



Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Departamento de Botánica

Características físico-químicas y citotóxica frente a la línea celular de
cáncer de mama (MCF-7) de los polisacáridos extraídos de los
digüeños comestibles *Cyttaria berteroi*, *Cyttaria espinosae* y *Cyttaria
harioti* presentes en Chile

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Para optar al título de Bióloga

POR CATALINA SANHUEZA ROJAS.

Directora de tesis Dra. Claudia Pérez Manríquez

Profesor Guía Dr. Fabián Figueroa Rebolledo

Departamento de botánica de Ciencias Naturales y Oceanográficas

Universidad de Concepción

Abril, 2022
Concepción, Chile

HOJA DE FIRMAS

Directora de tesis

Dra. Claudia Pérez Manríquez

Departamento de botánica

Universidad de Concepción

Profesor Guía

Dr. Fabián Figueroa

Departamento de botánica

Universidad de Concepción

Profesores evaluadores

Dr. José Becerra

Departamento de botánica

Universidad de Concepción



AGRADECIMIENTOS

"La enseñanza que deja huella no es la que se hace de cabeza a cabeza, sino de corazón a corazón" Howard G. Hendricks

Con esta frase, es que quisiera partir esta sección, la enseñanza de cada persona comienza desde el hogar, desde que se es muy pequeño, es por ello que primeramente quiero agradecer a mis padres, por otorgarme la oportunidad de continuar estudiando, entregarme esa primera enseñanza, valores que hoy me hacen ser quien soy, darme todo su apoyo estando a la distancia. Agradecer a mi pareja, por sus palabras de aliento, apoyarme en cada cosa que me propongo, por alentarme a siempre ser mejor, por convertirse en mi familia y darme el calor de un hogar, gracias por acompañarme codo a codo en este arduo camino.

Además, quiero agradecer a mi mejor amiga, por las largas tardes/noche de estudio que terminaban siendo una gran degustación gastronómica, gracias por tu apoyo incondicional, por esos días llenos de risas, y de lágrimas también. Asimismo, agradecer a Dios, por guiarme, poner en mi camino a personas que hoy son parte importante de mi vida y por cada oportunidad presentada.

Quiero agradecer también a cada uno de los profesionales que se hicieron presente a lo largo de mi formación académica, quienes aportaron su conocimiento, sus ganas, su interés, para que alumnos como yo nos internáramos en el hermoso mundo de la investigación.

Ahora quiero agradecer a la Dra. Claudia Pérez, por abrirme las puertas y guiarme en este camino internándome en el mundo de la fitoquímica, al Dr. José Becerra, quien siempre estuvo preocupado de preguntar cómo iba todo, y siempre teniendo algún dato que compartir; al Dr. Fabián Figueroa, gracias por tu entrega, dedicación, disposición para ayudar, para contestar cada pregunta, gracias por las risas entregadas para aliviar el estrés que llevaba conmigo, y gracias por compartir tu conocimiento. Conjuntamente, agradecer a Viviana Salazar-Vidal por compartir su experiencia y material respecto a los digüenes.

Al Dr. Gustavo Cabrera de la Unidad de Desarrollo Tecnológico (UDT) por apoyarme en los estudios físicos y químicos. A la Dra. Alisson Astuya por su cooperación con los ensayos de citotoxicidad.

También agradecer al equipo del laboratorio de química de recursos naturales, de la Universidad de Concepción por su contención, cooperación, confianza y apoyo, gracias a todos ustedes por hacer de esta etapa final más amigable.

INDICE GENERAL

Hoja de firmas.....	2
Agradecimientos.....	3
Índice general.....	4
Índice de figuras.....	5
Índice de tablas.....	6
Resumen.....	7
Abstract.....	8
Introducción.....	9
¿Qué es el cáncer?.....	12
Tratamientos convencionales contra el cáncer.....	12
Uso de compuestos de origen natural.....	14
Hongos: una fuente de compuestos bioactivos.....	15
El género <i>Cyttaria</i>	17
Hipótesis.....	20
Objetivo general.....	20
Objetivos específicos.....	20
Materiales y métodos.....	21
Recolección de muestras.....	21
Identificación del material biológico.....	21
Extracción de los polisacáridos.....	21
Purificación de los polisacáridos.....	22
Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier.....	23
Análisis termogravimétrico (TGA).....	24
Ensayos antioxidantes.....	24
Ensayo radical DPPH.....	24
Ensayo radical ABTS ⁺	25
Ensayo citotoxicidad.....	25

Análisis estadístico.....	26
Resultados.....	26
Discusión.....	35
Conclusión.....	39
Literatura utilizada.....	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Gráfico del porcentaje de incidencia (nuevos casos) de cáncer en hombres a nivel mundial (Globocan, 2020).....	10
Figura 2: Gráfico del porcentaje de incidencia (nuevos casos) de cáncer en mujeres a nivel mundial (Globocan, 2020).....	10
Figura 3: Gráfico de incidencia (nuevos casos) de Cáncer en hombres de Chile. Fuente (Globocan, 2020).	11
Figura 4: Gráfico de incidencia (nuevos casos) de Cáncer en mujeres de Chile. Fuente (Globocan, 2020).....	11
Figura 5: A) <i>Trametes versicolor</i> (<i>Coriolus versicolor</i>) B) Estructura química del compuesto PSK krestin, extraído de <i>Trametes versicolor</i> . C) <i>Lentinula edodes</i> sobre tronco. D) Estructura química del compuesto extraído de <i>Lentinula edodes</i> , Lentinan. (Sánchez, 2012; Pandya et al., 2018).....	17
Figura 6: A) <i>Cyttaria berteroi</i> sobre rama de <i>N. obliqua</i> . B) <i>Cyttaria harioti</i> sobre <i>N. dombeyi</i> . C) <i>Cyttaria espinosae</i> sobre rama de <i>N. obliqua</i> . (Salazar Vidal, 2020; Salazar-Vidal et al., 2020).....	19
Figura 7: Esquema para la extracción y purificación de los polisacáridos de los hongos <i>Cyttaria berteroi</i> , <i>Cyttaria espinosae</i> y <i>Cyttaria harioti</i>	23
Figura 8: Espectros FTIR de polisacáridos PsC y PsP obtenidos de <i>Cyttaria berteroi</i>	27
Figura 9: Espectros FTIR de polisacáridos (PsC y PsP) obtenidos de <i>Cyttaria espinosae</i>	28
Figura 10: Espectros FTIR de polisacáridos PsC y PsP obtenidos de <i>Cyttaria harioti</i>	29
Figura 11. Efecto de los polisacáridos crudos (PsC) y purificados (PsP) de <i>Cyttaria berteroi</i> en la línea celular de mamas (MCF-7).....	32

Figura 12. Efecto de los polisacáridos crudos (PsC) y purificados (PsP) de *Cyttaria espinosae*33

Figura 13. Efecto de los polisacáridos crudos (PsC) y purificados (PsP) de *Cyttaria hariatii* en la línea celular de mamas (MCF-7).....34

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Rendimiento de los polisacáridos totales (%) de las especies de *Cyttaria berteroi*, *Cyttaria espinosae* y *Cyttaria hariatii*, a partir de 100 gr.....26

Tabla 2: Porcentaje de pérdida de masa por proceso de purificación de los polisacáridos de las especies de *Cyttaria*.....26

Tabla 3: Análisis termogravimétrico de los PsC y PsP de las especies de *Cyttaria*.....30

Tabla 4: Análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, donde se evalúa el efecto de la concentración de polisacárido y el tipo de polisacárido (PsC y PsP) frente la línea celular de mamas (MCF-7) de *Cyttaria berteroi*.....32

Tabla 5: Análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, donde se evalúa el efecto de la concentración de polisacárido y el tipo de polisacárido (PsC y PsP) frente la línea celular de mamas (MCF-7) de *Cyttaria espinosae*.....33

Tabla 6: Análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, donde se evalúa el efecto de la concentración de polisacárido y el tipo de polisacárido (PsC y PsP) frente la línea celular de mamas (MCF-7) de *Cyttaria hariatii*.....34

RESUMEN

El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo, siendo precedido por las enfermedades cardiovasculares, a nivel mundial la incidencia de este grupo de enfermedades ha ido en aumento; los tratamientos existentes no siempre son los adecuados y suelen generar una diversidad de efectos secundarios. Es por ello, que existe la necesidad de buscar nuevas alternativas que sean menos nocivas y/o ayuden a contrarrestar los efectos adquiridos. Los productos naturales son una alternativa que ha ido adquiriendo fuerza luego del descubrimiento de la penicilina y la serie de medicamentos extraídos de plantas y hongos. Los polisacáridos de hongos se han convertido en compuestos de gran interés para la ciencia, puesto que se ha descubierto que poseen propiedades bioactivas. En Chile, existe una variedad de hongos comestibles. En el presente estudio se trabajó con el género *Cyttaria*, hongos parásitos asociados a árboles del género *Nothofagus*, se estudiaron los polisacáridos de las tres especies más consumidas, *Cyttaria berteroi*, *Cyttaria espinosae* y *Cyttaria harioti*. En este estudio proponemos que las especies comestibles de digüeños *Cyttaria berteroi*, *Cyttaria espinosae* y *Cyttaria harioti* presentan polisacáridos con actividad citotóxica diferenciada dada sus características físico-químicas. Para tal efecto, se estudiarán las características químicas, físicas, actividad oxidante y citotóxica frente la línea celular de cáncer de mamas (MCF-7). Los polisacáridos de las *Cyttarias* estudiadas reportaron contener enlaces β -glucanos y ácidos urónicos en su composición química. Al mismo tiempo, los polisacáridos purificados reportaron una mayor actividad citotóxica en la línea tumoral de mama (MCF-7). *Cyttaria berteroi* es la especie que reportó resultados más prometedores, es importante continuar investigando respecto a sus polisacáridos, conocer su estructura, su bioactividad frente otras líneas tumorales, y su mecanismo de acción.

Palabras claves: Cáncer, *Cyttaria*, polisacáridos, hongo.

ABSTRACT

Cancer is the second cause of death, preceded by cardiovascular diseases worldwide. The incidence of this group of diseases has been increasing; Existing treatments are not always adequate and usually generate a variety of side effects, so there is a need to look for new alternatives that are less harmful and help counteract the acquired effects. Natural products are an alternative that has been gaining strength after discovering penicillin and the series of medicines extracted from plants and fungi. Fungal polysaccharides have become compounds of great interest to science since they have been found to possess bioactive properties. In Chile, there is a variety of edible mushrooms. In the present study, we will work with *Cyttaria*, parasitic fungi associated with trees of the genus *Nothofagus*. The polysaccharides of the three most consumed species, *Cyttaria berteroi*, *Cyttaria espinosae* and *Cyttaria harioti*, will be studied. In this study we propose that the edible digene species *Cyttaria berteroi*, *Cyttaria espinosae* and *Cyttaria harioti* present polysaccharides with differentiated cytotoxic activity given their physicochemical characteristics. Its chemical characteristics, oxidant activity, and cytotoxic activity against the breast cancer cell line (MCF-7) will be studied. The polysaccharides of the studied *Cyttarias* reported to contain β -glucan linkages and uronic acids in their chemical composition. At the same time, the purified polysaccharides reported higher cytotoxic activity in the breast tumor line (MCF-7). *Cyttaria berteroi* is the species that reported the most promising results; it is important to continue investigating its polysaccharides, to know their structure, their bioactivity against other tumor lines, and their mechanism of action.

Keywords: Cancer, *Cyttaria*, polysaccharides, fungus.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, el cáncer es la segunda causa de muerte, después de las enfermedades cardiovasculares. De acuerdo con datos reportados por el Observatorio Global del Cáncer, para el año 2020 se reportaron 19.292.789 nuevos casos, siendo los hombres los que presentan el mayor número de incidencia con 10.065.305 casos en que los cinco principales son cáncer de pulmón (14.3%), próstata (14.1%), colorrectal (10.6%), estómago (7.1%) e hígado (6.3%) (Figura 1). En el caso de las mujeres se reportaron 9.227.484 nuevos casos a nivel mundial, en donde los cánceres más comunes son: mamas (24.5%), colorrectal (9.4%), pulmón (8.4%), cuello uterino (6.5%) y tiroides (4.9%) (Figura 2). Con una mortalidad total de 9.958.133 (Globocan, 2020).

En Chile la situación no es muy distinta, durante el año 2020 fueron reportadas 28.584 muertes atribuibles al cáncer, aumentando en un 12% respecto al año 2018 (Parra-Soto et al., 2020). Los nuevos casos alcanzaron un total de 54.227 siendo 28.779 hombres, perteneciendo el 28.3% al cáncer de próstata, 10.8% al de colorrectal, 9.7% al estómago, 8% al de pulmón y 5% al de hígado (Figura 3). En las mujeres, el número de nuevos casos informados fueron 25.448 del cual 20.9% pertenece a cáncer de mamas, 12.2% colorrectal, 6.6% pulmón, 5.9% cuello uterino y 5.6% estómago (Figura 4) (Globocan, 2020).

Sin embargo, entre el 30% y el 50% de estas enfermedades se pueden evitar. Los datos expuestos anteriormente demuestran que es necesario reducir los factores de riesgos y aplicar nuevas estrategias preventivas con base científica, para así poder ofrecer una estrategia a largo plazo más rentable para el control del cáncer (OMS, 2022).

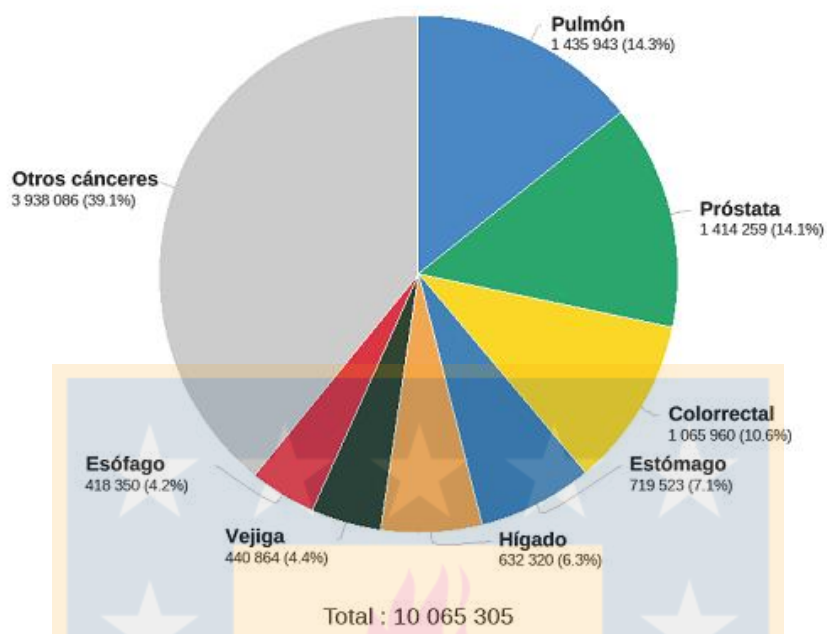


Figura 1: Gráfico del porcentaje de incidencia (nuevos casos) de cáncer en hombres a nivel mundial (Globocan, 2020)

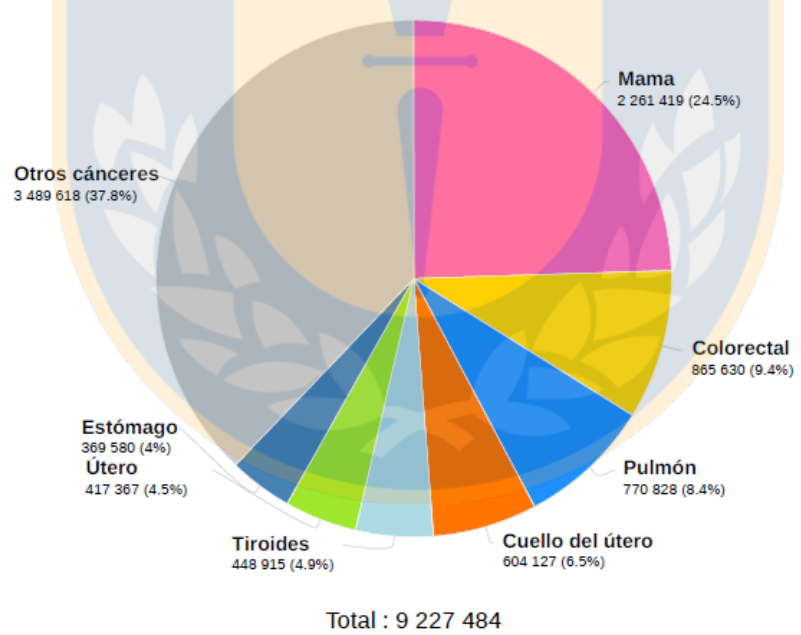


Figura 2: Gráfico del porcentaje de incidencia (nuevos casos) de cáncer en mujeres a nivel mundial (Globocan, 2020).

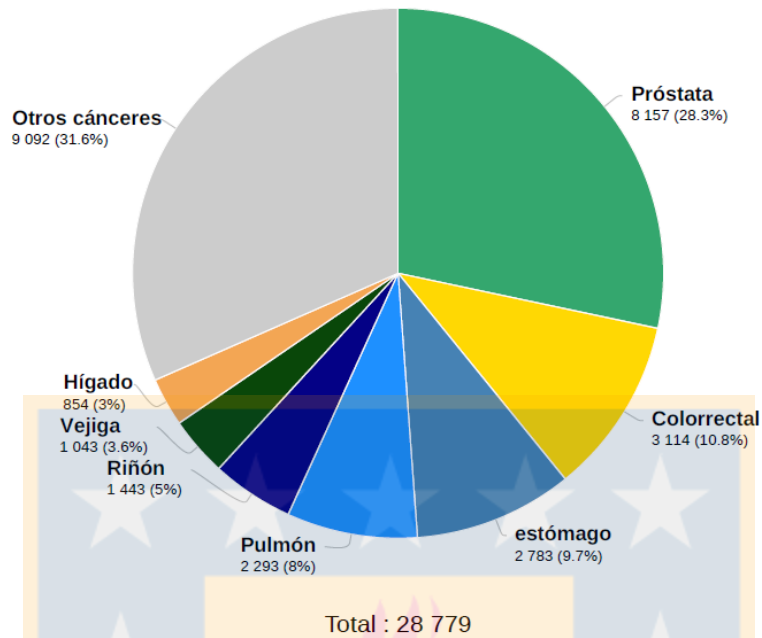


Figura 3: Gráfico de incidencia (nuevos casos) de Cáncer en hombres de Chile. Fuente (Globocan, 2020).

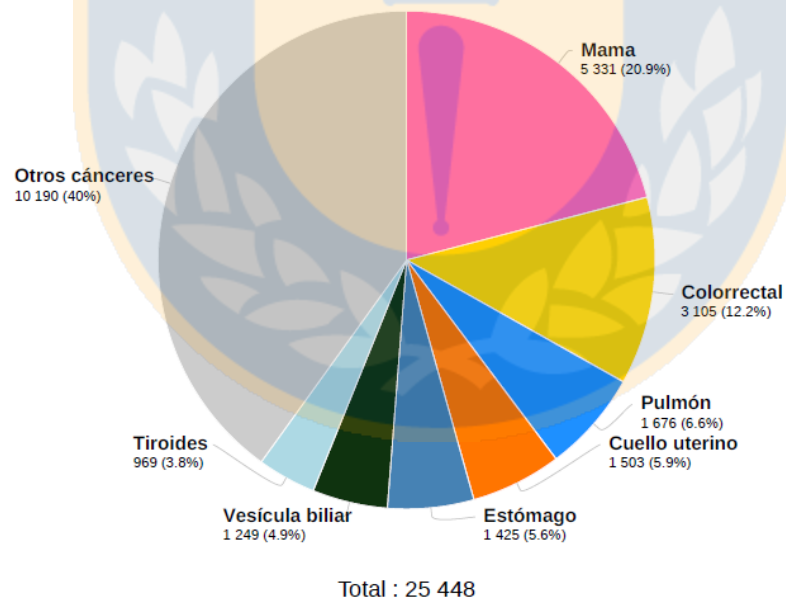


Figura 4: Gráfico de incidencia (nuevos casos) de Cáncer en mujeres de Chile. Fuente (Globocan, 2020).

¿QUÉ ES EL CÁNCER?

Cáncer es el nombre que se da a un conjunto de enfermedades relacionadas a una alteración en la proliferación celular (INC, 2021). En la alteración de estas células y la proliferación de estas mismas se genera una acumulación anormal de células a las que se denominan tumor. Por definición, un tumor es un tejido anormal, éste puede ser benigno o maligno, los tumores benignos en ocasiones crecen considerablemente pero no se diseminan; en cambio, un tumor maligno es canceroso y suele diseminarse hacia otros tejidos, esto lo hacen a través de la sangre y/o el sistema linfático (American Cancer Society, 2020). Este proceso se denomina metástasis, la cual es un proceso que incluye diversas etapas, que incluyen acontecimientos como (1) las células pierden todo contacto de interacción célula-célula, (2) movimiento de las células tumorales que les permite el traspaso al torrente sanguíneo y/o linfático, (3) desarrollo de la capacidad de supervivencia en estos sistemas, (4) desplazamiento del torrente sanguíneo hacia algún órgano, (5) establecer células tumorales en aquel órgano lejos del tejido original (Arvelo et al., 2016)

En el proceso normal de la célula hay diversos eventos por los cuales la célula crece y se divide componiendo una nueva generación de células hijas y así suplir las necesidades para lo que son requeridas (Weinberg, 1996). Las células cumplen un proceso mitótico para su división, en donde el ADN se duplica para generar una copia idéntica. El ADN está distribuido en genes los cuales a su vez están compuestos de nucleótidos, que a partir de la expresión génica darán origen a las proteínas y así ésta cumplir una determinada función (Urry et al., 2017)

Los genes a cargo del funcionamiento normal de la división celular y encargados del crecimiento celular son los proto-oncogenes, cuando en algún sector del gen cabe una mutación, este proto-oncogen se convierte en un oncogén que se convierte en cancerígeno impulsando de esta forma la multiplicación excesiva (Weinberg, 1996). Para el desarrollo del cáncer existen dos genes que tienen relevancia; el primero de estos son los genes promotores del crecimiento; las mutaciones en los proto-oncogenes deriva a que éstos produzcan una cantidad excesiva de la proteína estimuladora del crecimiento. Por otra parte, están los genes supresores de tumores, como su nombre lo dice, inhibe el crecimiento celular, sin embargo, estos genes también pueden sufrir mutaciones desembocando una inhibición de la producción de esta proteína contribuyendo de esta manera al desarrollo del cáncer (Weinberg, 1996).

TRATAMIENTOS CONVENCIONALES CONTRA EL CÁNCER

Actualmente los tratamientos convencionales para combatir los distintos cánceres son: radioterapia, terapia a base de rayos (X, gamma, electrones o protones) provocando daño o eliminación de las células cancerosas, si bien es cierto es una terapia localizada, podría dañar células normales que se encuentren cerca de la zona de radiación; la quimioterapia, es un tratamiento a base de medicamentos indicados según el tipo de cáncer, además puede ser administrado vía oral, vía intravenosa o

ambas a la vez; la cirugía, es otro método, consiste en la extirpación del tumor. Los tratamientos anteriormente mencionados son los métodos más utilizados. Estos procedimientos se pueden indicar independientes o en conjunto (al menos dos), dependiendo el tipo de cáncer, etapa y/u otras enfermedades asociadas (2020 Palacios-Espinosa & Vargas-Sterling, 2012; American Cancer Society).

Además de los tratamientos mencionados anteriormente existen métodos menos conocidos como lo son: la terapia dirigida, la cual consiste en indicar medicamentos que afectan directamente a las células cancerosas, siendo así menos invasiva respecto a las mencionadas anteriormente; la inmunoterapia, que consiste en aumentar el sistema inmunitario a partir de dos opciones i) estimular y/o reforzar el sistema inmune naturalmente para que este pueda atacar con más fuerza a las células cancerosas; ii) mediante medicamentos con sustancias similares al sistema inmune que funcionen para mejorar la forma en la que se arremete a las células (American Cancer Society, 2020).

Del mismo modo, se utiliza la terapia a base de células madre, la cual reforzará la cantidad de células sanguíneas, dentro de ellas los glóbulos blancos; para conseguir las células madres se tiene 3 opciones, extraer directamente medula ósea, potenciar las células madres en el torrente sanguíneo o extraerlas desde el cordón umbilical, de esta última solo es posible durante el embarazo o bien post parto, para la primeras dos mencionadas las extracciones pueden ser tanto del paciente como de amigos y/o familiares (American Cancer Society, 2020). Finalmente, la terapia hormonal es llamada también un tratamiento sistémico puesto que, se administran medicamentos los cuales recorren todo el cuerpo para encontrar y atacar la hormona y así evitar que i) la hormona se una a las células cancerosas, ii) evitar su correcto funcionamiento, iii) evitar que el cuerpo produzca la hormona en cuestión. Cabe destacar que cada tratamiento no funciona de igual manera en todos los tipos de cánceres (American Cancer Society, 2020).

Todas las terapias están asociadas a efectos secundarios tan conocidos como las náuseas, vómitos, pérdida del cabello, disminución del peso, anemia, entre otros (Palacios-Espinosa & Vargas-Sterling, 2012) Sin embargo, existen otros tipos de efectos secundarios que se desarrollan a largo plazo, como la osteonecrosis maxilar (Espinoza & Lamura, 2020) afecciones a la piel donde esta se convierte de seca a escamosa e incluso provocando erupciones (Fuenmayor et al., 2013). También se han mencionado en estudios que los tratamientos de radiación y quimioterapia está asociado con problemas nefróticos (nefropatías, lesiones glomerulares) (de Francisco et al., 2019), además de consecuencias cardíacas (Yera et al., 2018).

La mayoría de los efectos adversos que provocan estos tipos de tratamiento, se pueden contrarrestar con otros medicamentos (Fuenmayor et al., 2013). Sin embargo,

esto afecta de gran manera el estado físico y mental de los pacientes tratados (Palacios-Espinosa & Vargas-Sterling, 2012). Es a partir de estos antecedentes que es necesario encontrar nuevos métodos para tratar tanto el desarrollo del cáncer como los efectos secundarios que los tratamientos convencionales provoca, para esto, una opción que ha tomado fuerza los últimos años es encontrar nuevas alternativas de medicamentos a partir de productos naturales.

USO DE COMPUESTOS DE ORIGEN NATURAL

Desde la antigüedad, las grandes civilizaciones han utilizado las plantas como alimento, también con propósitos medicinales. El primer registro de la utilización de plantas para el beneficio humano se encontró en unas tablas provenientes de alguna civilización que habitó en Sumeria hace aproximadamente 4000 años a.c (Vetvicka et al., 2021). De entre estas civilizaciones se puede mencionar a la cultura celta, para ellos la naturaleza era sagrada, era la forma de manifestación de las fuerzas divinas, veneraban a árboles, animales y plantas por igual (Centelles Josep & Imperial Santiago. 2010). En la cultura celta, el tejo (género *Taxus*) era un árbol utilizado por sus toxinas, empleado para los sacrificios, envenenar las flechas para las batallas, sin embargo, también lo consideraban para la inmortalidad (Centelles & Imperial, 2010).

Desde hace unos 200 años, que el primer compuesto farmacológico usado frecuentemente en medicina como analgésico fue obtenido desde una planta, la amapola, desde donde se obtiene la morfina (Benzie & Sissi Wachtel-Galor, 2011). Este descubrimiento llevo a concluir que los compuestos de las plantas se podían purificar y administrar en dosis precisas. Desde entonces, que el desarrollo de drogas químicamente sintéticas ha sido la forma de cuidar y tratar las enfermedades, sin embargo, existe una gran parte de los países en desarrollo que aún utilizan la medicina tradicional y natural para su cuidado (Benzie & Sissi Wachtel-Galor, 2011).

Hacia fines de la década del 60 principio de los 70, científicos norteamericanos comenzaron a estudiar un grupo de plantas para la identificación de nuevos compuestos antitumorales, de entre ellos el tejo (*Taxus brevifolia*). A partir de esta especie extrajeron el paclitaxel, un agente antitumoral que se emplea para el tratamiento de algunos tipos de cáncer (principalmente cáncer de mamas y en combinación con otro compuesto constituye la quimioterapia para el cáncer de ovarios) por su capacidad de inhibir la multiplicación de las células tumorales (Centelles & Imperial, 2010).

Hongos: una fuente de compuestos con actividad biológica

No solo las plantas han sido de importancia medicinal, sino que también los hongos. En la actualidad, se considera que existen entre 5 y 7 reinos dependiendo de la clasificación que se utilice, sin embargo, hasta antes de 1969 los hongos y las plantas eran considerados en un mismo grupo, hasta que el ecólogo Richard Whittaker en 1969 propuso que los hongos debían poseer su propio reino, puesto que, existían demasiadas diferencias e incongruencias con las plantas como para reunirlos en un solo grupo (Whittaker, 1969).

Los hongos son organismos que se caracterizan por presentar agradables aromas y sabores. Además, han ayudado en la salud humana por sus aportes nutricionales, como proteínas, fibras, minerales e incluso en algunos casos antioxidantes (Wang et al., 2017). Los hongos también contienen propiedades bioactivas provenientes de sus polisacáridos, terpenos, lectinas, lactonas y alcaloides (Wang et al., 2017).

Posteriormente al descubrimiento de la penicilina, comenzó una tendencia de utilizar fuentes naturales de origen vegetal y microorganismos (hongos y bacterias) para la producción de nuevos fármacos comerciales (Benzie & Sissi Wachtel-Galor, 2011). Algunos ejemplos de esto son: estimulantes cardiacos como la digoxina aislados desde *Digitalis purpurea*, el ácido salicílico derivado de la corteza del sauce (*Salix sp*), reserpina, un antiespasmódico y antihipertensivo extraído desde *Rauwolfia sp*, agentes reductores de lípidos como la lovastatina que proviene desde el hongo *Aspergillus terreus*, antibióticos tales como la penicilina y eritromicina extraídos desde *Penicillium notatum* y *Streptomyces erythraeus* respectivamente, todos estos y más con gran relevancia médica en el tratamiento de enfermedades que afectan a millones de personas (Benzie & Sissi Wachtel-Galor, 2011).

Los hongos, presentan una pared celular que posee una estructura que le otorga gran plasticidad, esta pared celular está compuesta por tres principales estructuras, a diferencia de las plantas que presentan una pared compuesta principalmente de glucosa, la pared de los hongos está compuesta principalmente por polisacáridos y proteínas, de entre los polisacáridos se destaca la quitina, las glicoproteínas y el glucano (Pontón, 2008).

Al ser ricos en polisacáridos se han transformado en interés farmacológico. Uno de los polisacáridos que ha captado la atención de diversos investigadores son los de tipo β - glucanos, los cuales son conocidos por ser ampliamente bioactivos (Kaur et al., 2020). Los β glucanos presentan estructuras formadas por enlaces β (1 – 3) (1 - 4) y β (1 – 6), compuestos por unidades monoméricas de β – D- glucosa, sin embargo,

también forman heteroglicanos que involucran monosacáridos como arabinosa, manosa, fucosa, galactosa, xilosa etc. Se unen a los residuos de proteínas como complejos PSP (polisacáridos-proteína) (Pandya et al., 2018).

La disposición en la que se presenten sus enlaces, la longitud de la cadena principal y/o la ramificación de esta interferirá en el peso molecular y propiedades bioactivas asociadas (Kaur et al., 2020). Cabe destacar que los β -glucanos no se expresan en las células animales, sin embargo, éstas si son capaces de reconocerlos, los monocitos, macrófagos alveolares y neutrófilos humanos poseen un receptor para los β -glucanos existiendo una especificidad para los ligandos de β -glucanos 1-3 y/o 1-6 (Abel & Czop, 1992; Hofer & Pospíšil, 2011).

Se ha descrito que los β -glucano no activan directamente a los leucocitos en el organismo, sino que lo hacen a partir de los receptores captadores de monocitos/macrófagos, TLR4 (proteína transmembrana localizada en células mieloides), CR3 (receptor de células fagocíticas), CD14 (receptor células mieloides), dectina-1 (Receptor de lectina con mayor afinidad a los β -glucanos), entre otros. Los β -glucanos mejoran la actividad microbicida de los neutrófilos y macrófagos, además de preparar los leucocitos para una mayor respuesta (Schepetkin & Quinn, 2006).

La importancia de estos receptores junto a los β -glucanos para el organismo humano, es que promueven la producción de glóbulos blancos y la capacidad de aumentar la hematopoyesis tanto en la médula ósea como en el bazo. Debido a que los β -glucanos promueven la estimulación de monocitos (y, además) provocan que se desencadene la transcripción de TNF- α e interleucina 1, esto es lo que los lleva a ser un agente activo de interés (Williams et al., 1988; Schepetkin & Quinn, 2006; Hofer & Pospíšil, 2011).

Algunos polisacáridos comerciales son lentinan, un polisacárido proveniente del hongo Shiitake (Figura 5) (*Lentinula edodes*), es un polisacárido de β (1-3) y β (1-6) que resultó ser un gran agente antitumoral e inmunomodulador, este compuesto actúa a través de la producción de citoquinas a partir de inmunocitos (Zhang et al., 2001). Por otra parte, se utilizan comercialmente los polisacáridos PSK (krestin) extraídos de *Trametes versicolor* o *Coriolus versicolor* (Figura 5), es un complejo que presenta conformación β -glucano (1-4) con cadenas laterales (1-6) β -glucopiranosídico por cada unidad de glucosa (Pandya et al., 2018). Schizophyllan es otro polisacárido de conformación β -glucano (1-3) que tiene unido un grupo β glucopiranosídico unido por un enlace β (1-6) (Pandya et al., 2018). Todos los compuestos mencionados, actúan estimulando el sistema inmune, ya sea a partir de la producción de citoquinas donde se incluyen las interleucinas (IL), factores de necrosis tumoral (TNF), interferones (IFN) lo cual conlleva a que estos compuestos sean utilizados para contrarrestar los

efectos inmunopresores de los tratamientos contra el cáncer (Filella et al., 2002; Cui & Chisti, 2003).

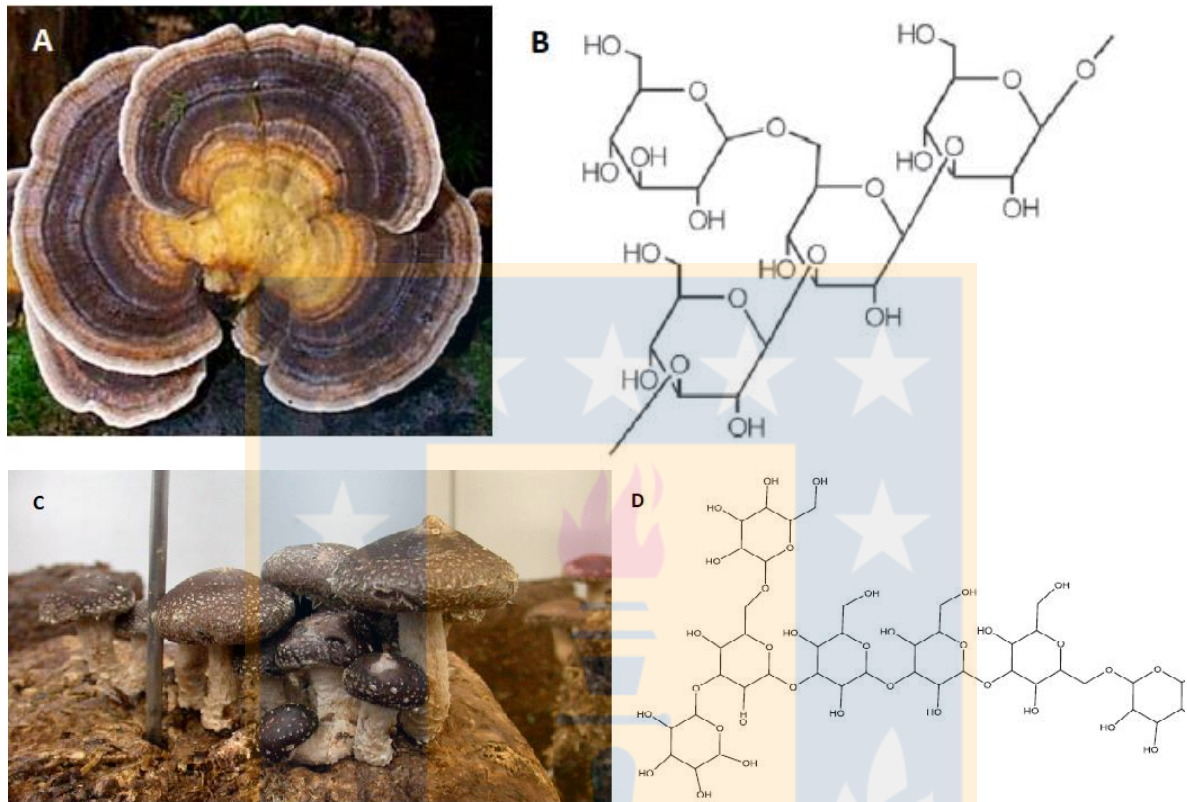


Figura 5: A) *Trametes versicolor* (*Coriolus versicolor*) B) Estructura química del compuesto PSK krestin, extraído de *Trametes versicolor*. C) *Lentinula edodes* sobre tronco. D) Estructura química del compuesto extraído de *Lentinula edodes*, Lentinan. (Sánchez, 2012; Pandya et al., 2018).

EL GÉNERO *CYTTARIA*

El género *Cyttaria* está representado por 11 especies a nivel mundial existiendo 7 especies en Sudamérica y 4 en Nueva Zelanda y Australia. Estas especies son parásitas exclusivas de los *Nothofagus*, los cuales para protegerse de esta infección engloban al hongo en una especie de tumor. Los cuerpos fructíferos se denominan estromas, siendo su principal característica común su forma globosa. En Chile y Argentina se distribuyen 7 especies que comparten, estas son: *Cyttaria exigua*, *C. hookeri*, *C. johowii*, *C. darwinii*, *C. harioti*, *C. espinosae* y *C. berteroi*. Estas tres últimas especies son las más consumidas en Chile. (Salazar Vidal, 2020)

Cyttaria berteroi es el más grande del género midiendo un diámetro de 2.5 a 12 centímetros, conocido vulgarmente como pinatra, son irregularmente globosos, turbinados, y gelatinosos, son de color amarillento a anaranjado (Figura 6). Su fructificación se da entre septiembre y noviembre, su distribución va desde Valparaíso a los lagos. Se puede encontrar asociado a *N. glauca* (Hualo), *N. obliqua*, *N. macrocarpa* (Roble de Santiago). (Peterson & Pfister, 2010; Salazar Vidal, 2020)

Cyttaria espinosae conocido simplemente como digüeñe, presenta fructificaciones entre los meses de septiembre y noviembre (Figura 6). Sus características estromales son que alcanzan un diámetro de 1-5 a 5 centímetros de diámetro, son carnosos, globosos y emergen en tumores esféricos. El color de los estromas es anaranjado-ocráceo una vez maduros. Su distribución es entre Valparaíso y los lagos. Esta especie se puede encontrar asociados a *N. glauca* (Hualo), *N. obliqua* (Roble) *N. dombeyi* (Coihue), *N. macrocarpa* (Roble de Santiago), *N. alpina* (Raulí). (Peterson & Pfister, 2010; Salazar Vidal, 2020)

Cyttaria hariatii conocido vulgarmente como Llao Llao o digüeñe del coihue posee estromas de 2 a 4.5 centímetros de diámetro, son subglobosos y su base se torna cónica, de color amarillo-anaranjado y amarillos- ambarinos cuando están maduros (Figura 6). Estos estromas emergen a partir de un tumor esférico. La fructificación de *C. hariatii* se presenta entre noviembre y enero y su distribución es desde la región del Maule hasta la Patagonia. Las especies a las que está asociado son: *Nothofagus antarctica* (Ñirre), *N. belutoides* (Coihue de Magallanes), *N. dombeyi* (Coihue), *N. nítida* (Coihue de Chiloé) y *N. pumilio* (Lenga) (Peterson & Pfister, 2010; Salazar Vidal, 2020).

El género *Cyttaria*, ha sido poco estudiada, su simbiosis con *Nothofagus* como sus propiedades nutricionales y bioactivas. En Chile, de las 7 especies descritas, *Cyttaria hariatii* es la especie más estudiada, entre 1975 y 1984 se describieron dos importantes polisacáridos que presentan una conformación α -glucano y otro (1-3) β -glucano con ramificaciones (1-6) β -glucano, este segundo polisacárido tiene importancia clínica como ya se ha mencionado antes, puesto que, presentan función citotóxica (Fernández Cirelli & de Lederkremer, 1976; Oliva et al., 1985). Estudios recientes realizados por Salazar- Vidal et al. (2020), evidenciaron que los polisacáridos extraídos de *C. berteroi* y *C. hariatii* poseen actividad citotóxica en las líneas celulares de cáncer de colon (HCT-116), leucemia (U-937) y cáncer de mama (MCF-7). Desde el punto de su potencial nutricional, se reportó que las especies de *Cyttaria berteroi* y *Cyttaria hariatii* poseen un alto contenido de proteínas y de aminoácidos, sin embargo, la actividad antioxidante no resultó significativa. Un factor, importante de mencionar es que dependiendo del método de extracción y/o purificación de los compuestos a estudiar, es la proporción y aplicación que tendrán (Zhang et al., 2015). A partir de los antecedentes mencionados, proponemos que las especies comestibles de digüeñes *Cyttaria berteroi*, *Cyttaria espinosae* y *Cyttaria*

harioti presentan polisacáridos con actividad citotóxica diferenciada dada sus características físico-químicas



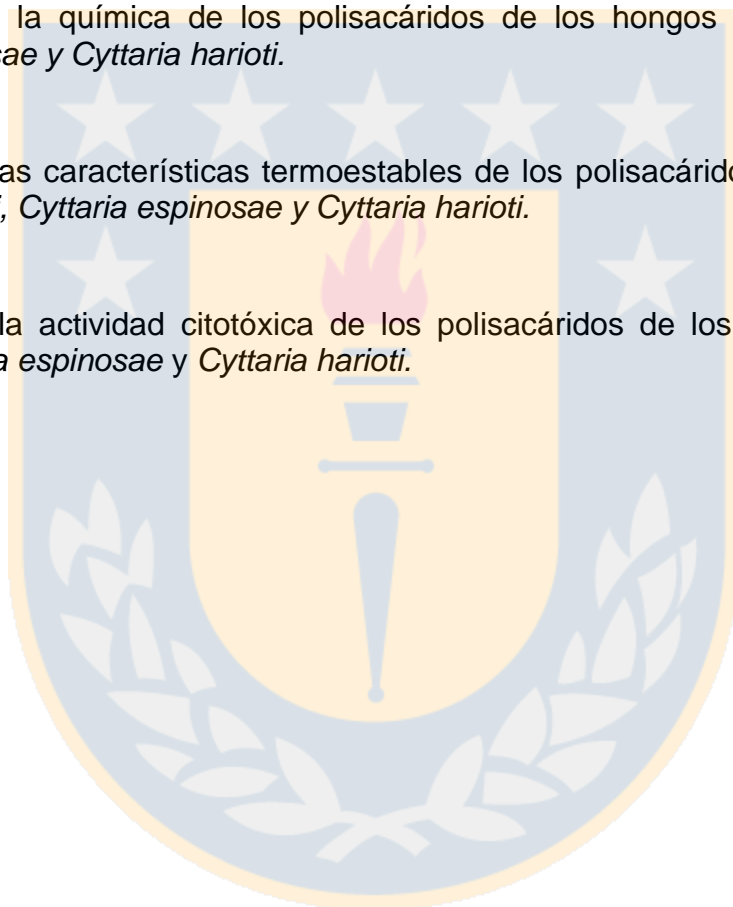
Figura 6: A) *Cyttaria berteroi* sobre rama de *N. obliqua*. B) *Cyttaria harioti* sobre *N. dombeyi*. C) *Cyttaria espinosae* sobre rama de *N. obliqua*. (Salazar Vidal, 2020; Salazar-Vidal et al., 2020)

HIPÓTESIS: Las especies comestibles de digüeños *Cyttaria berteroi*, *Cyttaria espinosae* y *Cyttaria harioti* presentan polisacáridos con actividad citotóxica diferenciada dada sus características físico-químicas

OBJETIVO GENERAL: Comparar las diferencias físico-químicas y citotóxicas de los polisacáridos de los hongos *Cyttaria berteroi*, *Cyttaria espinosae* y *Cyttaria harioti*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1.- Caracterizar la química de los polisacáridos de los hongos *Cyttaria berteroi*, *Cyttaria espinosae* y *Cyttaria harioti*.
- 2.- Determinar las características termoestables de los polisacáridos de los hongos *Cyttaria berteroi*, *Cyttaria espinosae* y *Cyttaria harioti*.
- 3.- Determinar la actividad citotóxica de los polisacáridos de los hongos *Cyttaria berteroi*, *Cyttaria espinosae* y *Cyttaria harioti*.



MATERIALES Y MÉTODOS

RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Los estromas fueron recolectados entre primavera y verano de los años 2017-2018 en la zona de Nahuelbuta VIII región y la reserva Altos de Lircay VII región. Luego las muestras fueron trasladadas al Laboratorio de Química de Productos Naturales de la Universidad de Concepción y fueron almacenadas a -20 °C para su posterior uso.

IDENTIFICACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Los caracteres macroscópicos de los estromas fueron observados y documentados en campo a través de fotografías *in situ* a color realizadas con cámara réflex Canon modelo T6 y en laboratorio bajo lupa microscópica.

La determinación taxonómica de los especímenes recolectados se realizó observando los caracteres microscópicos bajo un microscopio óptico trinocular AmScope modelo T670B sobre secciones de material fresco y/o deshidratado previamente a 45°C en un deshidratador de alimentos Blanik, montado en agua, KOH al 5%, floxina y reactivo de Melzer, utilizando bibliografía base (Gamundi, 1971; Furci, 2013)

Posteriormente los estromas congelados fueron liofilizados durante 48 h en un liofilizador automático modelo CHRIST Alpha 2-4 LO plus. Finalmente, estos fueron triturados en una picadora Moulinex DP800.

EXTRACCIÓN DE LOS POLISACÁRIDOS

Para realizar la extracción de los polisacáridos se utilizó el método descrito por (Figueroa et al., 2019) con algunas modificaciones. Se utilizaron 100 g de muestra liofilizada, y se resuspendieron en 500 mL de etanol al 70% durante 24 h con la finalidad de eliminar pigmentos y proteínas. Posteriormente, las muestras se centrifugaron y se recuperó la biomasa. Luego, las muestras se resuspendieron en 1.2L de agua destilada y fueron calentadas por 2 h a una temperatura de 70-80°C con agitación constante. Se dejaron enfriar y se centrifugaron durante 10 min. a 4500 rpm (este proceso se realizó dos veces). Luego, se recuperó el sobrenadante y fue concentrado en un rotavapor (IKA HB10 digital, Staufen, Germany) a 90 rpm, luego se agregó etanol absoluto (2:1) y se dejó toda la noche a 4°C para precipitar los polisacáridos. Las muestras se centrifugaron a 4500 rpm por 10 min y fueron recuperados los polisacáridos crudos (Pc). Seguidamente, los Pc fueron liofilizados

(Lyophilizer Cryodos, Telstar) (trampa de frío -60 °C, 1 atm de presión) durante 24 h y almacenados en frascos ámbar para su posterior uso.

Finalmente, para cada tipo de polisacárido se le calculó el %de rendimiento con la fórmula utilizada por Samavati (2013).

$$ASP\% = \frac{(Masa\ de\ polisacárido\ total\ (g))}{(Masa\ de\ hongo\ utilizado\ (g))}$$

PURIFICACIÓN DE LOS POLISACÁRIDOS

Los PsC fueron purificados de acuerdo con la técnica descrita por Palanisamy et al. (2017). Brevemente, se utilizó 250 mg de PsC se le añadió 25mL de agua y 0,75 ml de HCl 3M y se calentó con agitación durante 3 horas, luego se dejó enfriar, se centrifugó a 4500rpm durante 15 min y recupero el sobrenadante. Al sobrenadante se le agregó 0,75mL de NaOH 1M para detener la reacción, se agregó 100mL de etanol para precipitar los polisacáridos. Se conservó durante toda la noche a 4°C. Para recuperar los polisacáridos purificados (PsP) se centrifugó durante 15 min a 4500rpm. Los PsP obtenidos se traspasaron a placas Petri, se les agrego agua y dejó congelar para finalmente liofilizar.

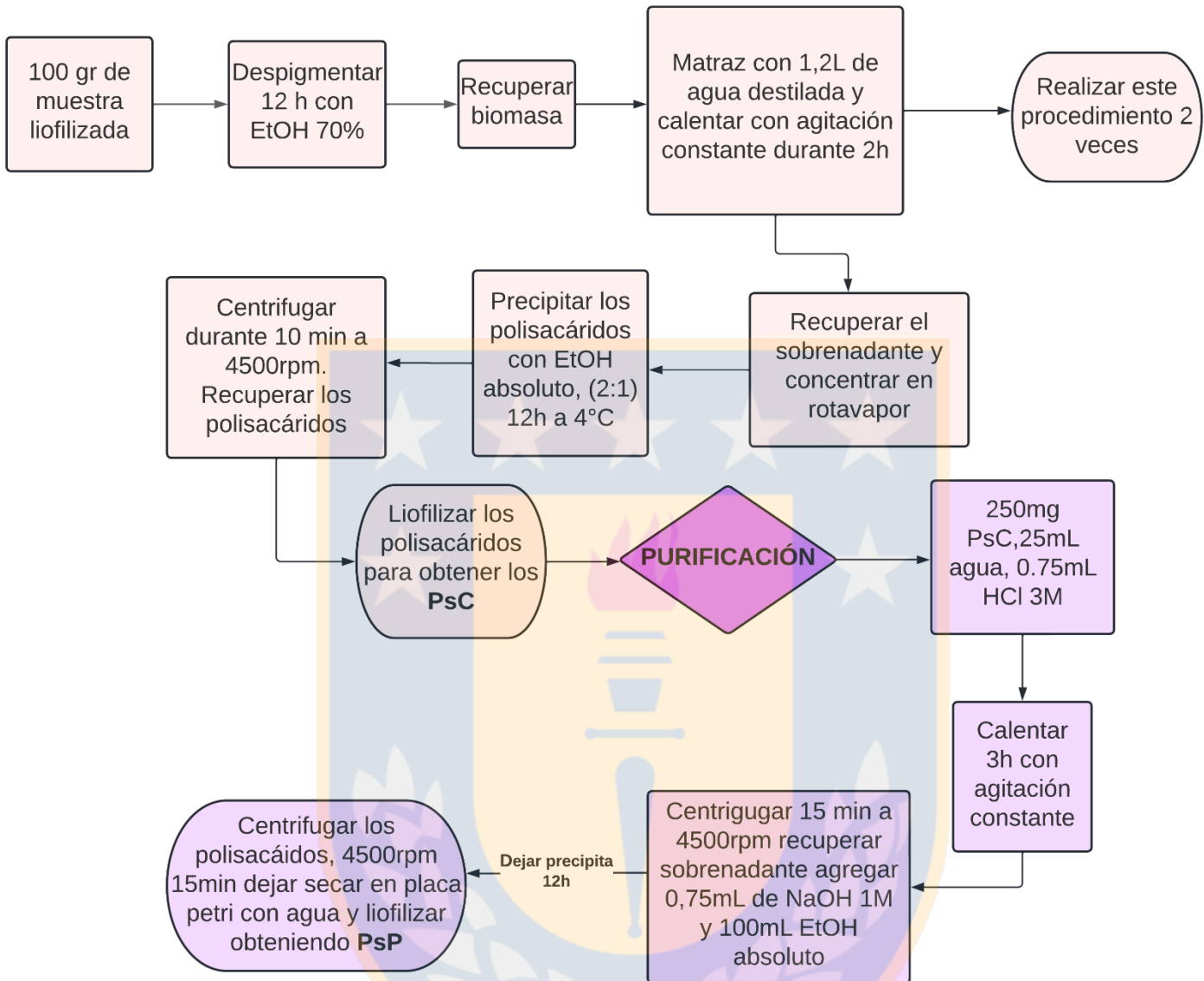


Figura 7: Esquema para la extracción y purificación de los polisacáridos de los hongos *Cyttaria berteroi*, *Cyttaria espinosae* y *Cyttaria harioti*.

ESPECTROSCOPIA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Los espectros infrarrojos se determinaron utilizando un FTIR. El análisis de las fracciones PsC y PsP se llevó a cabo generando discos 16mm (diámetro) preparados con una mezcla de polisacárido y bromuro de potasio (1% p/p) prensados a 15,0 t de presión hidrostática durante 5 min. Posteriormente, los discos se midieron con un espectrofotómetro infrarrojo en el rango de frecuencia de 4000–400 cm^{-1} . El ajuste de

la línea de base se realizó utilizando el programa de espectrofotómetro (Thermo Nicolet OMNIC) para aplanar líneas de base en cada espectro.

ANÁLISIS TERMOGRAVIMETRICO (TGA)

El comportamiento térmico de PsC y PsP se evaluó mediante análisis térmico gravimétrico (TGA) y gravedad térmica diferente (DTG) con el analizador térmico (STA 449 F3C, Netzsch, Alemania). Se introdujo PsC y PsP (4 mg) en la bandeja de muestra y se calentó de 10 a 600 °C con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min en atmósfera de nitrógeno. El caudal de gas fue de 40 ml/min. (Chen & Xue, 2018)

ENSAYOS ANTIOXIDANTES

ENSAYO RADICAL DPPH

El ensayo de eliminación de radicales DPPH se realizó mediante el procedimiento descrito por Brand-Williams et al., (1995) con modificaciones de Crisóstomo-Ayala et al., (2021). Para determinar la actividad de eliminación de radicales DPPH de los PsC y PsP de las especies de *Cyttaria* y de Trolox se utilizó el radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH). La mezcla contenía 270 µL de radical DPPH 0.06mM preparada en metanol y 30 µL de Trolox (para la curva) en diferentes concentraciones (10 a 200µg/mL) y para la actividad de los polisacáridos, todas las determinaciones por triplicado. La actividad de eliminación de radicales fue expresada como % de inhibición, los cuales fueron calculados a partir de la fórmula descrita por Masek et al. (2020).

$$\text{inhibición [\%]} = [(Ac - Am)/Ac] \times 100$$

donde Ac es la absorbancia control y Am es la absorbancia de la muestra.

ENSAYO RADICAL ABTS⁺

El ensayo ABTS⁺ se realizó mediante el procedimiento descrito por Re et al., (1999) con algunas modificaciones de Crisostomo-Ayala, et al., (2021). Las soluciones estándar utilizadas fueron ABTS 3.5mM (2,2-azino-bis-3-etilbenzoazolina-6-sulfonato) y persulfato potásico 1,22M. Luego se utilizó ambos stocks mezclándolos en partes iguales y permitiéndoles reaccionar por 16 h a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente se obtuvo el radical ABTS⁺. Luego se diluyó la solución mezclando 1mL de radical ABTS⁺ y 14mL de agua destilada para obtener un valor de absorbancia de 0.70 ± 0.01 unidades a 750nm. La solución ABTS⁺ se preparó recientemente para cada ensayo, para la reacción se utilizó 20 μ l de muestra (concentración 1000 μ g/ml) de cada polisacárido y 180 μ l de radical ABTS⁺. Para la curva estándar Trolox ((\pm -6-hidroxi-2,5,7,8-ácido tetrametilcromano-2-carboxílico) se utilizaron diluciones de 10 a 200 μ g/ml. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado. La actividad antioxidante fue expresada como % de inhibición, los cuales fueron calculados a partir de la fórmula descrita por Masek et al. (2020):

$$\text{inhibición [\%]} = [(Ac - Am)/Ac] \times 100$$

donde Ac es la absorbancia control y Am es la absorbancia de la muestra.

ENSAYO CITOTÓXICIDAD

El ensayo de citotoxicidad se llevó a cabo utilizando la línea tumoral de mama MCF-7 para ser expuesta a extractos crudos y purificados de *Cyttaria berteroi*, *Cyttaria espinosae* y *Cyttaria hariatii*. La línea tumoral se mantuvo con medio DMEM, antibiótico/antimicótico 1X, L-glutamina 1X, suero fetal bovino al 5% e incubado a 37°C en 5% de CO₂ en cajas de cultivo celular de 25mL. Para esto utilizando placas de 96 pocillos se pusieron 5000 células por pocillo y se agregaron 100 μ L de las muestras y se mantuvo en iguales condiciones de suplementos e incubación por 72 horas, al cabo de este tiempo se realizó el conteo de viabilidad celular para esto se utilizó el compuesto MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). Como control negativo se utilizó el cultivo celular sin adición de la muestra, al cual también se le hizo conteo celular como punto de comparación del crecimiento logarítmico a las 72 horas. Los ensayos se realizaron por triplicado. La citotoxicidad en la línea tumoral se realizó mediante el recuento de las células viables a 72 horas después de la adición de las muestras en las concentraciones de polisacáridos (0-10.000 μ g/mL). El porcentaje de célula viables se calculó a partir del valor medio del

recuento de los cultivos tratados con cada concentración de las muestras respecto al control que es el 100% de viabilidad.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los resultados fueron expresados como media \pm desviación estándar de tres experimentos (n=3). Para comparar las diferencias significativas en cada tratamiento de citotoxicidad se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías. Previo a los análisis se evaluaron los supuestos de normalidad, y la homogeneidad de varianza. Posteriormente, cuando existieron diferencias significativas se realizó una prueba post-hoc HSD de Tukey para la comparación entre las medias de cada tratamiento. Se consideraron diferencias significativas cuando $p < 0,05$. Los análisis se realizaron utilizando el programa STATISTICA 7.0.

RESULTADOS

Tabla 1: Rendimiento de los polisacáridos totales (%) de las especies de *Cyttaria berteroi*, *Cyttaria espinosae* y *Cyttaria hariatii*, a partir de 100 gr.

Especie	Rendimiento PsC (%)
<i>Cyttaria berteroi</i>	13,2
<i>Cyttaria espinosae</i>	25,81
<i>Cyttaria hariatii</i>	6,92

Como se observa en la tabla 1 el mayor rendimiento de polisacáridos crudos se reportó en *Cyttaria espinosae*, seguido por *C. berteroi* y finalmente *C. hariatii*. Por otra parte, mencionar que posterior al proceso de purificación la mayor pérdida de masa fue observada en *C. hariatii*, seguido de *C. espinosae* y finalmente *C. berteroi*.

ESPECTROSCOPIA INFRAROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Para conocer la composición de los polisacáridos de las especies de *Cyttaria* se realizaron análisis de espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) en donde los resultados se muestran en las figuras 8,9 y 10.

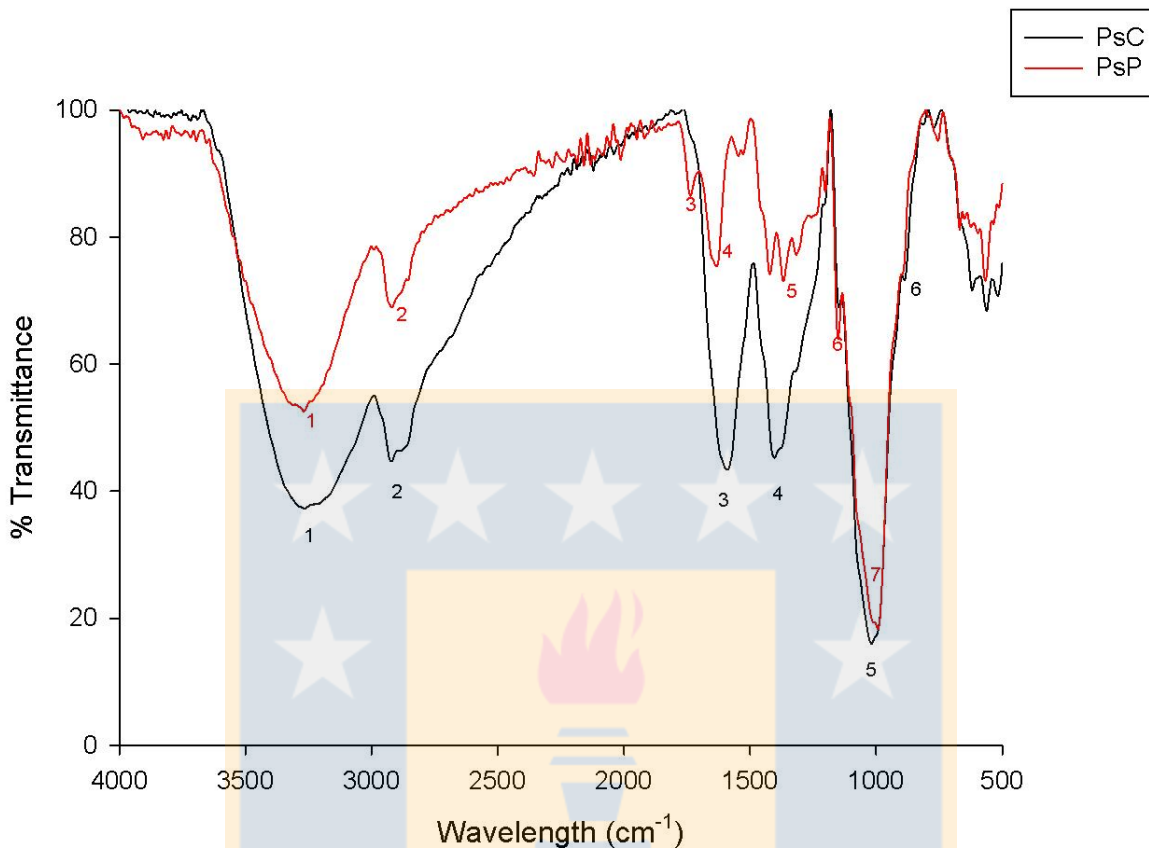


Figura 8: Espectros FTIR de polisacáridos PsC y PsP obtenidos de *Cyttaria berteroi*

Los peaks 1 y 2 en color (rojo y negro) a 3268 y 2920 cm^{-1} representan una absorción asociada a grupos OH y CH respectivamente. Entre los 1600 y 1400 cm^{-1} (peaks 3 y 4) para el PsC están asociados a proteínas, mientras que en PsP indican la presencia de ácido urónico y anillos aromáticos. El peak 5 a 1018 cm^{-1} se asocia a enlaces C-O; en cambio el peak 5 a 1424 cm^{-1} de PsP representa un grupo carboxilo; el peak 6 a 1156 cm^{-1} en el PsC muestra un pequeño quiebre asociado a β glucano. El peak 6 a 1150 cm^{-1} de PsP indica un peak extenso corresponde a un estiramiento C-O-C. El peak 7 indica dos peak, por un lado, un estiramiento alrededor del 992 cm^{-1} lo que muestra la presencia de un enlace C-O (glucosídico), además de un peak a 995 cm^{-1} donde existe una superposición atribuida a la presencia de β glucanos. Finalmente, el peak 8 a 828 cm^{-1} es un peak asociado a β glucanos.

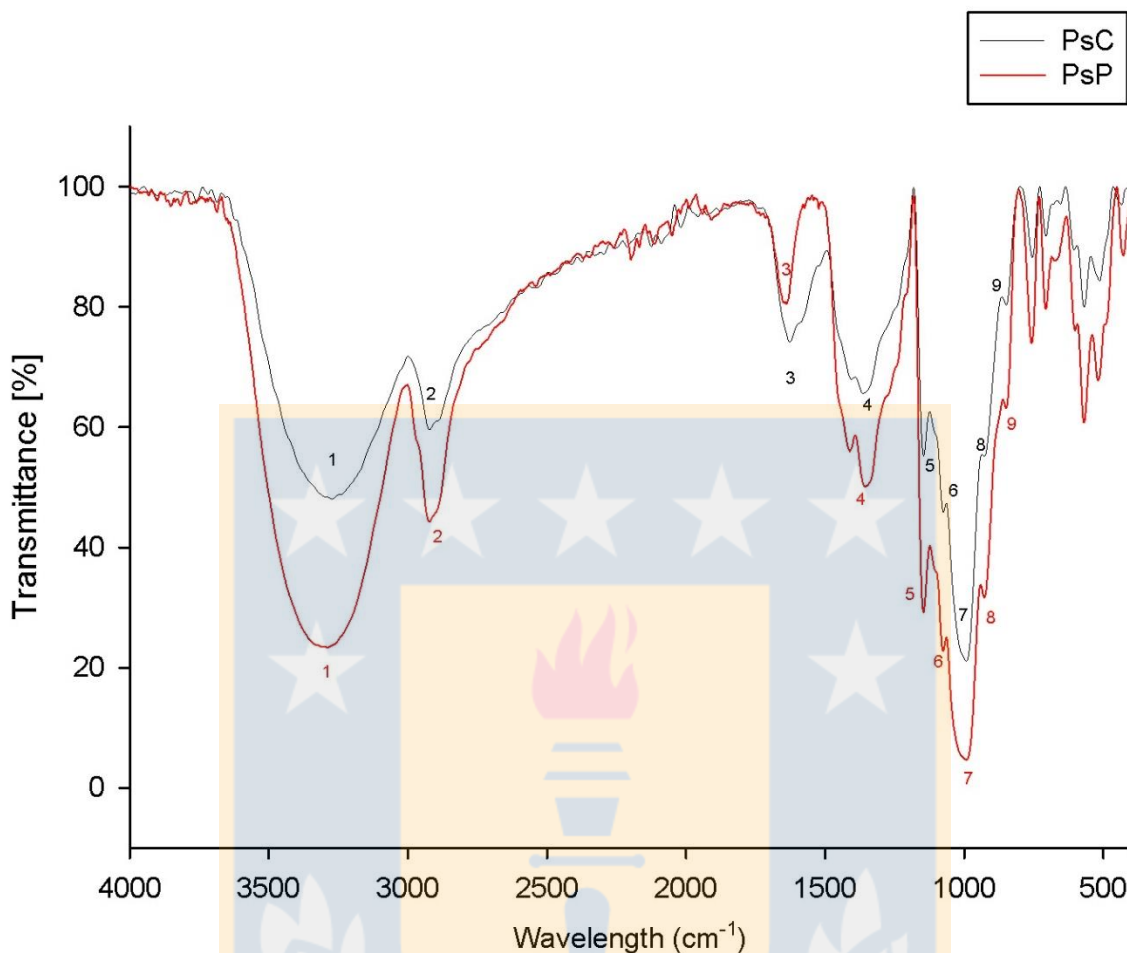


Figura 9: Espectros FTIR de polisacáridos (PsC y PsP) obtenidos de *Cyttaria espinosae*

En los peaks a 3300 cm^{-1} a 2922 cm^{-1} (1 y 2 de ambos polisacáridos) muestran estiramiento de OH y CH respectivamente; el peak 3 y 4 a 1627 cm^{-1} y 1363 cm^{-1} de PsC indican la presencia de proteínas mientras que el peak 3 de PsP a 1638 cm^{-1} indica ácido urónico y el peak 4 a 1357 cm^{-1} representa un estiramiento de un grupo carboxilo; los peaks 1146 cm^{-1} , 1075 cm^{-1} , 993 cm^{-1} (5, 6 y 7) de PsC indican C-O-C, β y enlace glicosídico C-O respectivamente; el peak 8 y 9 a 904 cm^{-1} y 844 cm^{-1} representan α y β glucanos superpuestos. Por otra parte, PsP en sus peaks 5 y 7, 1146 cm^{-1} y 992 cm^{-1} indican C-O-C y C-O respectivamente, mientras que los peaks 1076 cm^{-1} , 928 cm^{-1} y 835 (peaks 6, 8 y 9) muestran los β glucanos y α y β glucanos superpuestos.

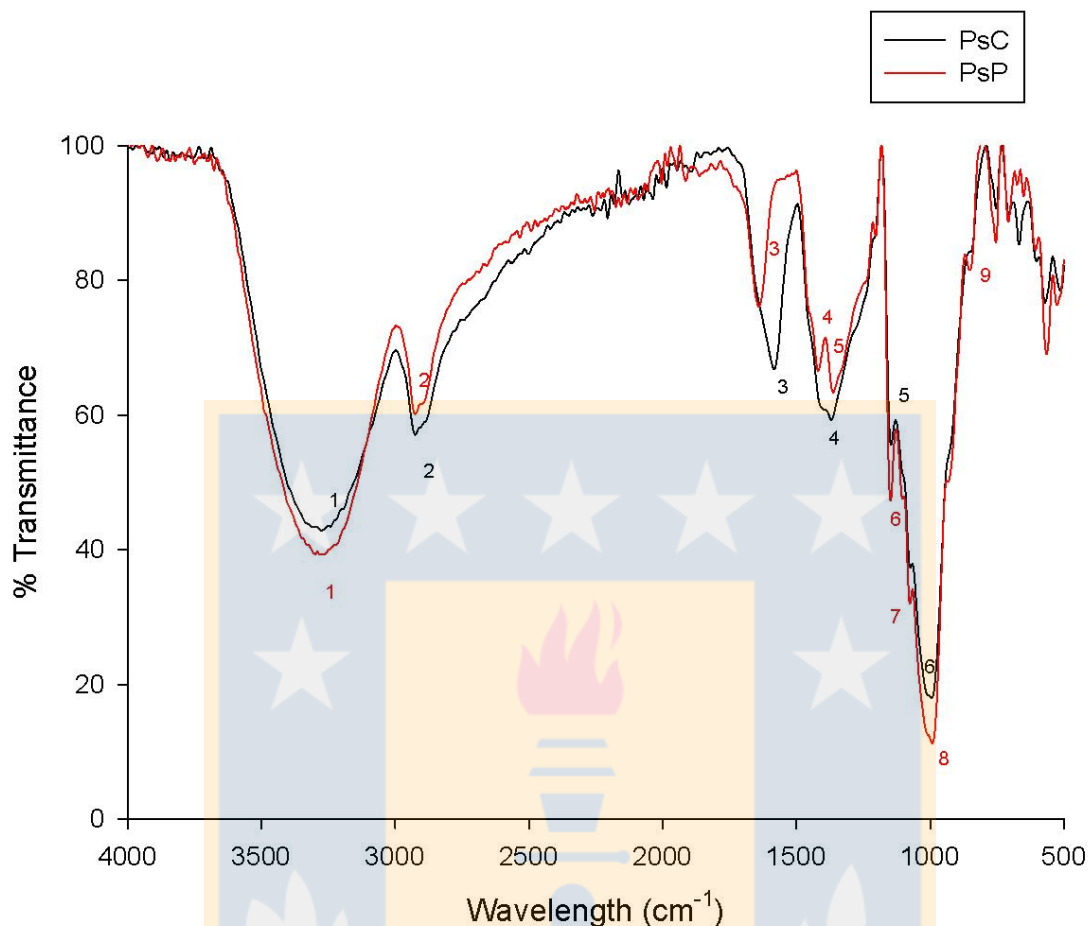


Figura 10: Espectros FTIR de polisacáridos PsC y PsP obtenidos de *Cyttaria harioi*.

En los peaks 1 y 2 (ambos polisacáridos), 3280 cm^{-1} y 2925 cm^{-1} respectivamente indican la presencia de grupos OH y CH; los peaks a 1583 cm^{-1} y 1369 cm^{-1} (peak 3 y 4) en PsC indica la presencia de proteínas mientras que el peak 3 a 1641 cm^{-1} en PsP indica a un ácido urónico; las peaks 4 y 5, 1418 cm^{-1} y 1363 cm^{-1} en PsP indican la presencia de grupos ácidos; la peak 5 de PSC a 1146 cm^{-1} y la peak 6 a 1077 cm^{-1} de PsP indican un grupo C-O-C; la peak 6 a 994 cm^{-1} PsC es indicativo del enlace glucosídico C-O además de la presencia de pequeñas superposiciones indicativas de β glucanos. Por otra parte, lo puntos 6 y 7 de PSP es decir a 1148 cm^{-1} y 1075 cm^{-1} indican grupos C-O-C y β glucanos respectivamente. Finalmente, los peaks 992 cm^{-1} y 828 cm^{-1} (peaks 8 y 9) indican el enlace glicosídico y superposición α y β glucanos respectivamente.

ANÁLISIS TERMOGRAVIMETRICO (TGA)

Tabla 3: Análisis termogravimétrico de los PsC y PsP de las especies de *Cyttaria*.

Especie	Polisacárido	T° inicial (°C)	T° final (°C)	Peak (°C)	Masa perdida (%)
<i>C. berteroi</i>	PsC	71,8	212,5	147,9	15
	PsC	212,5	300	262,6	47
	PsP	23	103	58,5	8
	PsP	103	181	—	2
	PsP	181	311,4	289,2	49
	<i>C. espinosae</i>	PsC	53,5	125	—
PsC		125	260,7	—	9,5
PsC		260,7	321	299	51
PsP		59,4	160	125,3	7,5
PsP		160	245	—	13
PsP		245	302,5	277,9	52,5
<i>C. harioti</i>	PsC	31,3	109,4	—	4
	PsC	109,4	237,5	—	9,5
	PsC	237,5	321,9	298,7	50,5
	PsP	7,5	107,5	102,5	6
	PsP	107,5	247,5	—	14
	PsP	247,5	305	287,7	52,5

En la tabla 3 se muestran los análisis termogravimétricos realizados a los PsC y PsP de las especies de *Cyttaria*.

En los PsC y PsP de la especie *Cyttaria berteroi* se registraron 2 peaks. En los PsC el primer evento de pérdida de masa reportó un peak a los 147,9°C con una pérdida de masa del 15% a los 212,5°C y en el caso de PsP el primer evento de pérdida comenzó a los 23°C y se observó un peak a 58,5°C con una pérdida de masa del 8% a los 103°C. El segundo evento de pérdida de masa de los PsC comienza a los 250°C reportando un peak a los 262,6°C con una pérdida de masa de un 47% a los 300°C mostrando una pérdida menor en 2% que PsP que comenzó su segundo evento de pérdida de masa a los 181°C reportando un segundo peak a los 289,2°C con una pérdida de masa del 49% a los 289,2°C.

Por otra parte, en la especie *Cyttaria espinosae* los PsC comenzaron su primer evento de pérdida de masa a los 53,5°C manteniendo una mínima pérdida de masa de 9,5% hasta los 260°C momento en el que comienza el segundo evento de pérdida reportando un peak 299°C con una pérdida de masa del 51% a los 321°C. Por otra

parte, los PsP comenzaron su primer evento de pérdida de masa a los 59,4°C reportando un peak a los 125,3°C con una pérdida de masa del 7,5% a los 160°C momento del inicio del segundo evento de pérdida de masa reportando un peak a los 277,9°C con una pérdida de masa del 52,5% a los 302,5°C.

Finalmente, en la especie *Cyttaria harioti* los PsC comienzan su primer evento de pérdida de masa a los 31,3°C manteniendo una pérdida mínima del 13,5% hasta los 237,5°C momento donde inicia el segundo evento de pérdida el cual reporta un peak a los 298,7°C con una pérdida del 50,5% a los 321,9°C, mientras que los PsP tienen su primer evento de pérdida de masa a los 7,5°C reportando un peak a los 102,5°C con una pérdida de masa del 6% a los 107°C, el segundo evento de pérdida de masa inicia a los 247,°C reportando un peak a los 287,7°C con una pérdida del 52,5% a los 305°C.

Los PsP reportaron eventos de pérdida de masa a menor temperatura que los PsC además, los PsP presentaron una mayor pérdida de masa que los PsC, obteniendo una diferencia de entre el 1 y 2%



ACTIVIDAD CITOTÓXICA

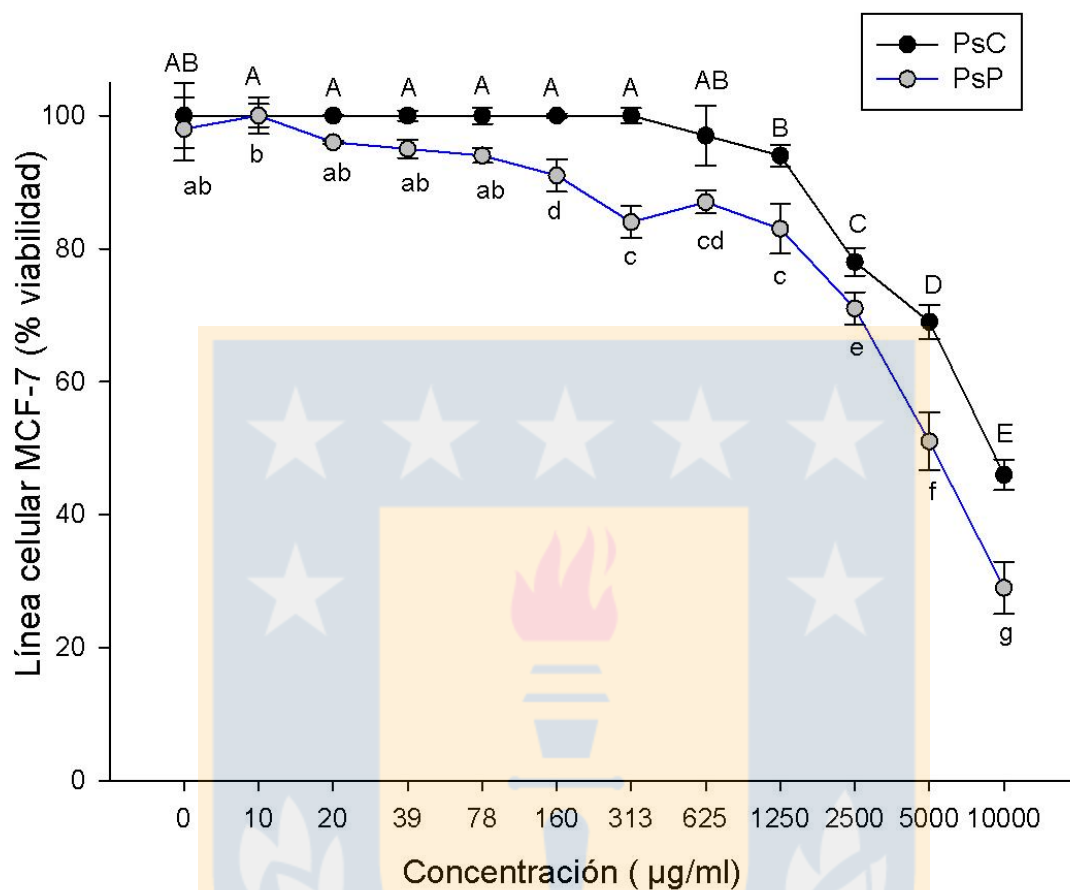


Figura 11: Efecto de los polisacáridos crudos (PsC) y purificados (PsP) de *Cyttaria berteroi* en la línea celular de mamas (MCF-7).

Tabla 4: Análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, donde se evalúa el efecto de la concentración de polisacárido y el tipo de polisacárido (PsC y PsP) frente la línea celular de mamas (MCF-7) de *Cyttaria berteroi*

Efecto	gl	MS	F	p
Concentración	11	2939	567	0,000
Tipo polisacárido	1	1718,1	331,3	0,000
Concentración*polisacárido	11	71,1	14	0,000

* Valor de significancia $p < 0.05$

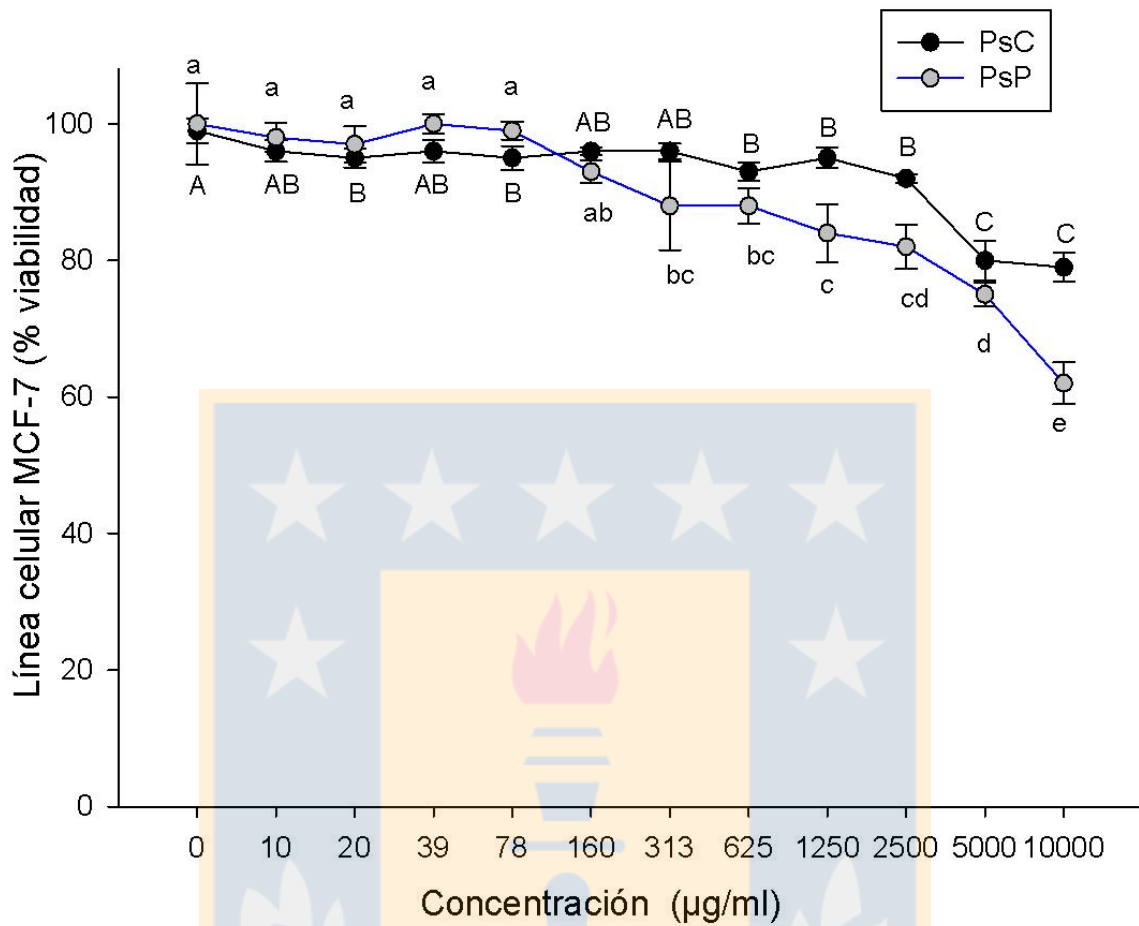


Figura 12: Efecto de los polisacáridos crudos (PsC) y purificados (PsP) de *Cyttaria espinosae*.

Tabla 5: Análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, donde se evalúa el efecto de la concentración de polisacárido y el tipo de polisacárido (PsC y PsP) frente la línea celular de mamas (MCF-7) de *Cyttaria espinosae*

Efecto	gl	MS	F	p
Concentración	11	594,1	101	0,000
Tipo polisacárido	1	394	67	0,000
ConcentraciónXpolisacárido	11	88	15	0,000

* Valor de significancia $p < 0,05$

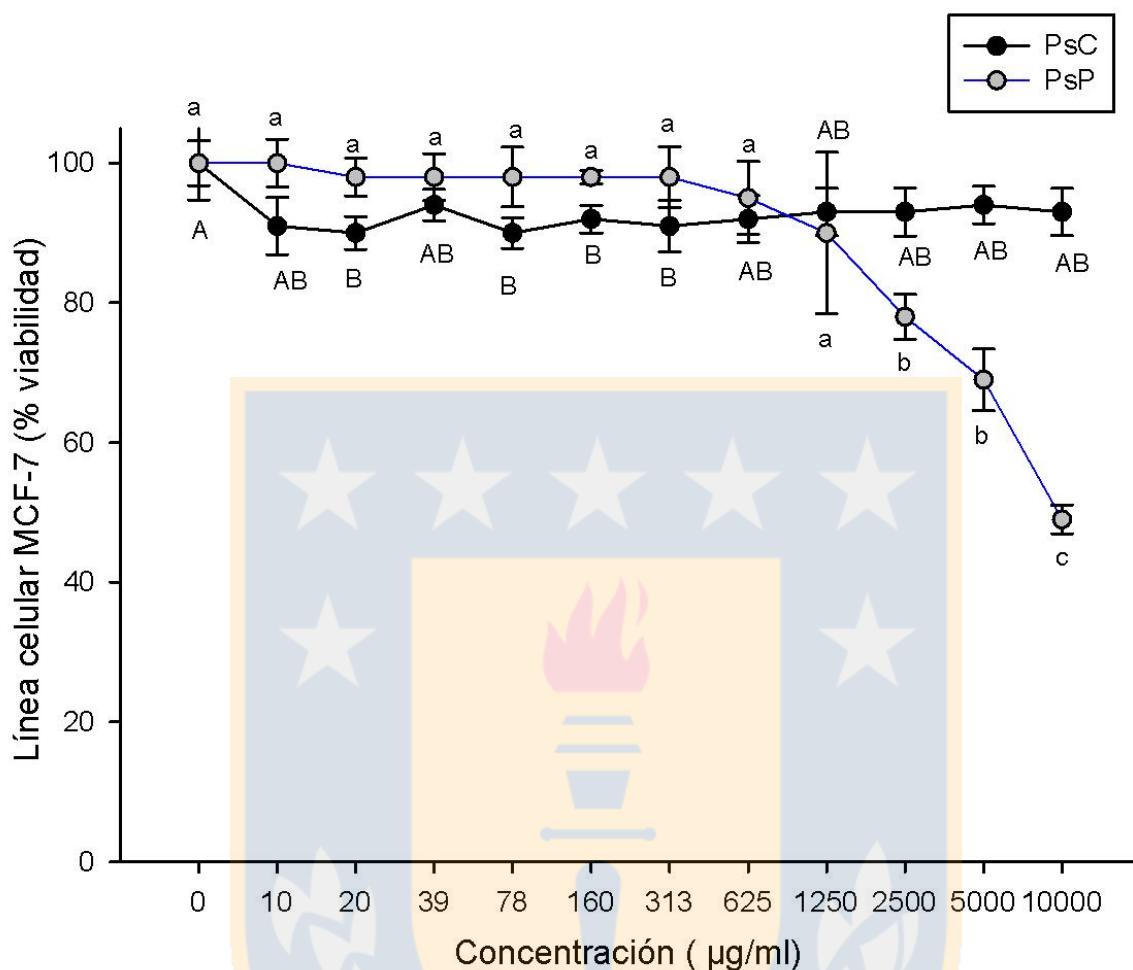


Figura 13: Efecto de los polisacáridos crudos (PsC) y purificados (PsP) de *Cyttaria hariatii* en la línea celular de mamas (MCF-7).

Tabla 6: Análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, donde se evalúa el efecto de la concentración de polisacárido y el tipo de polisacárido (PsC y PsP) frente la línea celular de mamas (MCF-7) de *Cyttaria hariatii*

Efecto	GL	MS	F	P
Concentración	11	500	35	0,000
Tipo polisacárido	1	339	24	0,000
ConcentraciónXpolisacárido	11	535	37,1	0,000

* Valor de significancia $p < 0.05$

Las actividades citotóxicas de las especies de *Cyttaria berteroi*, *C. espinosae* y *C. harioti* se muestran en las Figuras 11, 12 y 13 respectivamente. Al someter la línea celular de cáncer de mamas MCF-7 a concentraciones crecientes de PsC y PsP de *C. berteroi* se observó una actividad citotóxica significativa ($p < 0,05$). En los PsC se reportó un IC_{50} de 9,8 mg/mL y al exponer las células tumorales a una concentración de 10 mg/ml de polisacárido se observó un promedio de $46 \pm 2,2\%$ de supervivencia (Figura 11, Tabla 4). En los PsP se reportó un IC_{50} de 5 mg/mL y un máximo nivel de inhibición a una concentración de 10 mg/ml observándose un porcentaje de supervivencia del $29 \pm 3,9\%$.

Por otra parte, al exponer la línea celular de cáncer de mamas (MCF-7) a concentraciones crecientes de polisacáridos de la especie *C. espinosae* se reportó una actividad citotóxica significativa ($p < 0,05$) sobre la línea (Figura 12, Tabla 5). Los PsC reportaron una supervivencia promedio del $79 \pm 2,1\%$ mientras que los PsP fue de un $62 \pm 3,1\%$.

Finalmente, los polisacáridos de *Cyttaria harioti* evidenciaron un efecto citotóxico significativo sobre la línea celular de cáncer de mama (MCF-7) (Figura 13, tabla 6). En los PsC se obtuvo una inhibición del 10% en la supervivencia celular. Por su parte, PsP si mostró un IC_{50} a los 9,8 mg/mL, a la concentración de 10 mg/mL el porcentaje de supervivencia bajó al $48 \pm 2,0\%$.

DISCUSIÓN

FTIR

En este estudio, las características estructurales mediante FTIR se observaron señales características de polisacáridos, la señal reportada entre el rango de $3000-3500 \text{ cm}^{-1}$ en los espectros de *C. berteroi*, *C. espinosae* y *C. harioti* corresponde a la presencia de grupos OH. Datos similares fueron previamente observados por Kozarski et al. (2012) en polisacáridos extraídos de la especie *Lentinula edodes* atribuido a los grupos OH. Por otra parte, los grupos CH reportados entre los rangos de los 2500 y 2900 cm^{-1} son similares a lo evidenciado por Kozarski et al. (2011) en polisacáridos de *Agaricus brasiliensis*, Kozarski et al. (2012) con polisacáridos de *Trametes versicolor* y Chen et al. (2019) en polisacáridos de *Grifola frondosa*.

Los enlaces glucosídicos (C-O) reportados en las especies de *Cyttaria* coinciden con los observados por Kozarski et al. (2011) en polisacáridos de *Agaricus brasiliensis* con un peak a 1020 cm^{-1} , *Agaricus bisporus* a 1022 cm^{-1} , *Phellinus linteus* 1044 cm^{-1} . Kozarski et al. (2012) también reportó peaks similares en las especies *Lentinula edodes* y *Trametes versicolor*, 1019 cm^{-1} y 1023 cm^{-1} respectivamente.

Las peaks asociadas a los enlaces β -glucanos de los polisacáridos de *Cyttarias* se asemejan a lo previamente reportado por Kozarski et al. (2011) quienes observaron que las señales entre los 1000 y 1100 cm^{-1} de los polisacáridos de las especies *G. lucidum*, *P. linteus* y *A. brasiliensis* se asociaban a la presencia de β -glucanos. En esta línea, Kozarski et al. (2012) indicaron que los polisacáridos de *Ganoderma applanatum* y *G. lucidum* reportan peaks asociados a β -glucanos en los rangos 890 y 891 cm^{-1} respectivamente. Por su parte Chen et al (2019) indicaron un peak a 917 cm^{-1} en polisacáridos de *Grifola frondosa* el cual asociaron a enlaces β -glucano. Por otra parte, en los espectros de este estudio se observó la presencia α -glucanos en los pglucanos ende las especies de *Cyttaria*, esto se relaciona con lo reportado Kozarski et al. (2012) donde reportaron la presencia de α -glucanos en polisacáridos de la especie *G. applanatum* a los 920 cm^{-1} . En esta misma línea, Ji et al. (2019) y Chen et al. (2019) observaron que la presencia de α -glucanos en los polisacáridos de *G. frondosa* estaban asociadas a señales a los 842 cm^{-1} y 867 cm^{-1} , respectivamente

Finalmente, las proteínas reportadas en los PsC entre las peaks 1400 y 1600 cm^{-1} . Para los polisacáridos de *C. berteroi* se identificaron dos peaks asociadas a proteínas a los 1403 y 1589 cm^{-1} , en *C. espinosae* se reportaron peaks asociadas a proteínas a los 1401, 1487 y 1627 cm^{-1} y en *C. harioti* se observaron peaks de absorción de proteínas a 1369, 1410 y 1583 cm^{-1} , estas peaks coinciden con lo previamente evidenciado por Kozarski et al. (2011) donde indicaron que polisacáridos de *Lentinula edodes*, reportan peak asociados a proteínas en los rangos a 1635 cm^{-1} , 1520 cm^{-1} y 1412 cm^{-1} , de forma semejante reportaron para los polisacáridos de *Trametes versicolor* con peaks a 1636 cm^{-1} y 1411 cm^{-1} . Por otra parte, los ácidos urónicos reportados en los PsP de *C. berteroi* a 1736 cm^{-1} y 1638 cm^{-1} , *C. espinosae* a los 1638 cm^{-1} y *C. harioti* a los 1641 cm^{-1} se asemejan a lo reportado previamente por Chen y Xue (2018) con los polisacáridos de la especie *Auricularia polytricha* en donde relacionaron las señales a 1740 y 1617 cm^{-1} con ácidos urónicos.

ANÁLISIS TERMOGRAVIMETRICO

La importancia de estudiar la termo estabilidad de los compuestos estudiados es para identificar si tienen la capacidad de superar los procesos de esterilización que se deben someter los compuestos que serán utilizados en la industria farmacéutica, nutracéutica entre otros. (Chen & Xue, 2018).

Los análisis termogravimétricos de los PsC y PsP de las tres especies de *Cyttaria* se muestran en la tabla 3, para las tres especies de *Cyttaria* la primera pérdida de masa se reportó alrededor de los 100° C lo que indica la evaporación del agua libre y la estructural como lo indicaron previamente Chen & Xue (2018) donde observaron que la primera pérdida de masa en polisacáridos de *Auricularia polytricha* se estableció entre los 30 y 140°C, así también lo reportó Xu et al. (2019) en su estudio con

polisacáridos de *Ganoderma lucidum*, indicando que alrededor de los 100°C los polisacáridos sufrieron una ligera pérdida de masa. El inicio del segundo evento de pérdida de masa marca diferencia entre los polisacáridos y entre las especies, estos se reportan entre los 181°C y 260°C, esta pérdida de masa se asocia a la degradación propia del polisacárido como lo reportaron previamente Chen & Xue (2018) en polisacáridos de *Auricularia polytricha* con un segundo evento de pérdida alrededor de los 250°C evidenciando una pérdida de masa del 56,9%; Xu et al. (2019) con polisacáridos de *G. lucidum* reportaron que el segundo evento de pérdida de masa comenzó a los 229°C y Wang et al. (2019) en polisacáridos de *Alternaria tenuissima* reportando que el segundo evento de pérdida de masa se llevó a cabo a partir de los 245°C. Las diferencias de termoestabilidad entre PsC y PsP están relacionadas con los procesos de obtención, la disminución de la termoestabilidad de los PsP frente los PsC se puede atribuir al proceso de purificación con ácido y posteriormente finalizar la reacción con hidróxido de sodio, esto fue reportado anteriormente por Rozi et al. (2019) quienes estudiaron los polisacáridos de *Fritillaria pallidiflora* reportando que la fracción tratada con ácido y otra fracción tratada con hidróxido de sodio demostraron menor termoestabilidad que la fracción tratada solo con agua.

ENSAYOS ANTIOXIDANTES

Las pruebas DPPH y ABTS son los ensayos antioxidantes más comunes, con DPPH se establece la capacidad que tiene un compuesto determinado para estabilizar un radical ya sea donando un electrón o un átomo de hidrógeno (Chen & Xue, 2018). Por su parte ABTS⁺ evidencia la capacidad antioxidante total tanto antioxidantes hidrofílicos como lipofílicos (Rodríguez Aguirre et al., 2016)

Los ensayos antioxidantes aplicados a los PsC y PsP de las especies de *Cyttaria*, tuvieron una escasa reacción frente a los radicales ABTS⁺ y DPPH (resultados no mostrados en este estudio), esta situación puede ser explicada debido a que se ha demostrado que los polisacáridos para exponer una acción antioxidante requieren del complejo polisacáridos-proteína (Wang et al., 2016), así lo demostró Liu et al. (1997) comparando la acción de ocho polisacáridos de distintas especies como agentes antioxidantes, mediante distintos métodos, en consecuencia encontraron que el polisacárido comercial lentinan y el polisacárido Schizophyllum (extraído de *Coriolus versicolor*) contenían un bajo contenido de proteínas en sus estructuras, además de presentar un bajo efecto en los ensayos antioxidantes, por el contrario los complejos polisacáridos-proteína obtenidos de *Ganoderma lucidum* y *Grifola umbellata*, generaron una mejor respuesta frente a los radicales. Así también, Huang et al. (2013) fraccionó en 5 extractos los polisacáridos de *Cordyceps sinensis*, y tan solo una fracción, la con mayor contenido de proteína mostró una alta actividad antioxidante.

Por otra parte, estudios demuestran que el medio de extracción de los polisacáridos interfiere en la actividad antioxidante, como lo expuso Liu et al. (2013) quienes compararon dos técnicas de extracción (I) mediante agua caliente y (II) mediante ultrasonido, dando a conocer que aquellos polisacáridos extraídos mediante ultrasonido presentaron mayor porcentaje de proteínas y a su vez mejor capacidad antioxidante que los polisacáridos extraídos mediante agua caliente.

Finalmente, las fracciones de polisacáridos purificados debido a que se eliminan los compuestos fenólicos y proteínas no muestran actividades antioxidantes significativas (Wang et al., 2016). Sin embargo, esto no ocurre en todos los casos puesto que, el proceso de purificación realizado en este estudio no es la causa principal de la falta de actividad antioxidante dado que, los polisacáridos purificados de algas mediante esta misma técnica, si presentan actividad antioxidante como lo describió Palanisamy et al. (2017) con fucoidanos de *Sargassum polycystum*

ACTIVIDAD CITOTÓXICA

El cáncer de mamas es el más común entre las mujeres, la línea celular de mama MCF-7 ha sido la más utilizada a lo largo de los estudios con líneas celulares tumorales. Se destaca por ser una línea resistente a múltiples fármacos anticancerígenos (Doyle et al., 1998).

Los análisis de citotoxicidad medidos en el presente estudio indican diferencias entre especies además de comportamientos distintos dependiendo del tipo de polisacárido, los PsP presentan mayor actividad citotóxica que los PsC.

En el presente estudio, se observó una respuesta citotóxica dependiente de la concentración de los polisacáridos, esto concuerda con lo descrito por Hanyu et al., (2020) con polisacáridos de *Ganoderma applanatum* frente a la línea celular MCF-7 donde se reportó un IC50 a 9,976 mg/mL observando una inhibición dependiente de concentración. Así también lo reportó Albornoz et al. (2022) con polisacáridos de *Nothophellinus andinopatagonicus* frente a la línea celular MCF-7, reportando una respuesta inhibitoria dependiente de la concentración.

Es importante destacar que la actividad citotóxica observado en este estudio difiere a lo reportado previamente por Salazar-Vidal et al. (2020) donde los polisacáridos extraídos de *Cyttaria berteroi* contenía un IC₅₀ por sobre los 10 mg/ml y los de *C. harioti* un IC₅₀ 9,470 mg/ml. Estas diferencias pueden estar atribuidas al proceso de despigmentación, en el presente estudio se despigmentó durante 24h en etanol para conseguir una mayor eliminación de proteínas y compuestos fenólicos, esto en comparación con el estudio realizado previamente por Salazar et al. (2020). Además, es sabido que las proteínas presentes en los complejos proteína-polisacárido (glicoproteína) aumenta las propiedades bioactivas (Xu et al., 2011, Giavasis, 2014). Esto queda en evidencia en el estudio realizado por Wu, Siu, & Geng, (2021) donde una fracción *Grifola frondosa*, estaba constituida por un 30% proteína y un 70% polisacárido. Esto deja en evidencia que las diferencias de citotoxicidad observadas en este estudio pueden ser atribuidas a los pesos moleculares y la conformación estructural del polisacárido purificado.

Así mismo Wang et al. (2020) sugiere que el peso molecular de polisacáridos de *Lentinula edodes* confiere la principal característica bioactiva, luego la composición de monosacáridos, los cuales pueden diferir dependiendo la especie, además de la purificación aplicada, la proporción de enlaces glucosídicos y la configuración tanto de la cadena principal como ramificada.

Por otra parte la diferencia entre los PsC y PsP puede establecerse a la presencia de ciertos tipos de ácidos urónicos, quizás del grupo glic amino glicosaminoglicanos, como heparán sulfato (HS) que presenta capacidad de activar e inhibir citoquinas como interleucinas y factor de necrosis tumoral; Heparina (hep) presenta actividad anticoagulante lo ayuda a suprimir el crecimiento tumoral y/o condroitín sulfato (CS) el cual tiene capacidades antiangiogénicas durante la generación de un tumor (Köwitsch et al., 2017).

Puesto que los PsC y PsP reportaron contener enlaces β -glucanos, es posible que el mecanismo de acción para la actividad citotóxica sea la inmunomodulación como fue reportado anteriormente por Kozarski et al (2011) con polisacáridos de *A. bisporus*, *A. brasiliensis*, *G. lucidum*, y *P. linteus* donde midieron la actividad inmunomoduladora a partir de la concentración de IFN- γ . En esta misma línea Smiderle et al., (2013) con polisacáridos de *Agaricus bisporus* y *Agaricus brasiliensis* reportando que ambos presentaban actividad inmunomoduladora en macrófagos humanos. Otro mecanismo de acción es la intervención en el ciclo celular del tumor como lo reportaron Albornoz et al (2022) con polisacáridos ácidos de *N. andinopatagonicus* los cuales demostraron actuar fomentando la apoptosis y reduciendo el porcentaje de células en las distintas etapas (S, G2, M).

CONCLUSIÓN

El presente estudio reporta nueva información para las especies más consumidas en Chile del género *Cyttaria*. Este estudio concluye que los polisacáridos *C. berteroi*, *C. espinosae* y *C. harioti*, presentan diferencias físicas, sus grados de termoestabilidad si bien es cierto, son estables por bajo los 250°C, los polisacáridos de *C. berteroi* son los que presentan la termoestabilidad más baja y los polisacáridos de *C. espinosae* reportó la termoestabilidad más alta. En esta misma línea, los PsP obtuvieron una termoestabilidad menor a los PsC por lo que es conveniente buscar otros métodos de purificación igualmente efectivo. Las diferencias químicas reportadas a partir de los espectros infrarrojos evidencian diferencias en la composición de proteínas, ácidos urónicos, enlaces β -glucanos y grupos funcionales.

Los polisacáridos (PsC y PsP) de *C. berteroi*, *C. espinosae* y *C. harioti*, reportaron actividad citotóxica diferenciada frente la línea celular de cáncer de mamas (MCF-7), siendo los PsP de *C. berteroi* los más prometedores frente a esta línea celular, mientras que los PsP de *C. espinosae* y *C. harioti* podrían funcionar como inhibidores del crecimiento tumoral. La hipótesis de este estudio se acepta, puesto que si existe una actividad citotóxica diferenciada entre los polisacáridos de las especies más consumidas en Chile del género *Cyttaria*.

Futuros estudios deben centrarse en estudiar otras técnicas para medir capacidad antioxidante, estudiar otras propiedades físicas como la viscosidad y la elasticidad. Además, identificar los mecanismos de acción de los polisacáridos, composición de monosacáridos, ácidos urónicos presentes, analizar la estructura y peso molecular. Asimismo, es necesario realizar estudios citotóxicos en líneas celulares sanas para identificar que no sea tóxico para estas mismas. Los resultados evidenciados en este estudio impulsan a seguir estudiando los polisacáridos de las especies de *Cyttaria* presentes en Chile y estudiar su efecto en otras líneas celulares de cáncer tales como hepatocarcinoma, cáncer de pulmón, vejiga, leucemia entre otras.

LITERATURA CITADA

- Abel, G., & Czop, J. K. (1992). Stimulation of human monocyte β -glucan receptors by glucan particles induces production of TNF- α and IL-1 β . *International Journal of Immunopharmacology*, 14(8), 1363–1373. [https://doi.org/10.1016/0192-0561\(92\)90007-8](https://doi.org/10.1016/0192-0561(92)90007-8)
- Albornoz, V., Casas-Arrojo, V., Figueroa, F., Hernández, V., Pérez, C., Rajchenberg, M., ... Abdala-Díaz, R. (2022). [Review of *Evaluation of cytotoxic effect against tumor cells of the acidic polysaccharides of the fungus Nothophellinus andinopatagonicus* [Review of Evaluation of cytotoxic effect against tumor cells of the acidic polysaccharides of the fungus *Nothophellinus andinopatagonicus*]. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 60 (1).
- American Cancer Society. (2020, November 20). *¿Qué es el Cáncer?* [Review of *¿Qué es el Cáncer?*]. American Cancer Society. <https://www.cancer.org/es/tratamiento/como-comprender-su-diagnostico/que-es-el-cancer.html>
- Arvelo, F., Sojo, F., & Cotte, C. (2016). Tumour progression and metastasis. *Ecancermedicalscience*, 10. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2016.617>
- Benzie, I. F. F., & Sissi Wachtel-Galor. (2011). *Herbal medicine : biomolecular and clinical aspects*. Crc Press, Cop.
- Centelles, J., & Imperial, S. (2010). Paclitaxel descubrimiento, propiedades y uso clínico [Review of *Paclitaxel descubrimiento, propiedades y uso clínico*]. *Ámbito Farmacéutico Fitoterapia*, 29(4), 68–75.
- Chen, Y., & Xue, Y. (2018). Purification, chemical characterization and antioxidant activities of a novel polysaccharide from *Auricularia polytricha*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120, 1087–1092. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.160>
- Chen, X., Ji, H., Zhang, C., Yu, J., & Liu, A. (2019). Structural characterization and antitumor activity of a novel polysaccharide from *Grifola frondosa*. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(1), 272–282. <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00289-z>
- Crisostomo- Ayala, K., Hernández de la torre, M., Pedreño, M. A., Hernández, J. A., Pérez C., Bustos, E., Sánchez-Olate, M. & Rios. (2021). Seasonal changes in photosynthesis, phenolic content, antioxidant activity, and anatomy of apical and basal leaves of *Aristotelia chilensis*. *Biologia Plantarum*, 65, 342–350. <https://doi.org/10.32615/bp.2021.052>

- Cui, J., & Chisti, Y. (2003). Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*: physiological activity, uses, and production. *Biotechnology Advances*, 21(2), 109–122. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(03\)00002-8](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(03)00002-8)
- de Francisco, A. L. M., Macía, M., Alonso, F., García, P., Gutierrez, E., Quintana, L. F., Quiroga, B., & Torregrosa, I. (2019). Onco-Nephrology: Cancer, chemotherapy and kidney. *Nefrología (English Edition)*, 39(5), 473–481. <https://doi.org/10.1016/j.nefro.2018.10.016>
- Doyle, L. A., Yang, W., Abruzzo, L. V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A. K., & Ross, D. D. (1998). A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(26), 15665–15670. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.26.15665>
- INC. (2021, May 5). *¿Qué es el Cáncer?* [Review of *¿Qué es el Cáncer?*]. Instituto Nacional Del Cáncer. <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>
- Espinoza, M., & Lamura, Á. (2020). La terapia dirigida a la osteonecrosis maxilar y/o mandibular relacionada con la medicación [Review of *La terapia dirigida a la osteonecrosis maxilar y/o mandibular relacionada con la medicación*]. *Acta Odontologica Venezolana*, 58(2).
- Fernandez Cirelli, A., & de Lederkremer, R. M. (1976). A gel-forming (1→3)-β-D-glucan isolated from *Cyttaria harioti fischer*. *Carbohydrate Research*, 48(2), 217–223. [https://doi.org/10.1016/s0008-6215\(00\)83217-6](https://doi.org/10.1016/s0008-6215(00)83217-6)
- Figueroa, F. A., Abdala-Díaz, R., Hernández, V., Pedreros, P., Aranda, M., Cabrera-Pardo, J. R., Pérez, C., Becerra, J., & Urrutia, R. (2019). Invasive diatom *Didymosphenia geminata* as a source of polysaccharides with antioxidant and immunomodulatory effects on macrophage cell lines. *Journal of Applied Phycology*, 32(1), 93–102. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01976-6>
- Filella, X., Molina, R., & Ballesta, A. M. (2002). Estructura y función de las citocinas. *Medicina Integral*, 39(2), 63–71. <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-estructura-funcion-citocinas-13026682>
- Fuenmayor, J., Gamez, R., & Montaña, R. (2013). Anticuerpos monoclonales en el tratamiento del Cáncer. Terapia dirigida para tumores sólidos [Review of *Anticuerpos monoclonales en el tratamiento del Cáncer. Terapia dirigida para tumores sólidos*]. *Revista Venezolana de Oncología*, 25(4), 236–254.
- Furci, M. (2013). *Guía de campo : hongos de Chile*. Fundación Fungi.
- Gamundi, I. J. (1971). Las Cyttariales sudamericanas (Fungi-Ascomycetes). *Darwiniana*, 16(3/4), 461–510. <http://www.jstor.org/stable/23213892>

- Giavasis, I. (2014). Bioactive fungal polysaccharides as potential functional ingredients in food and nutraceuticals. *Current Opinion in Biotechnology*, 26, 162–173. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.01.010>
- Globocan. (2020). World Health Organization. https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0
- Hanyu, X., Lanyue, L., Miao, D., Wentao, F., Cangran, C., & Hui, S. (2020). Effect of Ganoderma applanatum polysaccharides on MAPK/ERK pathway affecting autophagy in breast cancer MCF-7 cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 146, 353–362. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.010>
- Hofer, M., & Pospíšil, M. (2011). Modulation of Animal and Human Hematopoiesis by β -Glucans: A Review. *Molecules*, 16(9), 7969–7979. <https://doi.org/10.3390/molecules16097969>
- *Hongos de Chile: Atlas micológico*. (n.d.). Libros.uchile.cl. Retrieved April 11, 2022, from <https://libros.uchile.cl/files/presses/1/monographs/424/submission/proof/files/assets/basic-html/index.html#6>
- Huang, Q.-L., Siu, K.-C., Wang, W.-Q., Cheung, Y.-C., & Wu, J.-Y. (2013). Fractionation, characterization and antioxidant activity of exopolysaccharides from fermentation broth of a *Cordyceps sinensis* fungus. *Process Biochemistry*, 48(2), 380–386. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.01.001>
- Jeff, I. B., Yuan, X., Sun, L., Kassim, R. M. R., Foday, A. D., & Zhou, Y. (2013). Purification and in vitro anti-proliferative effect of novel neutral polysaccharides from *Lentinus edodes*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 52, 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.10.007>
- Ji, H., Yu, J., & Liu, A. (2019). Structural characterization of a low molecular weight polysaccharide from *Grifola frondosa* and its antitumor activity in H22 tumor-bearing mice. *Journal of Functional Foods*, 61, 103472. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103472>
- Kaur, R., Sharma, M., Ji, D., Xu, M., & Agyei, D. (2020). Structural Features, Modification, and Functionalities of Beta-Glucan. *Fibers*, 8(1), 1.

<https://doi.org/10.3390/fib8010001>

- Köwitsch, A., Zhou, G., & Groth, T. (2017). Medical application of glycosaminoglycans: a review. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 12(1), e23–e41. <https://doi.org/10.1002/term.2398>
- Kozarski, M., Klaus, A., Niksic, M., Jakovljevic, D., Helsper, J. P. F. G., & Van Griensven, L. J. L. D. (2011). Antioxidative and immunomodulating activities of polysaccharide extracts of the medicinal mushrooms *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma lucidum* and *Phellinus linteus*. *Food Chemistry*, 129(4), 1667–1675. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.06.029>
- Kozarski, M., Klaus, A., Nikšić, M., Vrvić, M. M., Todorović, N., Jakovljević, D., & Van Griensven, L. J. L. D. (2012). Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 26(1-2), 144–153. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2012.02.004>
- Liu, D., Sheng, J., Li, Z., Qi, H., Sun, Y., Duan, Y., & Zhang, W. (2013). Antioxidant activity of polysaccharide fractions extracted from *Athyrium multidentatum* (Doll.) Ching. *International Journal of Biological Macromolecules*, 56, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.01.023>
- Liu, F., Ooi, V. E. C., & Chang, S. T. (1997). Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. *Life Sciences*, 60(10), 763–771. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(97\)00004-0](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(97)00004-0)
- Masek, A., Latos-Brozio, M., Kałużna-Czaplińska, J., Rosiak, A., & Chrzescijanska, E. (2020). Antioxidant Properties of Green Coffee Extract. *Forests*, 11(5), 557. <https://doi.org/10.3390/f11050557>
- Oliva, E. M., Cirelli, A. F., & de Lederkremer, R. M. (1985). Structural studies on a glycopeptide from the tree fungus *Cyttaria harioi* Fischer. *Carbohydrate Research*, 138(2), 257–266. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(85\)85109-0](https://doi.org/10.1016/0008-6215(85)85109-0)
- OMS. (2022, February 2). *Cáncer* [Review of *Cáncer*]. Organización Mundial de La Salud. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Palacios-Espinosa, X., & Vargas-Sterling, L. P. (2012). Adherencia a la quimioterapia y radioterapia en pacientes oncológicos: una revisión de la literatura. *Psicooncología*, 8(2-3). https://doi.org/10.5209/rev_psic.2011.v8.n2-3.37890
- Palanisamy, S., Vinosha, M., Marudhupandi, T., Rajasekar, P., & Prabhu, N. M. (2017). Isolation of fucoidan from *Sargassum polycystum* brown algae: Structural characterization, in vitro antioxidant and anticancer

activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102, 405–412. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.182>

- Pandya, U., Dhuldhaj, U., & Sahay, N. S. (2018). Bioactive mushroom polysaccharides as antitumor: an overview. *Natural Product Research*, 33(18), 2668–2680. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1466129>
- Parra-Soto, S., Petermann-Rocha, F., Martínez-Sanguinetti, M. A., Leiva-Ordeñez, A. M., Troncoso-Pantoja, C., Ulloa, N., ... Celis-Morales, C. (2020). Cáncer en Chile y en el mundo: una mirada actual y su futuro escenario epidemiológico. *Revista Médica de Chile*, 148(10), 1489–1495. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872020001001489>
- Peterson, K. R., & Pfister, D. H. (2010). Phylogeny of *Cyttaria* inferred from nuclear and mitochondrial sequence and morphological data. *Mycologia*, 102(6), 1398–1416. <https://doi.org/10.3852/10-046>
- Pontón, J. (2008). La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25(2), 78–82. [https://doi.org/10.1016/s1130-1406\(08\)70024-x](https://doi.org/10.1016/s1130-1406(08)70024-x)
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine* 26: 1231-1237.
- Rodríguez Aguirre, O. E., Andrade Barreiro, W. A., Andrade Barreiro, W. A., Diaz Lopez, F. E., & Diaz Lopez, F. E. (2016). Actividad antioxidante de extractos de hojas de *Bocconia frutescens* L. (Papaveraceae). *Revista de Tecnología*, 14(2). <https://doi.org/10.18270/rt.v14i2.1868>
- Rozi, P., Abuduwaili, A., Mutailifu, P., Gao, Y., Rakhmanberdieva, R., Aisa, H. A., & Yili, A. (2019). Sequential extraction, characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Fritillaria pallidiflora* Schrenk. *International Journal of Biological Macromolecules*, 131, 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.029>
- Salazar Vidal, V. (2020). Actualización del conocimiento del género *Cyttaria* Berk. (Cytariales, Ascomycota) en Chile. *Boletín Micológico*, 35(1). <https://doi.org/10.22370/bolmicol.2020.35.1.2397>
- Salazar-Vidal, V., Figueroa, F., Soto, L., Pérez, C., Abdala-Díaz, R., & Becerra, J. (2020). Características nutricionales y efecto citotóxico de polisacáridos extraídos de los digüeños *Cyttaria berteroi* y *Cyttaria hariatii* presentes en Chile. *Revista Chilena de Nutrición*, 47(5), 750–756. <https://doi.org/10.4067/s0717-75182020000500750>

- Samavati, V. (2013). Polysaccharide extraction from *Abelmoschus esculentus*: Optimization by response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, 95(1), 588–597. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.02.041>
- Sánchez E. (2012). *Hongos comestibles y medicinales en Iberoamérica : investigación y desarrollo en un entorno multicultural*. Ecosur.
- Schepetkin, I. A., & Quinn, M. T. (2006). Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *International Immunopharmacology*, 6(3), 317–333. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2005.10.005>
- Smiderle, F. R., Alquini, G., Tadra-Sfeir, M. Z., Iacomini, M., Wichers, H. J., & Van Griensven, L. J. L. D. (2013). *Agaricus bisporus* and *Agaricus brasiliensis* (1→6)- β -D-glucans show immunostimulatory activity on human THP-1 derived macrophages. *Carbohydrate Polymers*, 94(1), 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.12.073>
- Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V., Reece, J. B., & Campbell, N. A. (2017). *Campbell biology* (11th ed.). Pearson Education, Inc.
- Vetvicka, V., Teplyakova, T. V., Shintyapina, A. B., & Korolenko, T. A. (2021). Effects of Medicinal Fungi-Derived β -Glucan on Tumor Progression. *Journal of Fungi*, 7(4), 250. <https://doi.org/10.3390/jof7040250>
- Wang, J., Hu, S., Nie, S., Yu, Q., & Xie, M. (2016). Reviews on Mechanisms of In Vitro Antioxidant Activity of Polysaccharides [Review of *Reviews on Mechanisms of In Vitro Antioxidant Activity of Polysaccharides*]. *Hindawi Publishing Corporation*.
- Wang, Q., Wang, F., Xu, Z., & Ding, Z. (2017). Bioactive Mushroom Polysaccharides: A Review on Monosaccharide Composition, Biosynthesis and Regulation. *Molecules*, 22(6), 955. <https://doi.org/10.3390/molecules22060955>
- Wang, J., Zhou, Z., Dan, D., & Hu, G. (2020). Physicochemical properties and bioactivities of *Lentinula edodes* polysaccharides at different development stages. *International Journal of Biological Macromolecules*, 150, 573–577. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.099>
- Wang, Y., Li, Y., Li, S., Li, Q., Fan, W., Kiatoukosin, L., & Chen, J. (2019). Extracellular polysaccharides of endophytic fungus *Alternaria tenuissima* F1 from *Angelica sinensis*: Production conditions, purification, and antioxidant properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 133, 172–183. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.246>
- Weinberg, R. A. (1996). How Cancer Arises. *Scientific American*, 275(3), 62–70. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0996-62>
- Whittaker, R. H. (1969). New Concepts of Kingdoms of Organisms. *Science*, 163(3863), 150–160.

<https://doi.org/10.1126/science.163.3863.150>

- Williams, D. L., Sherwood, E. R., Browder, I. William., McNamee, R. B., Jones, E. L., Rakinic, J., & Di Luzio, N. R. (1988). Effect of glucan on neutrophil dynamics and immune function in Escherichia coli peritonitis. *Journal of Surgical Research*, 44(1), 54–61. [https://doi.org/10.1016/0022-4804\(88\)90122-9](https://doi.org/10.1016/0022-4804(88)90122-9)
- Wu, J.-Y., Siu, K.-C., & Geng, P. (2021). Bioactive Ingredients and Medicinal Values of Grifola frondosa (Maitake). *Foods*, 10(1), 95. <https://doi.org/10.3390/foods10010095>
- Xu, X., Yan, H., Chen, J., & Zhang, X. (2011). Bioactive proteins from mushrooms. *Biotechnology Advances*, 29(6), 667–674. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.003>
- Xu, Y., Zhang, X., Yan, X.-H., Zhang, J.-L., Wang, L.-Y., Xue, H., Jiang, G.-C., Ma, X.-T., & Liu, X.-J. (2019). Characterization, hypolipidemic and antioxidant activities of degraded polysaccharides from Ganoderma lucidum. *International Journal of Biological Macromolecules*, 135, 706–716. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.166>
- Yera, R. A. M., Pérez, L. S., & Díaz, A. T. (2018). Cardiotoxicidad inducida por quimioterapia. *CorSalud*, 10(1), 68–77. <http://www.revcorsalud.sld.cu/index.php/cors/article/view/295/635>
- Zhang, L., Zhang, X., Zhou, Q., Zhang, P., Zhang, M., & Li, X. (2001). Triple Helix of β -D-Glucan from Lentinus Edodes in 0.5 M NaCl Aqueous Solution Characterized by Light Scattering. *Polymer Journal*, 33(4), 317–321. <https://doi.org/10.1295/polymj.33.317>
- Zhang, Z., Lv, G., Jiang, X., Cheng, J., & Fan, L. (2015). Extraction optimization and biological properties of a polysaccharide isolated from Gleoestereum incarnatum. *Carbohydrate Polymers*, 117, 185–191. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.09.059>