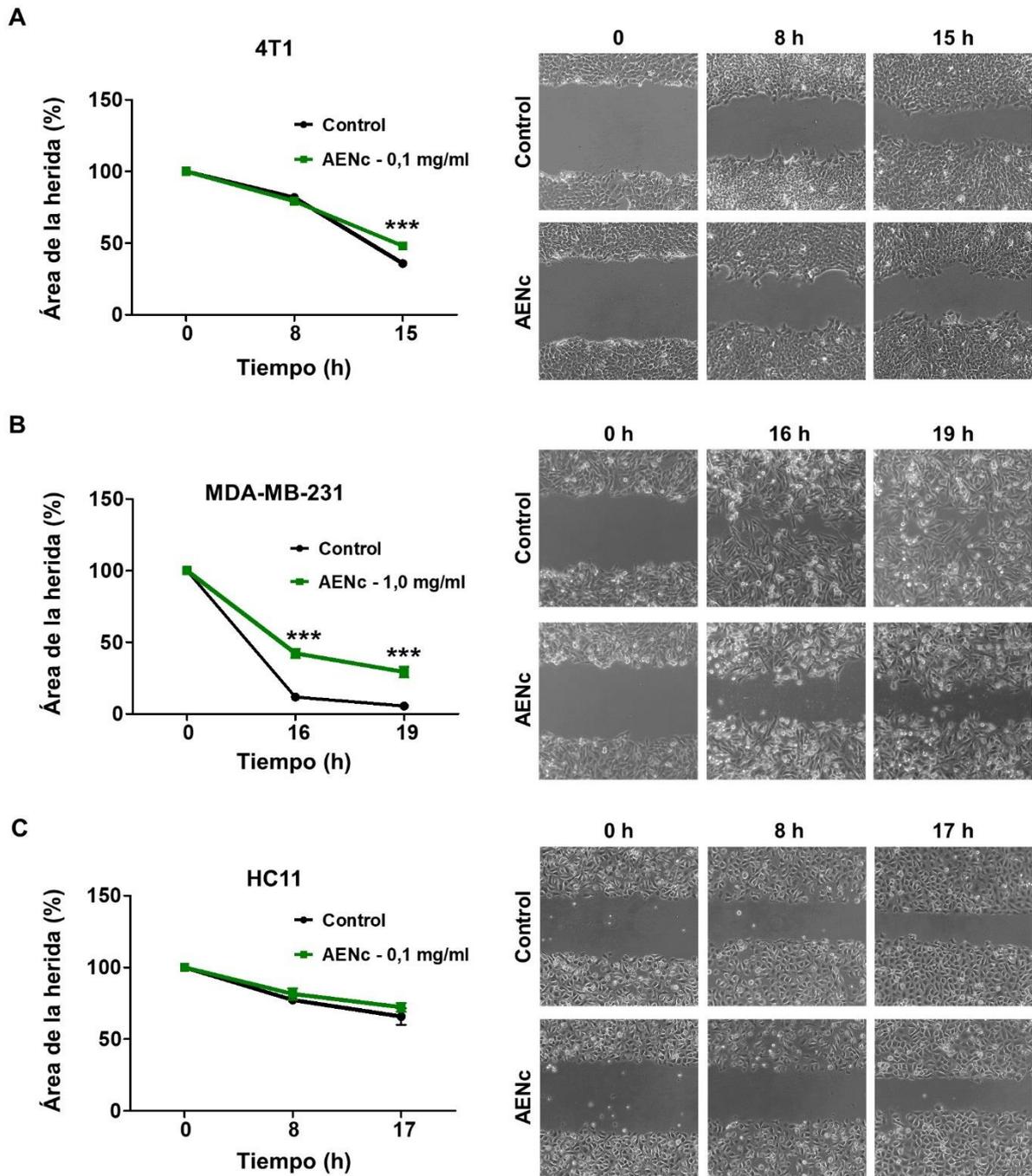


Figura 14. Ensayos de migración en células A) 4T1, B) MDA-MB-231 y C) HC11. Las células fueron expuestas a las concentraciones indicadas de EANc o vehículo. Los resultados se analizaron mediante ANOVA con posterior test de Bonferroni. El gráfico representa la media \pm SEM de tres experimentos independientes. *** $p < 0,001$. Se muestran fotos representativas a los distintos tiempos analizados para cada línea celular estudiada (200x).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El tratamiento del CM consiste en una terapia local que incluye cirugía y radioterapia y/o una terapia sistémica para tratar y/o reducir el riesgo de recurrencia o metástasis del cáncer. Sin embargo, a pesar de los avances en los esquemas de tratamiento, el CMTN sigue siendo un gran desafío debido a sus características particulares. En comparación con los otros subtipos de CM, este subtipo es muy invasivo, metastásico y de pronóstico malo. Las pacientes con CMTN presentan una mayor susceptibilidad de recaídas tempranas, lo que contribuye a una tasa de supervivencia más corta y una tasa de mortalidad del 40 % dentro de los primeros 5 años después del diagnóstico (Ribeiro et al. 2022). Actualmente, su tratamiento se basa en quimioterapia citotóxica con esquemas de medicamentos sintéticos combinados. Sin embargo, la efectividad muchas veces se ve comprometida por el desarrollo de quimiorresistencia, la aparición de metástasis y/o efectos secundarios graves (Yin et al. 2020). En este contexto, la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas para tratar al CMTN es de suma importancia.

A lo largo de la historia, los productos naturales, especialmente los medicamentos de origen vegetal, han desempeñado un papel importante en la prevención y el tratamiento de diversas enfermedades humanas, entre ellas el cáncer. Los fitoquímicos han sido recursos fundamentales en el descubrimiento de fármacos contra el cáncer. En este trabajo de tesis nos centramos en el estudio de las propiedades antitumorales de un conjunto de metabolitos secundarios presentes en un extracto acuoso obtenido a partir de hojas de una especie arbórea nativa de nuestro país: *N. caldenia*. El objetivo principal del trabajo fue investigar mediante ensayos preclínicos el potencial antitumoral del EANc sobre células de CMTN.

La célula va adquiriendo capacidades biológicas distintivas y complementarias, conocidas como sellos o “hallmarks” del cáncer, que le permiten establecer un tumor y diseminarse metastásicamente (Hanahan & Weinberg, 2000 y 2011; Hanahan, 2022). Una de las características distintivas que adquieren las células tumorales es la de mantener su capacidad proliferativa de forma crónica y evadir las señales supresoras del crecimiento y de la apoptosis celular. En consecuencia, modular estos eventos resulta atractivo tanto para el diseño de nuevas terapias como para la evaluación de potenciales agentes antitumorales. Es por ello que, en primera instancia, se caracterizaron los efectos del EANc sobre la viabilidad de las líneas celulares de CMTN 4T1 y MDA-MB-231. También, en virtud de conocer sus efectos sobre células no-malignas, evaluamos su accionar sobre las células mamarias HC11. Los resultados obtenidos permiten concluir que **el EANc presenta actividad antitumoral al disminuir la**

viabilidad de células de las CMTN murinas y humanas. Además, **el EANc posee un accionar diferencial entre células no-malignas y tumorales**, dado que provocó un efecto menor sobre la viabilidad de la línea celular HC11 con respecto al detectado en las células 4T1, ambas de origen murino. Estos resultados resultan interesantes, dado que al momento de emplear un tratamiento oncológico se espera que las células normales se afecten lo menos posible. Es importante destacar que los efectos del EANc sobre la viabilidad de las células se estudiaron por dos métodos colorimétricos distintos (CV y MTT), obteniéndose resultados concordantes entre ellos. Solo registramos diferencias al emplear el EANc a la concentración de 1 mg/ml sobre las células HC11 a las 48 h de tratamiento: los ensayos con la tinción de CV no mostraron diferencias significativas con respecto al control, mientras que con MTT se registró una disminución significativa. Esta diferencia en los resultados obtenidos al tiempo de 48 h podría deberse a diferencias en la sensibilidad entre ambos métodos empleados. Recordemos que el ensayo de MTT evalúa la actividad metabólica celular y en la tinción con CV se mide la biomasa celular adherida y teñida con el colorante a la placa de cultivo.

Otra conclusión que se desprende de este trabajo es que el EANc provoca un efecto sobre la viabilidad celular mayor, cuanto mayor es el tiempo de exposición al mismo. Encontramos diferencias significativas en los porcentajes de reducción de la viabilidad entre 48 y 72 h de tratamiento en las tres líneas celulares evaluadas. En el caso de las células MDA-MB-231 esta diferencia se detectó con las concentraciones de 0,1; 1,0 y 2,5 mg/ml y en las células 4T1 y HC11, con la concentración de 1,0 mg/ml. En el caso de las células murinas, esta relación de concentración-tiempo-respuesta no se registró con la concentración máxima de 2,5 mg/ml en los ensayos colorimétricos con CV, la cual resultó muy citotóxica independientemente del tiempo de exposición al extracto.

Con respecto a la sensibilidad que presentaron las células de CMTN al EANc, si bien ambas líneas celulares respondieron al tratamiento, las células 4T1 resultaron más sensibles que las MDA-MB-231 al comparar la respuesta entre ellas. Esta diferencia podría deberse, además de su origen, a que representan un estadio de enfermedad mamaria distinto. La línea celular 4T1 se generó en la glándula mamaria de un ratón BALB/cfC3H y se corresponde con un CM humano de estadio IV, avanzado (4T1, ATCC CRL-2539). En cambio, la línea celular MDA-MB-231 fue establecida a partir de un derrame pleural que ocurrió en una paciente de 51 años. Es decir, las células MDA-MB-231 provienen de un sitio metastásico, lo cual alude a las

características y capacidades adquiridas distintivas por estas células para llegar al sitio distante (MDA-MB-231, ATCC HTB26).

Para evaluar el mecanismo celular implicado en los efectos antitumorales del EANc, se analizó el ciclo celular de las células tumorales 4T1 y MDA-MB-231. En ambas líneas celulares, el EANc (1 mg/ml, 48 h) provocó efectos similares: un aumento significativo del porcentaje de células en la fase S acompañado de una disminución en el porcentaje de células en la fase G₀/G₁. Es decir, el EANc provoca efectos anti-proliferativos por arresto en fase S del ciclo celular a las 48 h de tratamiento. A continuación, al estudiar los efectos del EANc sobre el ciclo celular a 72 h de tratamiento, detectamos que las células MDA-MB-231 continúan arrestadas en fase S (en menor proporción que a las 48 h) y que, también, el EANc provoca muerte celular. Tras el estudio con la doble marcación IP + AV-FITC, se pudo dilucidar que el tipo de muerte celular implicado es apoptosis. Por lo tanto, se concluye que **el EANc presenta efectos anti-proliferativos en las células de CMTN y pro-apoptóticos en las células MDA-MB-231**. Estos resultados nos invitan a continuar las investigaciones con la profundización de los mecanismos celulares y moleculares por los cuales el EANc reduce la viabilidad de las células de CMTN.

La capacidad de metastatizar es otra de las habilidades adquiridas por las células tumorales. El proceso metastásico o “cascada metastásica” es un proceso activo, continuo, complejo y multiescalonado. Uno de los pasos involucrados es la migración activa de las células tumorales desde su lugar de origen, a través de las matrices extracelulares, hasta alcanzar los vasos sanguíneos y/o linfáticos por los cuales viajarán rumbo a un tejido distante (Pantazi et al. 2020). En función de ello, nos propusimos estudiar, en el tercer objetivo de esta tesis de grado, los efectos del EANc sobre la migración de las células de CMTN y no-malignas. Demostramos que **el EANc presenta efectos anti-migratorios** sobre las células 4T1 y MDA-MB-231. Dicho efecto se obtuvo por empleo del extracto a una concentración de 0,1 mg/ml en las células 4T1 y a 1,0 mg/ml en las células MDA-MB-231. Al contrastar los efectos con las células no-malignas, obtuvimos que el EANc no afecta la migración de las células HC11 a la concentración de 0,1 mg/ml. Esta diferencia en su acción sobre las células tumorales con respecto a las células no-malignas, tanto sobre la viabilidad celular como la migración, son características atractivas para su potencial uso terapéutico. Los estudios se continuarán con la evaluación de los efectos del EANc sobre otros procesos implicados en la metástasis como la adhesión e invasión celular.

En la actualidad, el uso de extractos vegetales en la industria farmacéutica exige que los mismos sean caracterizados para conocer, al menos en parte, su composición y calidad. Para ello, recientemente se realizó una caracterización del EANc mediante cromatografía líquida de alta performance (HPLC). Estos análisis de nuestro grupo de trabajo aún no se encuentran publicados y si bien no forman parte de un objetivo específico de esta tesis, nos parece importante informar que el análisis preliminar de los perfiles cromatográficos indica la presencia de compuestos fenólicos, específicamente, flavonoides y ácidos fenólicos. Estos compuestos también son los encontrados por el grupo de Persia et al. (2020) en el extracto acuoso de hojas de retortuño (especie nativa ex – *Prosopis*) por lo que podemos inferir que la metodología de extracción acuosa empleada enriquece al extracto en dichos metabolitos. Nuestra hipótesis es que los compuestos fenólicos presentes en el EANc serían los responsables de su efecto anti-proliferativo y pro-apoptótico, dado que en la bibliografía existen reportes sobre el accionar de estos compuestos en la proliferación de las células tumorales, al participar en el arresto del ciclo celular e inducción de la muerte por apoptosis (Kopustinskiene et al., 2020; Gupta et al. 2022). Si bien aún es necesario continuar con la caracterización fisicoquímica detallada y la cuantificación de manera exacta de los metabolitos del EANc, existen trabajos científicos que demuestran la actividad antitumoral de algunos de los compuestos presentes en el extracto. Por ejemplo, dentro de la composición del EANc se encontró al flavonol quercetin. Existe evidencia científica sobre la acción de este metabolito en la detención del ciclo celular en la fase S, seguido de apoptosis en células leucémicas y de su menor efecto sobre células no-malignas con respecto a las tumorales (Srivastava et al., 2016). También, el EANc contiene el flavonoide rutin. El grupo de Nouri et al. (2020) demostró que rutin ejerce un efecto antineoplásico en células tumorales mamarias MCF-7 a través de la detención del ciclo celular en la fase S y apoptosis. En cuanto a los ácidos fenólicos, el EANc contiene ácido clorogénico, un metabolito del cual se ha publicado su acción sobre el arresto del ciclo celular en fase S en células de cáncer de colon, sobre la apoptosis (Sadeghi Ekbatan et al. 2018; Zeng et al. 2020) y sobre la supresión de la migración e invasión en células MDA-MB-231 y 4T1, como así también la ausencia de efectos sobre la viabilidad de la línea celular mamaria humana MCF-10A (Zeng et al. 2020). En base a estos antecedentes, los cuales se encuentran en concordancia con los resultados presentados en este trabajo, podemos vincular los efectos obtenidos con el EANc con la presencia de estos principios activos en el mismo.

El presente trabajo resulta atractivo y novedoso al haberse estudiando por primera vez el potencial antitumoral sobre células de CMTN de un extracto acuoso obtenido a partir de

hojas de la especie nativa de nuestro país: *Neltuma caldenia*. Como se mencionó en la introducción, existen antecedentes sobre la actividad antitumoral de las especies *N. laevigata*, *N. juliflora* y *N. glandulosa*, sin embargo, ninguna de ellas es nativa de nuestro país. En los reportes se muestra el efecto citotóxico e inducción de apoptosis de un extracto etanólico de madera de *N. laevigata* en células de cáncer cervical humano (Ibarra-Berumen et al. 2023), el efecto antineoplásico de un extracto metanólico de hojas de *N. juliflora* en células MDA-MB-231 y 4T1 (Utage et al. 2018), y la actividad antitumoral *in vivo* de un extracto etanólico de hojas de *N. glandulosa* en un modelo de carcinoma de ascitis de Ehrlich (Senthil Kumar et al. 2011). En contraste, nuestro trabajo con *N. caldenia* resulta atractivo por varias razones. Por un lado, empleamos solo agua en la obtención del extracto, hecho que presenta ventajas con respecto al uso de solventes orgánicos como metanol o etanol. Estos últimos pueden generar efectos indeseados en los modelos de experimentación tanto preclínicos como clínicos y, además, las extracciones con solventes orgánicos requieren pasos de purificación adicionales que consumen mucho tiempo e influyen en el costo total del proceso. Por ello, para evitar problemas de toxicidad y favorecer al costo del procedimiento y factibilidad de su empleo, realizamos una extracción acuosa de los metabolitos según el protocolo del grupo de Persia et al. (2020); el cual fue reproducido eficientemente. Por otro lado, nuestra investigación aporta evidencia científica novedosa de una potencial opción terapéutica para carcinomas mamarios agresivos como son los CMTN.

BIBLIOGRAFÍA

- Abu Samaan, T. M., Samec, M., Liskova, A., Kubatka, P., & Büsselberg, D. (2019). Paclitaxel's mechanistic and clinical effects on breast cancer. *Biomolecules*, 9(12), 789. <https://doi.org/10.3390/biom9120789>
- Aguilar, D.L., Cosacov, A., Sérsic, A.N., Acosta, M.C. (2023) Aproximaciones a la historia evolutiva de los géneros *Neltuma* y *Strombocarpa* (Fabaceae) en Sudamérica. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 2023. 58(4):12. <https://doi.org/10.31055/1851.2372.v58.n4>
- Carabajal, M. P. A., Perea, M. C., Isla, M. I., & Zampini, I. C. (2020). The use of jarilla native plants in a Diaguita-Calchaquí indigenous community from northwestern Argentina: An ethnobotanical, phytochemical and biological approach. *Journal of ethnopharmacology*, 247, 112258. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112258>
- Cardozo, M. L., Ordoñez, R. M., Zampini, I. C., Cuello, A. S., Dibenedetto, G., & Isla, M. I. (2010). Evaluation of antioxidant capacity, genotoxicity and polyphenol content of non-conventional foods: *Prosopis* flour. *Food Research International*, 43(5), 1505-1510. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.04.004>.
- Chun, K. H., Park, J. H., & Fan, S. (2017). Predicting and overcoming chemotherapeutic resistance in breast cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1026, 59-104. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6020-5_4
- Dussart, E. G., Medina, A., & Bogino, S. M. (2015). Dendroecología en la pampa Argentina: investigaciones actuales, pasadas y futuros desafíos. *Ecosistemas*, 24(2), 51-59. <https://doi.org/10.7818/ECOS.2015.24-2.08>
- Efferth, T., Saeed, M. E. M., Mirghani, E., Alim, A., Yassin, Z., Saeed, E., Khalid, H. E., & Daak, S. (2017). Integration of phytochemicals and phytotherapy into cancer precision medicine. *Oncotarget*, 8(30), 50284–50304. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17466>
- Elbehairi, S. E. I., Ezzat Ahmed, A., Alshati, A. A., Al-Kahtani, M. A., Alfaifi, M. Y., Alsyaad, K. M., Alalmie, A. Y. A., Elimam Ahamed, M. M., Moustafa, M. F., Alhag, S. K., Al-Abd, A. M., & Abbas, A. M. (2020). *Prosopis juliflora* leaf extracts induce cell death of MCF-7, HepG2, and LS-174T cancer cell lines. *EXCLI journal*, 19, 1282–1294. <https://doi.org/10.17179/excli2020-2830>.
- Ferronato, M. J., Obiol, D. J., Alonso, E. N., Guevara, J. A., Grioli, S. M., Mascaró, M., Rivadulla, M. L., Martínez, A., Gómez, G., Fall, Y., Quevedo, M. A., Curino, A. C., & Facchinetti, M. M. (2019). Synthesis of a novel analog of calcitriol and its biological evaluation as antitumor agent. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 185, 118–136. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2018.08.006>
- Ferronato, M. J., Salomón, D. G., Fermento, M. E., Gandini, N. A., López Romero, A., Rivadulla, M. L., Pérez-García, X., Gomez, G., Perez, M., Fall, Y., Facchinetti, M. M., & Curino, A. C. (2015). Vitamin D analogue: Potent antiproliferative effects on cancer cell lines and lack of hypercalcemic activity. *Archiv der Pharmazie*, 348(5), 315-329.

- Giulietti, J. D. (2005). El caldén: Su importancia etnobotánica. Informativo Rural, E.E.A INTA. San Luis, 2(4), 8.
- González-Montemayor, Á.-M., Flores-Gallegos, A. C., Contreras-Esquivel, J.C., Solanilla-Duque, J.-F., & Rodríguez-Herrera, R. (2019). *Prosopis* spp. functional activities and its applications in bakery products. Trends in Food Science & Technology, 94, 12-19. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.09.023>
- Gupta, A., Atanasov, A. G., Li, Y., Kumar, N., & Bishayee, A. (2022). Chlorogenic acid for cancer prevention and therapy: Current status on efficacy and mechanisms of action. Pharmacological Research, 186, 106505. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106505>.
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. Cancer Discovery, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. Cell, 100(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hapon, M.B., Hapon, M.V., Persia, P.A., Pochettino, A., Lucero, G.S., & Gamarra-Luques, C. (2014). Aqueous extract of *Prosopis strombulifera* (LAM) BENTH induces cytotoxic effects against tumor cell lines without systemic alterations in BALB/c mice. Journal of Clinical Toxicology, 4, 222. <http://dx.doi.org/10.4172>; ISSN: 2161-0495. 2014.
- Henciya, S., Seturaman, P., James, A. R., Tsai, Y. H., Nikam, R., Wu, Y. C., Dahms, H. U., & Chang, F. R. (2017). Biopharmaceutical potentials of *Prosopis* spp. (Mimosaceae, Leguminosae). Journal of Food and Drug Analysis, 25(1), 187-196. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.11.001>
- Herranz-López, M., Losada-Echeberría, M., & Barrajón-Catalán, E. (2018). The multitarget activity of natural extracts on cancer: Synergy and xenohormesis. Medicines, 6(1), 6. <https://doi.org/10.3390/medicines6010006>
- Hughes, C. E., Ringelberg, J. J., Lewis, G. P., & Catalano, S. A. (2022). Disintegration of the genus *Prosopis* L. (Leguminosae, Caesalpinioideae, mimosoid clade). PhytoKeys, 205, 147-189. <https://doi.org/10.3897/phytokeys.205.75379>
- Ibarra-Berumen, J., Moreno-Eutimio, M. A., Rosales-Castro, M., & Ordaz-Pichardo, C. (2023). Cytotoxic effect and induction of apoptosis in human cervical cancer cells by a wood extract from *Prosopis laevigata*. Drug and Chemical Toxicology, 46(5), 931-943. <https://doi.org/10.1080/01480545.2022.2109046>
- Instituto De Botánica Darwinion. <http://www.darwin.edu.ar/>. (Último acceso: 15/06/24)
- International Agency for Research on Cancer (IARC). <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/32-argentina-fact-sheets.pdf>. Último acceso: 11/03/24)

- Joseau, M.J., Rodríguez Reartes, S., Frassoni, E. J. (2023). The Legumes of *Neltuma spp.* (ex *Prosopis spp.*) and Their Properties for Human and Animal Food. Progress and Prospects, IntechOpen, Crossref, doi:10.5772/intechopen.110436.
- Keene, M. R., Heslop, I. M., Sabesan, S. S., & Glass, B. D. (2019). Complementary and alternative medicine use in cancer: A systematic review. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 35, 33-47. <https://doi.org/10.1016/j.ctcp.2019.01.004>
- Kopustinskiene, D. M., Jakstas, V., Savickas, A., & Bernatoniene, J. (2020). Flavonoids as anticancer agents. *Nutrients*, 12(2), 457. <https://doi.org/10.3390%2Fnu12020457>
- Kumar, N., Gupta, S., Chand Yadav, T., Pruthi, V., Kumar Varadwaj, P., & Goel, N. (2019). Extrapolation of phenolic compounds as multi-target agents against cancer and inflammation. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 37(9), 2355-2369. <https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1481457>.
- Lachance, J. C., Radhakrishnan, S., Madiwale, G., Guerrier, S., & Vanamala, J. K. P. (2020). Targeting hallmarks of cancer with a food-system-based approach. *Nutrition*, 69, 110563. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2019.110563>
- Marcucci, C., Rademacher, M., Kamecki, F., Pastore, V., Bach, H. G., Ricco, R. A., Wagner, M. L., Knez, D., Gobec, S., Colettis, N., & Marder, M. (2023). Biological Evaluation of *Valeriana* Extracts from Argentina with Potent Cholinesterase Inhibition for the Treatment of Neurodegenerative Disorders and Their Comorbidities-The Case of *Valeriana carnososa* Sm. (Caprifoliaceae) Studied in Mice. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 16(1), 129. <https://doi.org/10.3390/ph16010129>
- Nouri, Z., Fakhri, S., Nouri, K., Wallace, C. E., Farzaei, M. H., & Bishayee, A. (2020). Targeting multiple signaling pathways in cancer: The rutin therapeutic approach. *Cancers (Basel)*, 12(8), 2276. <https://doi.org/10.3390/cancers12082276>
- Ocaña, A., Amir, E., & Pandiella, A. (2020). HER2 heterogeneity and resistance to anti-HER2 antibody-drug conjugates. *Breast Cancer Research*, 22(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s13058-020-1252-7>
- Pantazi, P., Carollo, E., Carter, D. R. F., & Brooks, S. A. (2020). A practical toolkit to study aspects of the metastatic cascade in vitro. *Acta Histochemica*, 122(8), 151654. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2020.151654>
- Persia, F. A., Troncoso, M. E., Rinaldini, E., Simirgiotis, M., Tapia, A., Bórquez, J., Mackern-Oberti, J. P., Hapon, M. B., & Gamarra-Luques, C. (2020). UHPLC-Q/Orbitrap/MS/MS fingerprinting and antitumoral effects of *Prosopis strombulifera* (LAM.) BENTH. queous extract on allograft colorectal and melanoma cancer models. *Heliyon*, 6(2), e03353. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03353>.
- Ribeiro, R., Carvalho, M. J., Gonçalves, J., & Moreira, J. N. (2022). Immunotherapy in triple-negative breast cancer: Insights into tumor immune landscape and therapeutic opportunities. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9, Article 903065. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.903065>

- Sadeghi Ekbatan, S., Li, X. Q., Ghorbani, M., Azadi, B., & Kubow, S. (2018). Chlorogenic Acid and Its Microbial Metabolites Exert Anti-Proliferative Effects, S-Phase Cell-Cycle Arrest and Apoptosis in Human Colon Cancer Caco-2 Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 723. <https://doi.org/10.3390/ijms19030723>
- Senthil Kumar, R., Raj Kapoor, B., Perumal, P., Dhanasekaran, T., Alvin Jose, M., & Jothimanivannan, C. (2011). Antitumor activity of *Prosopis glandulosa* Torr. on Ehrlich Ascites Carcinoma (EAC) tumor bearing mice. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 10(3), 505-510. PMID: PMC3813020.
- Sharma, A., Kaur, M., Katnoria, J. K., & Nagpal, A. K. (2018). Polyphenols in food: Cancer prevention and apoptosis induction. *Current Medicinal Chemistry*, 25(36), 4740-4757. <https://doi.org/10.2174/0929867324666171006144208>
- Srivastava, S., Somasagara, R. R., Hegde, M., Nishana, M., Tadi, S. K., Srivastava, M., Choudhary, B., & Raghavan, S. C. (2016). Quercetin, a natural flavonoid interacts with DNA, arrests cell cycle and causes tumor regression by activating mitochondrial pathway of apoptosis. *Scientific Reports*, 6, 24049. <https://doi.org/10.1038/srep24049>
- Steibel, P. E. (1997). Nombres y usos de las plantas aplicados por los indios Ranqueles de La Pampa (Argentina). *Revista de la Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de La Pampa*, 9(2), 1 – 40.
- Utage, B. G., Patole, M. S., Nagvenkar, P. V., Kamble, S. S., & Gacche, R. N. (2018). Correction: *Prosopis juliflora* (Sw.), DC induces apoptosis and cell cycle arrest in triple negative breast cancer cells: *in vitro* and *in vivo* investigations. *Oncotarget*, 9(68), 33050. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26095>
- Wode, K., Henriksson, R., Sharp, L., Stoltenberg, A., & Hök Nordberg, J. (2019). Cancer patients' use of complementary and alternative medicine in Sweden: A cross-sectional study. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 19(1), 62. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2463-6>
- Yao, H., He, G., Yan, S., Chen, C., Song, L., Rosol, T. J., & Deng, X. (2017). Triple-negative breast cancer: Is there a treatment on the horizon? *Oncotarget*, 8(1), 1913-1924. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12284>
- Yin, L., Duan, J. J., Bian, X. W., & Yu, S. C. (2020). Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Research*, 22(1), Article 61. <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01296-5>.
- Zeng, A., Liang, X., Zhu, S., Liu, C., Wang, S., Zhang, Q., Zhao, J., & Song, L. (2021). Chlorogenic acid induces apoptosis, inhibits metastasis and improves antitumor immunity in breast cancer via the NF- κ B signaling pathway. *Oncology reports*, 45(2), 717–727. <https://doi.org/10.3892/or.2020.7891>
- Zhong, J., Lu, P., Wu, H., Liu, Z., Sharifi-Rad, J., Setzer, W. N., & Suleria, H. A. R. (2022). Current insights into phytochemistry, nutritional, and pharmacological

properties of *Prosopis* plants. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2022, 2218029. <https://doi.org/10.1155/2022/2218029>

- Zhou, Y., Zheng, J., Li, Y., Xu, D. P., Li, S., Chen, Y. M., & Li, H. B. (2016). Natural polyphenols for prevention and treatment of cancer. *Nutrients*, 8(8), 515. <https://doi.org/10.3390/nu8080515>
- Zuloaga, F. O., Belgrano, M. J., & Zanotti, C. A. (2019). Actualización del Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur. *Darwiniana, Nueva Serie*, 7(2), 208–278. <https://doi.org/10.14522/darwiniana.2019.72.861>