“Estudio de potenciales estrategias terapéuticas para carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello y glioblastomas”

Tesis presentada para optar al título de

Doctor en Bioquímica de la Universidad Nacional del Sur.

Farmacéutico: Diego Javier Obiol

Directores: Dra. María Marta Facchinetti y

Dr. Alejandro Carlos Curino

LABORATORIO DE BIOLOGÍA DEL CÁNCER - INIBIBB - CCT BAHÍA BLANCA

Bahía Blanca **Argentina**

2016

Prefacio

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Bioquímica de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Biología del Cáncer del Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB), integrante del centro Científico y Tecnológico Bahía Blanca (CONICET-UNS) durante el período comprendido entre el 1 febrero 2013 y 21 abril 2017 bajo las direcciones de la Dra. María Marta Facchinetti, Investigadora Independiente del CONICET y del Dr. Alejandro Carlos Curino, Investigador Independiente del CONICET.

El presente trabajo de tesis fue financiado con subsidios otorgados por el CONICET (PIP), por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT-PICT) y por la Secretaria de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional del Sur (PGI).

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el …./…./…… , mereciendo la calificación de .....(……)

“Hay hombres que de su cencia

Tienen la cabeza llena;

Hay sabios de todas menas,

Más digo sin ser muy ducho,

Es mejor que aprender mucho

El aprender cosas buenas”

Martin Fierro – José Hernández

“Tal vez no duela tanto saber poco

Todo se aprende pero nunca alcanza

Lo pior transita el mundo de la idea”

Por ser un solo – José Larralde

Dedicatoria

Especialmente a Florencia Micaela Ortiz:

"*Hoy el sol no hace falta, está en receso*

La vitamina D me la das tú con un beso"

Ojos color sol – Calle 13

A Don Ernesto Sabato

A los "que la pelearon al lado, de cerca o muy lejos

Y no pudieron reír sin llorar"

Rocanroles sin destino – Callejeros

Agradecimientos

"La frase "la persona se hizo sola" no existe, carece de veracidad. Todos estamos hechos por otras miles de personas. Cada ser que hizo algo bueno por nosotros, o nos dijo algunas palabras de aliento o aprobación, influyó en nuestra personalidad y nuestros hechos. Es por eso que se vuelven parte de cualquier éxito ***nuestro****" George Matthew Adams, escritor.*

En Heterodoxia, Don Ernesto Sabato –un abuelo postizo– dijo: "De las tres facultades del hombre, la ciencia sólo se vale de la inteligencia y con ella ni siquiera podemos cerciorarnos de que existe el mundo exterior. ¿Qué podemos esperar de problemas infinitamente más sutiles? La realidad no sólo está constituida de silicatos o planetas, aunque buena parte de los hombres de ciencia parezcan creerlo. Un amor, un paisaje, una emoción, también pertenecen a la realidad."

Procedo como lo expresó W. Whitman, "Adviértalo ahora, no profiero discursos ni hago caridad. Cuando doy, me doy todo yo". Un doctorado nunca es un conjunto de resultados, frutos de experiencias frustradas y exitosas. Un doctorado es el resultado de fracasos, pérdidas, desventuras, desasosiegos, injusticias, azar, suerte, lógica, razón, entendimiento y logros. Un doctorado sólo se soporta con el mundo exterior, el holográfico, el que la ciencia no puede demostrar; se resiste con paisajes, amor y emociones que te libran de las malas voluntades. Desconozco si fue una locura emplear parte de mi juventud en esta tarea que concluí debido a que soy una persona con palabra y que siempre le pone el pecho a las balas; y porque, además, como decía Don Ernesto "hay una manera de contribuir a la protección de la humanidad, y es no resignarse".

Esta parte de mi vida me resuena como "El olvidao" (chacarera de Néstor Garnica). Nunca supe bien hacia dónde iba el camino, pero me gusta caminar y transité este sendero. Don Ernesto, además decía que "El hombre libre, el herético, el solitario, tiene que estar poseído de un valor casi demencial." Soy libre y solitario, que junto con mi palabra, son mis grandes valores, y en este sendero he caminado solo, pero no en soledad. Como declara el proverbio Chino "sí caminas acompañado, llegarás más lejos" porque "es el otro el que siempre nos salva. Y sí hemos llegado a la edad que tenemos es porque otros nos han ido salvando la vida, incesantemente" (Don Ernesto Sabato). Por lo tanto, cargo con una pesada deuda con todos los involucrados en lo transitado. Por esto, y como dijo José Larralde "Si me permite templar y no se muestra impaciente, si me deja que me asiente y no me saca apurao, capaz que dentro del pasao y me llego hasta el presente".

Agradezco con un orden muy especial que no quiere significar más que una manera particular de ver las contribuciones sin que el orden de aparición tenga algo que ver con su significancia.

Al Universo que conspiró para que fuese lo que soy y que creó a las montañas, cómplices de cada latido de mi introspección. Recuerdo que a la edad de 10 años miraba, inalcanzable, un juego de química en una librería de mi barrio. Por otra parte, también recuerdo que me demoraba en el baño leyendo un vademécum y reconocía medicamentos, enfermedades y bacterias. Comprendo que el Universo, quizás algo de su fuerza/materia oscura, o mediante sus ondas gravitacionales, manipuló las cuerdas de manera que, aunque me saliese del cauce unas cuántas veces, terminara una carrera de grado y posgrdo que aglomera ambos intereses.

A cada ratoncito/a que, involuntariamente, sacrificó su vida en pos de esta tesis; espero inmortalizar sus almas en alguna obra de teatro o novela, para demostrar mi agradecimiento y para poder sacarlos definitivamente de mis pesadillas.

A mí madre, Nilda Yolanda Viñuela que junto con muchos secretos me entregó la vida y las virtudes necesarias para ser un hombre de bien.

A mí padre, Sergio Bonazelli (Q.E.P.D.), que junto con mi madre se dedicaron en formarme con el apoyo y la confianza como estandartes. A Néstor Curvetto y Gabriela Balogh ya que sin su confianza no hubiese podido regresar a Bahía y transitar los últimos meses de vida de mi padre con él.

A mi hermano Alfredo Obiol que me permitió dormir en su sillón y que me acompañó y alimentó en momentos críticos. Además, por mostrarme el sendero musical, permitirme el ingreso a su maravillosa banda de música y de locos “Dejá Igor” (Integrantes: Alfredo Obiol, Agustin Rodriguez, Fabricio Carballo, Nicolás Waisman y Claudia Yungblut- A quienes agradezco enormemente), sigamos rockeando; y por traer al mundo, junto con su compañera Virginia Rivas, a un hermoso bati-sobrino, Bruno Obiol.

A Mica y Fiore, las damas que hacen de mis días más oscuros los más luminosos, de los más luminosos los más inolvidables y de una simple casa mi hogar. A Mica (my personal teacher) que se ha convertido en carne de mi carne, en alma de mi alma, en cómplice y culpable, en comienzo y en final, en día y en noche, en besos y abrazos, en fe y amor, amiga y amor, vida y amor. Sin vos nada hubiese conseguido, ni siquiera el continuar con vida. Te amo con todo lo que soy, con todo lo que tengo, con todo lo que sueño… sencillamente, con todo.

A mis amigos: a los viejos, a los nuevos, a los del norte, a los del sur, a los del mundo y a los que ya no están porque todos, sin excepción y con mucha paciencia, aprendieron a aceptarme y quererme con esta incorregible manera de ser. A Juan Carlos Ocampos quien me alojó y me concedió el honor de ser el padrino de su primer hijo, Nicolás; A Aldana Amoreo, mi más antigua amiga, compañera de pasiones montañesas y de mudanzas urgentes; A Cristian Konrad, amigo férreo desde la infancia; A Nicolás Quintana, a Mariana Nicolau, a Juan Perloti, a Analía Pereira y a Leo Soulé, entrañables compañeros y colegas que me regalo la UNS. A Marcos Flores por enseñarme a transitar la montaña. A Valeria Placella. A Alfredo Omar Paschetta. A Ismael Islas. A José Lormino (Q.E.P.D), nos quedó un fernet pendiente. A Juan Carlos Lo Presti (Q.E.P.D.), nos quedaron largas conversaciones sin terminar. A Raúl Herrero por su amistad y por mantener la puerta siempre abierta de mi otro hogar, el gimnasio Orion.

Al pueblo argentino que con sus impuestos financiaron mi excelente educación, y el mantenimiento y desarrollo de las diferentes infraestructuras por las que he navegado/naufragado.

A los Doctores M. Marta Facchinetti y Alejandro Curino por rescatarme del desahucio del abandono y la acefalía; y por guiar mi desempeño en el proceso de la invaluable formación científica. A María Marta por su abnegada corrección de la tesis.

A la Universidad Nacional del Sur, al Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB) y al CONICET por todo el apoyo brindado.

Al maravilloso grupo de escritores de “Palabras en Libertad” que me tienen más fe que la que jamás podré tenerme: Cecilia Stanziani, Lis Murphi, Rodrigo Holzman, Cristina Amadei y Anny Guerrini. Además, a cada institución que honró alguno de mis textos ya que cada uno de esos reconocimientos me sostuvieron sobre la Tierra. Al centro de escritores de Cipoletti que premió mi primer cuento y puso mi nombre al siguiente concurso literario en el género narrativa. A Jeremías Vergara, gran escritor, que confió en mí para que escribiera la contratapa de su libro “El escritor maldito”.

A Maximiliano Bidegain por responder cada inquietud con respecto a su valioso extracto de esporas de Reishi, por su amistad y apoyo.

A Pablo De Genaro, un amigo dentro y fuera del instituto. Recuerdo con más satisfacción las tardes de entrenamiento en el gimnasio que las citometrías. Nunca olvidaré que me advertiste. Al Bqco. Alejandro López Romero por su buena predisposición con la citometría de flujo. Al Dr. Mario Alfredo Quevedo por su invalorable colaboración con los ensayos computacionales.

A mis compañeros de Laboratorio que son grandes culpables en conseguir que esta “cabeza de tractor” llegue hasta esta instancia. A María Julia Ferronato. A María Eugenia Fermento. A Débora Salomón. A Norberto Ariel Gandini. Y, especialmente a Nancy Andrés por marcarme el rumbo de los vientos donde he encontrado la libertad. A Julián Arévalo por permitirme acompañarlo en el rumbo de las intoxicantes letras y por su hermoso y valeroso gesto que atesoraré por el resto de mi eternidad (http://institutoculturallatinoamericano.blogspot.com.ar/2014_06_01_archive.html).

A Sebastián Farías y a Jorge Oyola por tener siempre apartada una silla para mí en los almuerzos del buffet.

A Marcelo Costabel y a Silvia Antollini por el privilegio de su confianza.

A Ramiro Montero, a Luciana Querejazú, Natalia Piunno y Juan Andriach por seguir el camino de la amistad.

A Quique (Luis Politi) por confiar en mí sus textos, por compartir la pasión por la escritura y, sobre todo, por su amistad. A cada uno de los integrantes de su laboratorio que me asesoraron en diversas técnicas y especialmente agradezco a Facundo Prado Spalm por su amistad, ayuda, compañerismo, complicidad y etc y etc y etc una gran persona.

A Eugenio Aztiria por su amistad, consejos y por su compañía en alguna aventura. A Javier Baier por su colaboración y aceite para los pistones de mi trompeta. A Cecilia Bouzat por sus consejos, comprensión y defensa. A Romina Uranga y Jeremías Corradi por su amistad, buena onda y acompañamiento. A Martin Oresti por prestarme infinidad de horas y de veces la cámara de Neubauer, espero llevármela de recuerdo. A Pablo Milano por sus consejos. A Viviana Soler y Leticia Cabral por sus buenas ondas. A Susana González por sus palabras y consejos. A Horacio Díaz por la buena onda y complicidad. A Pablo Marinangeli por conseguir una solución en tiempos insolubles. A los guardias y serenos que me han dejado ingresar al instituto en horarios tan incómodos como las 05:00 a.m.

Por último, quiero agradecer a mi padre biológico, quien me condenó con su impía palabra cuando predijo “no vas a ser nada” ya que esa frase fue el combustible que mantuvo mi motor en funcionamiento, “soy como un tren de carga, tengo un solo carril y en un sentido la marcha” (Patxi Andion).

Quizá porque he nacido para apostar el cuero es que mi vida ha sido un avatar de desprecio psicológico, engaños, maltratos, deslealtades, soledad, injusticias, alienación y tristeza. Sin embargo, mi estancia en el doctorado significó un desafío mucho mayor, un reto gigantesco para mi voluntad (“*ad astra per aspera*”). Sé que, por ser obstinado, estoy

condenado a galopar contra el viento. Nada hubiese conseguido ni soportado sin el apoyo de todos mis amigos y de mi familia. Ustedes son la justificación de mi resiliencia, quienes me permitieron seguir cantando y comprender que “El mundo nada puede contra un hombre que canta en la miseria” (Don Ernesto Sabato), los que me ayudaron a reconstruirme, “El hombre que se levanta es aún más fuerte que el que no ha caído” Viktor Frankl y más fuerte aún quien se levanta con la mochila cargada de piedras como la mía.

“¡¡¡Gracias, totales!!!”

P.D.: ¨sería fantástico que la ciencia fuese neutral” - Sería fantástico, Joan Manuel Serrat.

Resumen

"y se enorgullecían de los grandes triunfos de su ciencia, por el solo
Hecho de haber reemplazado el auge de la viruela por el del cáncer"
Dr. E. Sabato

Cinco décadas de descubrimientos de agentes antineoplásicos han generado una interesante batería de agentes quimioterapéuticos; sin embargo, aunque resultan útiles, se requieren agentes más efectivos ya que estos compuestos tienen poco impacto en las tasas de supervivencia o en la calidad de vida del paciente, especialmente en algunos tipos de cáncer, tales como el Carcinoma Celular Escamoso de Cabeza y Cuello (CCECC) y el Glioblastoma Multiforme (GBM). El presente trabajo de tesis describe resultados que demuestran la potencialidad terapéutica de dos productos sintéticos (análogos del calcitriol) y un compuesto natural (extracto triterpénico de las esporas de *Ganoderma lucidum*) como agentes terapéuticos en estos dos tipos de cáncer.

El calcitriol (1α, 25$(OH)_2$-vitamina D_3) es esencial para el mantenimiento de la salud debido a su participación en un crisol de procesos fisiológicos como el control del metabolismo fosfo-cálcico, el crecimiento celular y el sistema inmune. Este compuesto, además, posee potenciales propiedades preventivas y terapéuticas contra diversas enfermedades hiperproliferativas como el cáncer, pero debido a la hipercalcemia que produce al seguir la posología terapéutica, se ve limitado su empleo como agente antitumoral. Por dichos motivos, se sintetizan análogos del calcitriol con el fin de encontrar alguno/s que presenten efectos antitumorales pero que carezcan de los efectos calcemiantes. Nuestro laboratorio, en conjunto con un grupo de investigación de Química Orgánica de la Universidad de Vigo, diseñamos y sintetizamos análogos del calcitriol que contienen un grupo oxolano o un grupo amida en la cadena lateral con el fin de estudiar su potencialidad terapéutica en cáncer. Como parte de este trabajo de tesis evaluamos si estos análogos podían ser efectivos como agentes antitumorales en CCECC y GBM.

Por otra parte, la metodología más empleada en la búsqueda de nuevos principios activos naturales es la bioprospección, que incrementa en diez veces la probabilidad de éxito. En la actualidad, el Instituto Nacional del Cáncer (NCI) de USA está intensificando la búsqueda de metabolitos provenientes de la naturaleza para el descubrimiento de nuevas drogas debido a la gran variedad de compuestos que se encuentran en los productos naturales. *Ganoderma lucidum* es un reconocido hongo comestible y medicinal, empleado por más de dos mil años por la medicina tradicional China, India y Japonesa. Dentro de

los efectos farmacológicos se documentaron sus propiedades antitumorales y contiene más de 400 compuestos bioactivos, entre ellos los triterpenoides (la actividad antitumoral se le atribuye a ellos), polisacáridos, nucleótidos y esteroles. También, como parte de este trabajo de tesis comenzamos a evaluar la actividad antitumoral, para el CCECC y los GBM, del extracto triterpénico de las esporas de este hongo producidos por el Laboratorio de Hongos Comestibles y Medicinales, CERZOS-CCT-Bahía Blanca-CONICET.

Abstract

Five decades of research of anticancer agents have generated an interesting battery of chemotherapeutic agents; however, even though it is useful, more effective agents are needed since these have little impact in survival rates or in the patient's life quality, particularly in certain kinds of cancer, such as head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) and glioblastoma multiforme (GBM). This thesis describes results that demonstrate the therapeutic feasibility of two synthetic products (analogues of calcitriol), and a natural compound (extract triterpene *Ganoderma lucidum* spores) as therapeutics agents in these two kind of cancer.

Calcitriol (1α, 25$(OH)_2$-vitamin D3) is essential for the maintenance of health due to its participation in a crucible of physiological processes such as the control of phospho-calcic metabolism, cell growth and immune system. Moreover, this compound has potential preventive and therapeutic properties against various hyper proliferative diseases such as cancer, but due to the hypercalcemia that causes the therapeutic dosage, its use as antitumoral agent is limited. For these reasons, analogues of calcitrol were synthesized to evaluate if any of them shows antitumor effects but lacking calcemiantes effects. Our lab together with a research group Organic Chemistry at the University of Vigo designed and synthesized analogues of calcitriol that contain an oxolane or amide group in the side chain with the goal of studying its therapeutic potentiality in cancer. In this thesis we evaluate if these new analogues can be effective as antitumoral agents in CCECC and GBM.

Furthermore, the most used methodology in the search of new natural assets is bioprospecting, increasing tenfold the chances of success. At present, the National Cancer Institute (NCI) of USA is putting emphasis on the search of metabolites from nature for drug discovery because of the wide variety of compounds found in nature. *Ganoderma lucidum* is a recognized edible and medicinal mushroom used for over two thousand years by traditional Chinese, Indian and Japanese medicine. Among the pharmacological effects, its anti-tumor properties were documented and contains over 400 bioactive compounds among them triterpenoids (antitumor activity is ascribed to them), polysaccharides, nucleotides and sterols. In this thesis we also evaluate the antitumoral activity on CCECC and GBM of triterpene extract spores of this fungus produced by the Laboratory of Edible and Medicinal Mushrooms, CERZOS-CCT-CONICET-Bahia Blanca.

Abreviaturas

µPA, activador del plasminógeno tipo uroquinasa

ADN, ácido desoxirribonucleico

Akt, Proteína quinasa B

ANOVA, análisis de la varianza

AP-1,proteína activadora 1

APS, amonio persulfato

ATB, antibiótico-antimicótico

ATP, adenosintrifosfato

AUC, área bajo la curva

BCa, cáncer de mama

BME, β-Mercaptoetanol

BSA, suero albumino bovino

Ca^{2+}, calcio

CCECC, carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello

Cmax, concentración máxima

COX-2, ciclooxigenasa 2

DCDCDHF, 5 o 6 2´7´diacetato de diclorofluoresceína

DMEM, Dolbecco´s Modified Eagle Medium

DMSO, dimetilsulfóxido

DO, densidad óptica

ECM (MEC), matríz extracelular

EDTA, etilen-diaminetra-ácido acético

EGFR, receptor del factor de crecimiento epidérmico

EMT, transición epitelio mesenquimal

G., *Ganoderma*

GBM, glioblastoma multiforme

Gl, *ganoderma lucidum*

H, hemina

h, hora/s

HIFα, factor inducible por hipoxia, subunidad α

HO-1, hemoxigenasa-1

HPV, virus de papiloma humano

IC_{50}, concentración inhibitoria media

IF, inmunofluorescencia

IGFBP-2, factor de crecimiento tipo insulínico unido a proteína 2

IGFR, factor de crecimiento insulínico tipo 1

IL-6 y 8, interleuquina 6 y 8

IP, ioduro de propidio

LBD, dominio de unión a ligando

LDH, lactato deshidrogenasa

LOH, pérdida de heterocigocidad

MD (DM), dinámica molecular

MMP 2/8/9, metaloproteinasa 2/8/9

NAC, N-acetil-cisteína

$NADP^+$,nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NEA, noreste argentino

NF-kβ, factor nuclear kβ

NOA, noroeste argentino

OMS, organización mundial de la salud

PAGE, electroforesis en gel de poliacrilamida

PBS, buffer fosfato salino

PCa, cáncer de páncreas

pdb, protein data bank

PDGF-R, receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas

PGDH15, hidroxi prostaglandina des hidrogenasa 15

PGs, prostaglandinas

PIP3, fosfatidil inositol trifosfato

PKB, proteín quinasa B

PTEN, fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa

PTH, parathormona

PVDF, polifluoruro de vinilideno

RB, reactivo de Bradford

Rb, retinoblastoma

ROS, especies reactivas de oxígeno

rpm, revoluciones por minuto

RXR, receptor X retinoide

SD, desvío estándar

SDS, duodecil sulfato de sodio

SFB, suero fetal bovino

SNC, sistema nervioso central

TBARS, sustancia reactiva a ácido tiobarbitúrico

TBS, tris bufer salino

TEMED, N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina

TGF-β, factor de crecimiento transformante

TIMP 1 y 2, inhibidor de metaloproteinasa 1 y 2

TNFα, factor de necrosis tumoral

TNTs, nanotubos (tunneling nanotubes)

TRIS, tris (hidroximetil) aminometano

TritonX-100, octil fenoxi polietoxietanol

Tween-20, polioxietileno (20) sorbitan monolaurato

UAF, unidades arbitrarias de fluorescencia

V, vehículo

VDBP, proteína unidora de Vitamina D

VDR, receptor de la Vitamina D

VDRE, elementos de respuesta a Vitamina D

VEGF-β, factor de crecimiento endotelial vascular

Índice

“La palabra es el índice del pensamiento.”
Séneca

Resumen 10
Abstract 12
Abreviaturas 13
Introducción general 21
Generalidades 22
Epidemiología 24
Carcinoma Celular Escamoso de Cabeza y Cuello (CCECC) 27
Generalidades de tumores del SNC 32
Primera parte: estudio de estrategias terapéuticas para CCECC y GBM, basadas en la síntesis de nuevos análogos del calcitriol 41
Vitamina D 42
Generalidades 42
Funciones biológicas y mecanismo de acción 42
Deficiencia e insuficiencia de vitamina D 44
Vitamina D y la prevención del cáncer 46
Efectos antitumorales de compuestos de la vitamina D 46
Efectos sobre la proliferación y diferenciación celular 47
Efectos sobre la muerte celular 48
Efectos sobre la angiogénesis y la metástasis 49
Efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores 50
Efectos sobre la reprogramación del metabolismo energético 51
Efectos sobre la respuesta al daño al ADN 51
Aplicaciones terapéuticas del calcitriol y análogos en cáncer 52
Análogos del calcitriol en ensayos clínicos 53
Estudios de calcitriol y análogos en Carcinoma Celular Escamoso de Cabeza y Cuello y en Glioma 54
Hipótesis y Objetivos 58
Materiales y Métodos 61
Materiales 62
Células utilizadas 62
Cepas de ratón utilizadas 62
Métodos 63
Síntesis del calcitriol y sus análogos 63

Síntesis del calcitriol 63
Síntesis del análogo AM-27 63
Síntesis del análogo ML-344..... 65
Preparación de la solución stock de calcitriol y análogos 66
Análisis de la actividad calcemiante 67
Tratamientos con calcitriol y análogos 68
Cultivos Celulares 69
Mantenimiento de los cultivos celulares 69
Ensayos Celulares 69
Análisis de la viabilidad celular: conteo manual de células en cámara de Neubauer y ensayo WST-1 69
Análisis de la migración celular 70
Análisis del ciclo celular por citometría de flujo 71
Análisis de TUNEL 72
Análisis del potencial de membrana mitocondrial 72
Análisis de la liberación de lactato deshidrogenasa..... 72
Ensayos *in vivo* 73
Modelo de xenotrasplante subcutáneo de células HN12 en ratones inmunosuprimidos 73
Modelo singeneico subcutáneo de células de GBM en ratones C57BL/6 74
Ensayos Histológicos. Procesamiento de órganos y tumores para histología..... 75
Estudios computacionales..... 75
Análisis estadístico..... 77
Resultados..... 78
Discusión y Conclusiones 105
Segunda Parte: estudio de estrategias terapéuticas para CCECC y GBM, basadas en el extracto triterpénico de las esporas del hongo *Ganoderma lucidum* 112
Generalidades..... 113
Ganoderma lucidum 116
Triterpenoides..... 118
Acción antitumoral del *Ganoderma lucidum*..... 118
Mecanismos de acción conocidos..... 119
Arresto del ciclo celular..... 119
Citotóxico..... 119

Antiangiogénico 120
Antimetastásico 120
Antioxidante 120
Antiinflamatorio 121
Inmunoestimulador 121
Hipótesis y Objetivos 123
Materiales y Métodos 126
Materiales 127
Reactivos y drogas 127
Preparación de la solución stock de Hemina 127
Anticuerpos 128
Preparación del extracto isopropanólico de las esporas de *Ganoderma lucidum* 128
Extracción alcohólica de las esporas de *Ganoderma lucidum* 128
Determinación del contenido total de triterpenoides 128
Líneas celulares empleadas 129
Cepas de ratón utilizadas 129
Cultivo Celular 129
Mantenimiento de los cultivos celulares 129
Ensayos Celulares 130
Análisis de la viabilidad celular: conteo manual de células en cámara de Neubauer y ensayo WST-1 130
Análisis de la migración celular 130
Análisis del estrés oxidativo celular 130
Análisis de proteínas. SDS – PAGE y Western Blot 131
Análisis del ciclo celular por citometría de flujo 133
Análisis de la inducción de apoptosis, TUNEL 134
Análisis del potencial de membrana mitocondrial 134
Análisis de la liberación de lactato-deshidrogenasa 134
Ensayos *in vivo* 134
Evaluación de toxicidad sub-aguda en la cepa de ratón CF-1 134
Análisis estadístico 135
Resultados 136
Discusión y Conclusiones 151

Conclusiones finales del trabajo de tesis 157
Referencias 158
PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS 180

Introducción general

"El lenguaje de la ciencia es el lenguaje de la verdad"
Dr. E. Sabato

Generalidades

El cáncer es una enfermedad genética. Sin embargo, tal como escribieron Bert Vogelstein y Kenneth Kinzler en 1993 en el trabajo titulado "*The multistep nature of cancer*" (Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. 1993), hay dos diferencias fundamentales entre el cáncer y la mayoría de las otras enfermedades genéticas: en primera instancia, el cáncer (en su mayoría) está causado por mutaciones somáticas mientras que los otros tipos de enfermedades genéticas de los mamíferos están causados por mutaciones en la línea germinal; en segunda instancia, cada cáncer individual proviene no de una sola mutación sino de la acumulación de varias mutaciones. Cada nueva mutación impulsa una ola de multiplicación celular que conduce de manera gradual al crecimiento del tamaño tumoral, a la desorganización del tejido y por ende a la malignidad. Desde esa definición de la naturaleza "*multistep*" del cáncer a la fecha han ocurrido grandes avances en oncología, entre ellos el reconocimiento de los cambios epigenéticos como importantes participantes en el desarrollo de esta enfermedad. De manera que en la actualidad se describe el cáncer como una sucesión de cambios en el genoma y en el epigenoma (ambos cambios heredables en los programas de expresión de genes) de las células tumorales (Chaffer, C. L., & Weinberg, R. A. 2015).

Por lo tanto, esta enfermedad es el resultado de la acumulación clonal de células que presentan una sucesión de alteraciones genéticas y epigenéticas en los circuitos que regulan su comportamiento normal y que les confieren fenotipos ventajosos. Eventualmente, las descendientes de estas células adquirirán otra alteración ventajosa lo cual llevará otra vez a una expansión clonal. A través de esta secuencia de pasos, las células normales de un tejido evolucionan a fenotipos cada vez más malignos, culminando en una población celular altamente agresiva que amenaza la vida del paciente.

Esta evolución maligna implica la adquisición, por parte de las células, de ciertas capacidades definidas orignalmente por Hanahan y Weinberg (Hanahan, D., & Weinberg, R. A., 2011) y que comprenden: el mantenimiento de la señalización proliferativa, la evasión de los supresores de crecimiento, la resistencia a la muerte celular, la inducción de la angiogénesis, la activación de la invasión y la implantación metastásica. También, estos autores describieron que intervienen dos *características facilitadoras* que promueven la adquisición de las capacidades mencionadas y que son la inflamación y la inestabilidad genética y dos *características emergentes*: la reprogramación del metabolismo energético y la evasión del sistema inmune (figura 1).

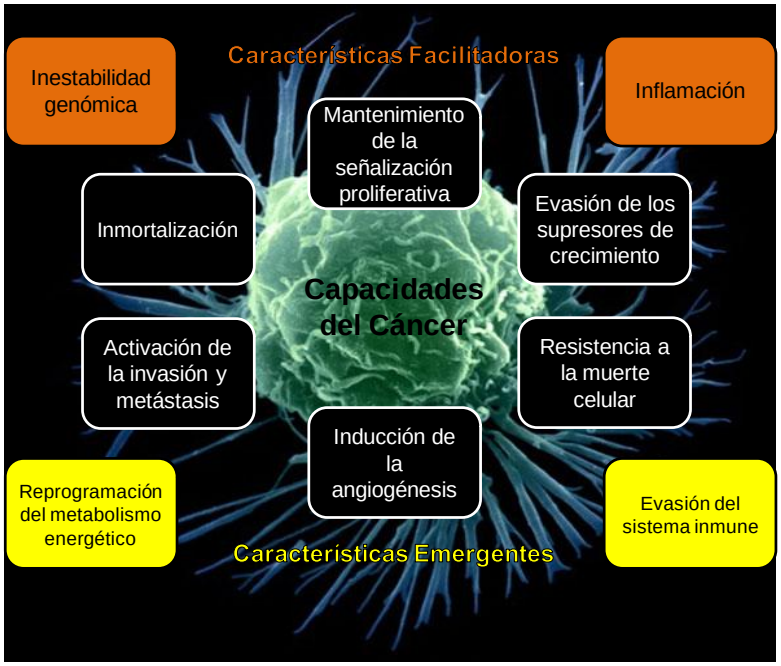


Figura 1. Capacidades adquiridas, facilitadoras y emergentes que conducen al desarrollo de cáncer. Tomado y adaptado de Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011).

Hay abundante evidencia que demuestra que las alteraciones genéticas y epigenéticas mencionadas anteriormente podrían darse en poblaciones de células madre que se encuentran en los tejidos (Chaffer, C. L., & Weinberg, R. A. 2015). De toda esta evidencia se ha propuesto un modelo en el cual las células madre normales de un tejido son el blanco de las transformaciones oncogénicas iniciales. Así, esta celula madre levemente alterada, que posee un cambio heredable, produciría un clon de células con este cambio. Este proceso se repetiría con cada subpoblación de células alteradas presentando este y nuevos cambios heredables, llegando finalmente a las células madre cancerosas presentes en un tumor maligno (Visvader, J. E., 2011).

Sin embargo, los tumores no son sólo el resultado de la adquisición de las mencionadas capacidades debido a las alteraciones genéticas y epigenéticas que ocurren en las células descriptas. Son, además, la consecuencia de las contribuciones del microambiente tumoral. Los tumores son tejidos complejos que presentan interacciones heterotípicas entre muchas células de diferentes tipos como las células madres tumorales, las células endoteliales, los pericitos, las células inflamatorias inmunes, los fibroblastos y las células madres y progenitoras del estroma (figura 2, A). Los múltiples tipos de células estromales crean una sucesión de microambientes tumorales que habilitan al tumor a invadir tejidos

normales, implantarse en un tejido normal distante y colonizarlo (figura 2, B) (Hanahan, D., & Weinberg, R. A., 2011).

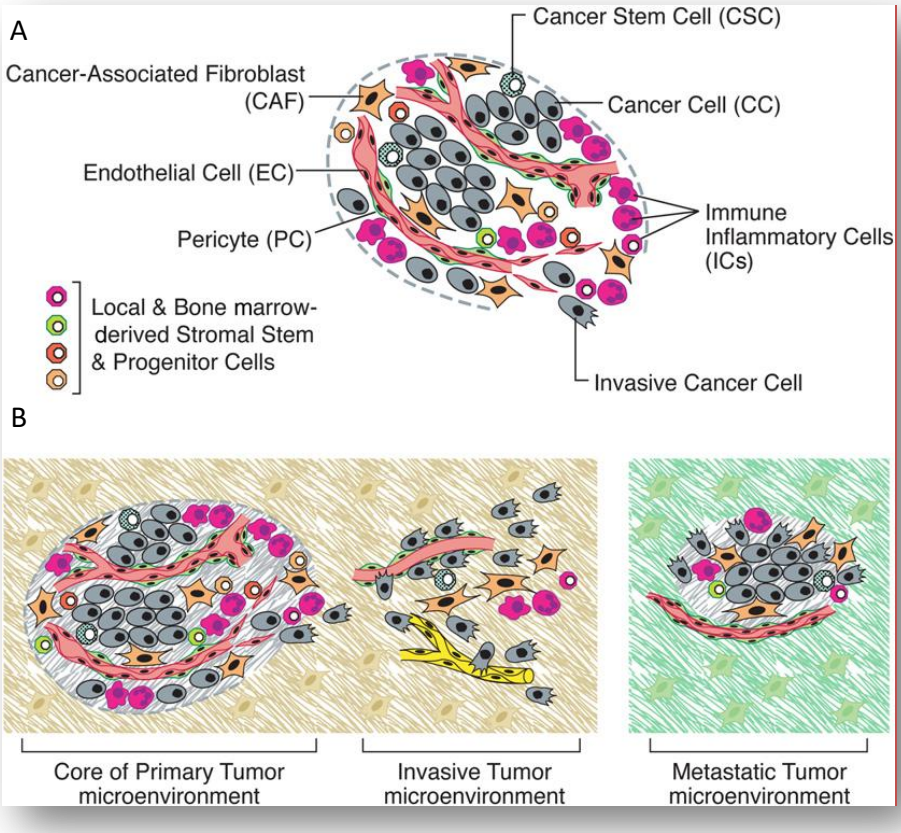


Figura 2. Microambiente tumoral. (A) El parénquima y el estroma tumoral contienen diferentes tipos y subtipos celulares que colaboran con el desarrollo tumoral. (B) Diferentes microambientes tumorales. La abundancia celular, la organización histológica y las características fenotípicas de los diferentes tipos de células estromales y de la matriz extracelular evolucionan con el desarrollo permitiendo el crecimiento, la invasión y la metástasis. Tomado deHanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011).

Epidemiología

El cáncer no es raro en ninguna parte del planeta, según las estimaciones de la Agencia Internacional de Investigación de Cáncer (IARC) quien, desde hace tres décadas, publica estimaciones periódicas de incidencia y mortalidad por cáncer (figura 3) (Ferlay, J. et al., 2010). De acuerdo a estas estimaciones, en 2012 se diagnosticaron 14,1 millones de nuevos casos a nivel mundial (no incluye los tumores de piel no melanómicos), de los cuales 8 millones ocurrieron en países económicamente menos desarrollados. En relación

a los índices de mortalidad para ese mismo año, se estimaron 8,2 millones de muertes, de las cuales 5,3 millones ocurrieron en países poco desarrollados. Lamentablemente, se espera que los casos anuales de cancer aumenten de 14 a 22 millones en las próximas dos décadas debido, simplemente, al aumento y envejecimiento de la población (American Cancer Society, 2015) (WHO, 2012). En los países económicamente desarrollados los tres cánceres más diagnosticados son, en hombres: cáncer de próstata, de pulmón y colorrectal; y, en mujeres: cáncer de mama, colorrectal y de pulmón. En los países en vías de desarrollo en cambio, los tres tumores más diagnosticados son pulmón, hígado y estómago en los varones; y mama, útero y pulmón, en las damas. Específicamente, la República Argentina se encuentra dentro del rango de países con incidencia de cáncer media-alta (172,3-242,9 x 100.000 habitantes), de acuerdo a las estimaciones realizadas por la IARC para el año 2012 (figura 4). Este mismo organismo ha estimado para el país una incidencia en ambos sexos de 217 nuevos casos, cada 100.000 habitantes por año basándose en datos provenientes de Registros de Cáncer de Base Poblacional del País. El cáncer de pulmón ocupa el primer lugar de importancia en todas las regiones de Argentina, seguido por el cáncer colorrectal y el de mama (excepto en el noroeste argentino y en la región sur, donde se observó en tercer término al cáncer de próstata y estómago, respectivamente).

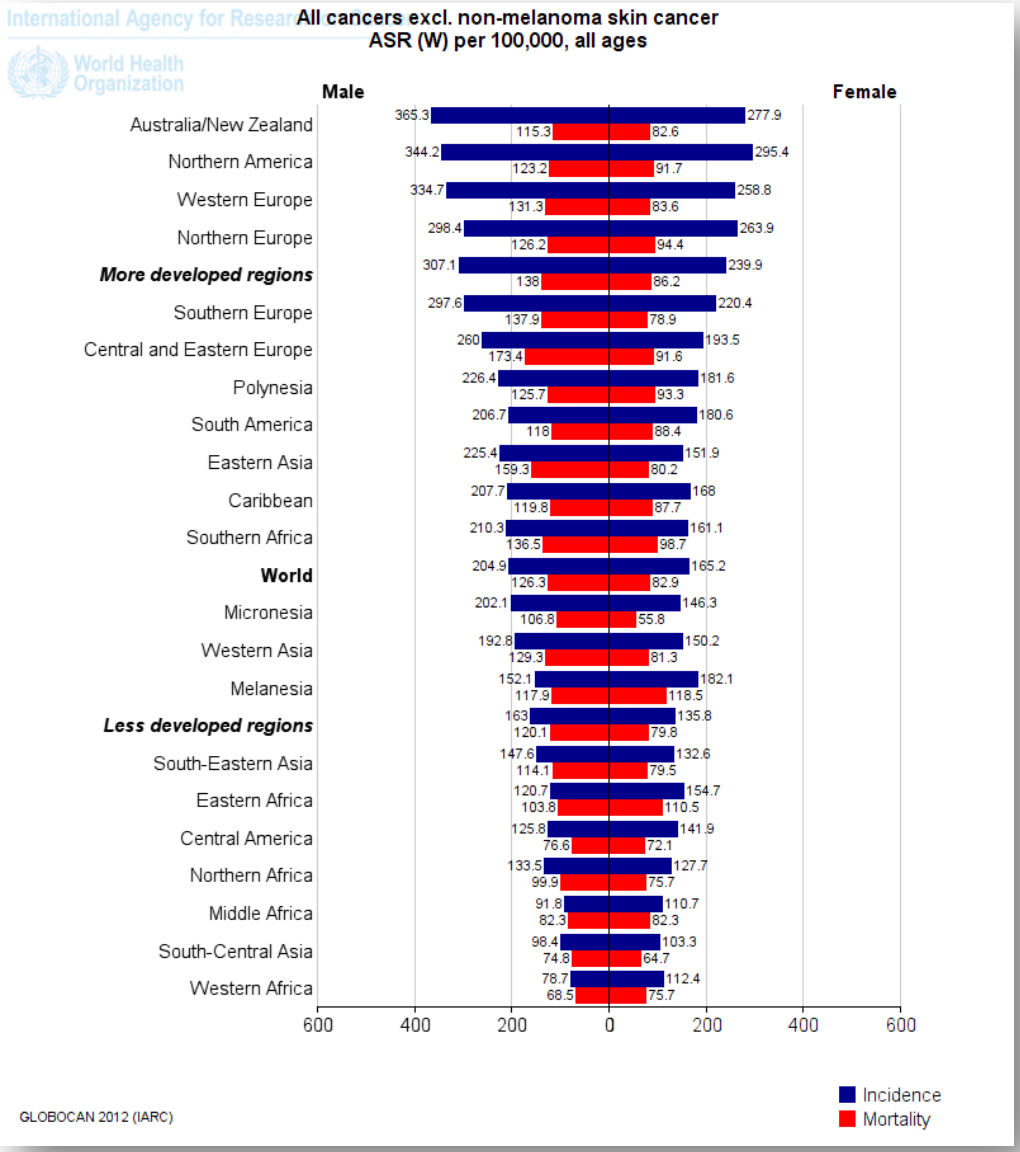


Figura 3. Tasas de incidencia y mortalidad en el mundo para hombres y mujeres. Número de casos o muertes estimadas por cada 100.000 personas por año. Proyecto GLOBOCAN 2012.

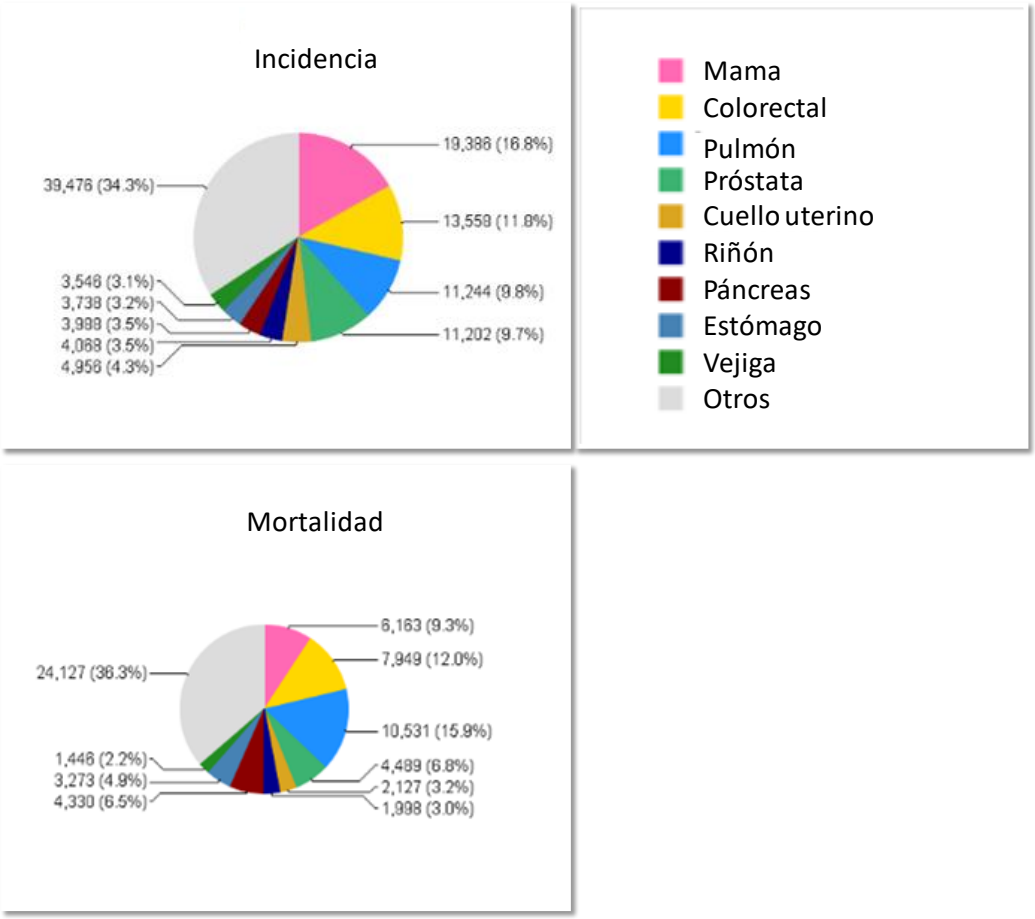


Figura 4. Tasas de incidencia y mortalidad en Argentina para ambos géneros. Número de casos o muertes estimadas por cada 100.000 personas por año. Proyecto GLOBOCAN 2012

Sin embargo, más allá de las altas incidencias de estos tipos de cáncer en el mundo y en nuestro país en particular, hay otros tipos de tumores con incidencia baja, pero con una alta tasa de mortalidad. Tales son los casos de los tipos de tumores que describiremos a continuación y con los cuales se llevaron a cabo los estudios presentados en este trabajo de tesis.

Carcinoma Celular Escamoso de Cabeza y Cuello (CCECC)

Este tipo de cáncer, que comprende neoplasias epiteliales malignas del tracto aerodigestivo superior (figura 5) —senos paranasales, la cavidad oral y nasal, la laringe y la faringe—, es el sexto más común en el mundo desarrollado. A nivel mundial, se diagnostican 650.000 casos al año, de los cuales 300.000 fallecen. El 66,6% de los casos se origina en los países en vías de desarrollo (Amornphimoltham, P., et al., 2005)

(Sánchez-González, R.A., et al., 2013) (Oh, S. Y., et al., 2013) (Zhao, M., et al., 2005) (Cardemil, F., 2014).

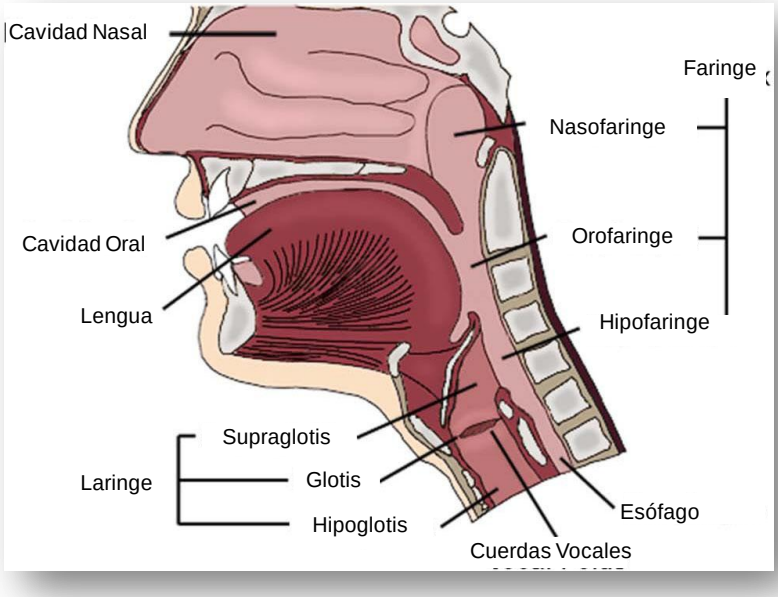


Figura 5. Esquema del tracto aerodigestivo superior y posibles locaciones de los diferentes tumores de cabeza y cuello. Tomado y adaptado de Liebertz, D. J. et al., (2010).

En la tabla 1 se muestran los datos de incidencia y mortalidad, discriminado por género, para el CCECC, en diferentes regiones del mundo, publicados por GLOBOCAN, 2012. A nivel mundial se estima que para 2030 se duplicarán las muertes anuales debido al incremento de las tasas en Asia suroriental, África, América y Oriente medio.

Región	Incidencia en hombres	Incidencia en mujeres	Mortalidad en hombres	Mortalidad en mujeres
Centro América	7.6	2.5	3	0.9
Norte América	15.4	5.1	3.6	1
Sud América	13.4	3.6	7.7	1.5
África	7.1	2.9	4.5	1.9
Asia	11.5	3.6	7.3	2.2
Europa	19	3.9	8.7	1.2
Oceanía	15.6	6.3	5	2.3
Mundo	12.7	3.7	6.9	1.9

Tabla 1. Incidencia y mortalidad de cáncer de labio, cavidad oral, orofaringe, hipofaringe y laringe, estandarizada por edad, para ambos sexos, en diferentes regiones del planeta. Fuente GLOBOCAN, 2012 (IARC).

Esta enfermedad está asociada a ciertos hábitos tales como el consumo de cigarrillos y alcohol, a las infecciones con el virus papiloma humano (HPV) y al hábito de masticar nuez de areca o betel en algunas regiones del sudeste asiático (Sun, W., & Califano, J. A. 2014). A pesar de los avances significativos ocurridos en las terapias, no se ha logrado mejorar la sobrevida global de los pacientes con CCECC durante las últimas cuatro décadas, siendo esta del 50% a los 5 años posteriores al diagnóstico. El tratamiento estándar es la resección quirúrgica del tumor y/o la combinación de quimio y radioterapia. Sin embargo, el mal pronóstico se debe a las elevadas tasas de recurrencia en el sitio primario y a las metástasis en los ganglios linfáticos regionales, siendo estas últimas el factor pronóstico más significativo para predecir la sobrevida del paciente en este tipo de tumor (Doçi, C. L., et al., 2015) y lo que reduce la posibilidad de supervivencia a largo plazo en un 50% (Liebertz, D. J., et al., 2010).

A nivel histológico, el CCECC es un carcinoma epitelial escamoso con grados variables de queratinización. Los casos bien diferenciados muestran perlas de queratina, mientras que los casos anaplásicos presentan poca o nula producción de queratina. El CCECC se caracteriza típicamente por un fenotipo maligno, incluyendo grandes núcleos pleomórficos y nucléolos múltiples o grandes, vacuolización citoplasmática con abundante citoplasma, y un gran número de figuras mitóticas, tanto típicas como atípicas (Liebertz, D. J., et al., 2010). La figura 6 muestra un corte histológico de un carcinoma invasor con la típica formación de perlas de queratina que desarrolla esta clase de tumor.

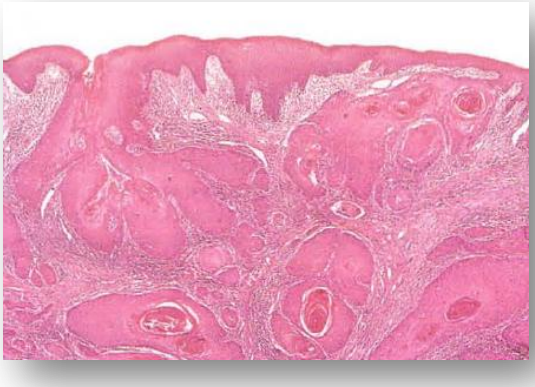


Figura 6. Carcinoma celular escamoso oral. Los nidos de carcinoma invasor muestran la formación de perlas de queratina. Tomado de Kumar, V., et al, (2008).

A nivel genético se han identificado, en la mayoría de los tumores estudiados, mutaciones inactivadoras en genes supresores de tumores, encontrándose pocas mutaciones en oncogenes. Como es ampliamente conocido, resulta difícil encontrar terapias que

reactiven o restablezcan las funciones de los genes supresores tumorales y sus vías. Entre los genes que se han encontrado más frecuentemente mutados están TP53, NOTCH1, PIK3CA, FBXW7, PTEN y HRAS (Sun, W., & Califano, J. A. 2014). Por ejemplo, el TP53 se encuentra mutado en más del 50% de los tumores de CCECC y se observan defectos en su vía en casi el 100% de estos tumores. El PIK3CA se encuentra mutado en el 6-21% de los tumores y sobreexpresado por aumento del número de copias en el 9% de estos. En relación a NOTCH1, se han encontrado mutaciones en el 10-15% de los tumores de CCECC (Sun, W., & Califano, J. A. 2014). Además, los CCECC poseen cariotipos complejos mostrando alteraciones en el número de copias de regiones cromosómicas, tales como pérdidas de 3p y 8p y ganancia de 3q, 5p y 8q y aberraciones estructurales (fusiones cromosómicas) [The Cancer Genome Atlas Network].

La figura 7 muestra la evolución de un CCECC desde el punto de vista clínico, con su correspondiente histología y las alteraciones genéticas preponderantes de cada grado.

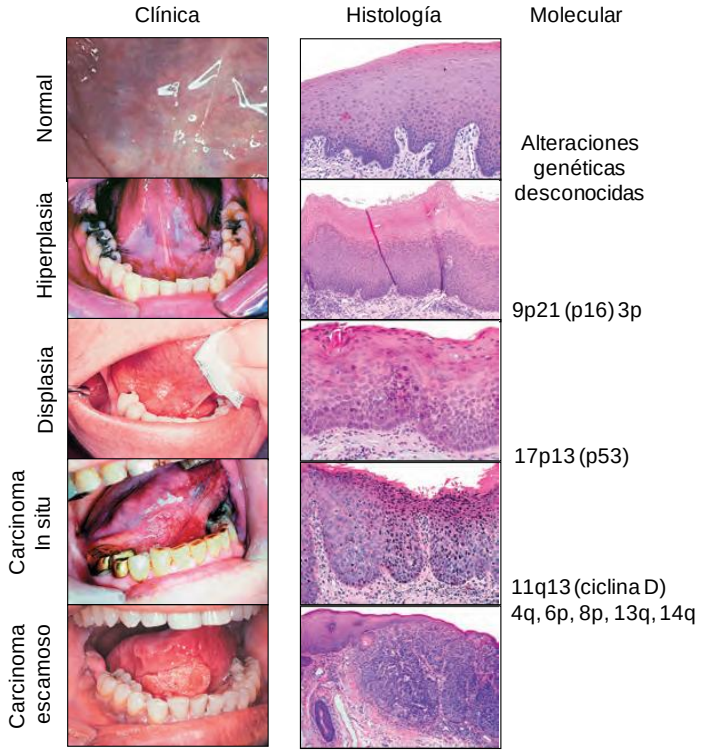


Figura 7. La figura muestra un buen modelo del proceso de transformación, aunque se encuentra incompleto debido a que no toma en cuenta genes específicos desconocidos. Tampoco considera la sobreexpresión de EGFβ. La primera transformación es la desaparición de regiones cromosómicas en 3p y 9p21.28. La pérdida de la heterocigosidad (LOH) sumada a la hipermetilación del promotor en este locus dan lugar a la inactivación del gen p16, un inhibidor de quinasas dependiente de ciclinas. Luego, sobreviene la LOH posterior en 17p con mutación del gen supresor de tumores p53. Por último, la amplificación y sobreexpresión del gen de la ciclina D1 (ubicado en el cromosoma 11q13), que se encarga de la activación constitutiva del avance del ciclo celular. Tomado y adaptado de Kumar, V., et al., (2010).

La etiología del cáncer de cabeza y cuello es multifactorial y los factores implicados son genéticos, sociales, medioambientales y conductuales (Gervásio, O.L.A.S., et al., 2001). Tal como se describió, los factores de riesgo que se han relacionado con el desarrollo de la enfermedad son el tabaquismo y el alcoholismo (tabla 2), la infección por virus del

papiloma humano (HPV) y, en algunas regiones del sudeste asiático, el hábito de masticar nuez de areca y betel. El hábito tabáquico se asocia con cáncer de laringe y el hábito alcohólico con el cáncer oral y de faringe (Lin, C.J., et al., 2007) (Oh, S. Y., 2013) (Cardemil, F., 2014). Ambos factores de riesgo se asocian con la presencia de mutaciones en el gen supresor de tumores p53 (Marur, S., & Forastiere, A. A., 2008). Debido a la relación de este tipo de cáncer con el hábito de fumar, se espera un incremento en la incidencia de los carcinomas escamosos por el aumento del tabaquismo entre los jóvenes (Tirado, L. & Martín Granados, M., 2007).

Hábitos	n	%
Consumo de tabaco y alcohol	258	63.9
Consumo de tabaco	129	31.9
Consumo de alcohol	11	2.7
Ni consumo de tabaco ni de alcohol	6	1.5

Tabla 2. Hábitos tabáquicos y alcohólicos en 404 pacientes con CCECC. Tomado y adaptado de Gervásio, O.L.A.S., (2001).

Otro factor de riesgo es la infección por el virus del papiloma humano (VPH), el cual particularmente se observó asociado a una población más jóven de pacientes de CCECC (Zhao, M., et al., 2005). Este virus, específicamente el subtipo 16, se asocia con un 30% de los casos de CCECC y con tasas de hasta un 50% de todos los tumores derivados de la orofaringe (Liebertz, D. J., et al., 2010) (Zhao, M., et al., 2005). Se diagnostican en etapas tardías debido a que aparece en un sitio en donde los tumores en etapas tempranas son difíciles de diferenciar de las tonsilas linfoides y del tejido de la base de la lengua. La integración del ADN viral al genoma de la célula produce las oncoproteínas virales E6 y E7 que promueven la progresión tumoral por inactivación de p53 y de los productos del gen supresor de tumores Rb (Zhao, M., et al., 2005).

Los datos epidemiológicos muestran que el CCECC posee una baja tasa de supervivencia, aún con todas las opciones de tratamiento existentes y que existe una inquietante proyección a futuro, explicada por el aumento de los factores de riesgo. Esto sugiere la necesidad de investigar nuevas opciones de tratamiento que mejoren la sobrevida y calidad de vida de los pacientes.

Generalidades de tumores del SNC

Los tumores del sistema nervioso central incluyen un tipo de neoplasias difíciles de tratar (De Angelis, L.M. 2001), siendo los tumores de origen glial, los gliomas, los más frecuentes en los adultos (Demuth, T., & Berens, M.E. (2004). Los gliomas son tumores del parénquima cerebral originados a partir de las células de la glia: astrocitos, oligodendrocitos y ependimocitos. En los países desarrollados, existe una incidencia de 5.1 casos/100.000 habitantes con una mortalidad de 3.3 casos/100.000 habitantes; mientras que en los países menos desarrollados la incidencia es de 3.0 casos/100.000 habitantes y la mortalidad de 2.2 casos/100.000 habitantes [fuente: GLOBOCAN 2012]. La tabla 3 muestra la incidencia y la mortalidad de tumores del sistema nervioso para ambos sexos y para diferentes regiones del planeta.

Región	Incidencia en Hombres	Incidencia en mujeres	Mortalidad en hombres	Mortalidad en mujeres
Centro América	4.5	3.4	2.5	1.9
Norte América	6.1	4.6	4.1	2.6
Sud América	5.4	4.3	4.0	3.2
África	2.1	1.6	1.6	1.2
Asia	3.3	2.7	2.6	1.8
Europa	6.3	4.6	4.6	3.0
Oceanía	5.3	3.4	4.0	2.6
Mundo	3.9	3.0	3.0	2.1

Tabla 3. Incidencia y mortalidad de tumores del sistema nervioso central estandarizada por edad, para ambos sexos, en diferentes regiones del planeta. Fuente GLOBOCAN 2012 (IARC).

La proyección estima que la incidencia de la enfermedad se incrementará un 31% para el año 2030 (Smith, B.D. et al., 2009) y un incremento semejante se estima para la mortalidad. Si bien la incidencia de los gliomas es relativamente baja comparada con otros tipos de cáncer, la mortalidad causada por los mismos es elevada tanto en hombres como en mujeres, presentando un promedio de tiempo de sobrevida de entre 12 a 16 meses solamente.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) actualmente clasifica a los gliomas en astrocitomas, oligodendrogliomas, ependimomas o tumores con morfologías mixtas denominados oligo-astrocitomas, basados en el origen histológico presuntivo de las células del tumor. Estos grupos se subdividen además en cuatro grados histológicos, teniendo en cuenta la magnitud de la malignidad determinada por las características histológicas de los tumores (presencia de necrosis, actividad mitótica, proliferación vascular, pleomorfismo nuclear, etc) (Louis, D.N. et al., 2007) (Li, A et al., 2010). Los tumores de grado I tales como los astrocitomas pilociticos, son tumores de baja tasa de crecimiento y pueden ser curados completamente si se los extirpa en su totalidad. Los gliomas de grado II (astrocitomas, oligodendrogliomas y oligoastrocitomas) y los gliomas de grado III más agresivos (incluyendo astrocitomas, oligodendrogliomas y oligoastrocitomas anaplásicos) presentan un curso clínico intermedio. En cambio, los gliomas de grado IV, o glioblastomas multiformes (GBM), presentan el peor pronóstico, con una sobrevida media de 14,5 a 16,6 meses (Wen, P.Y., & Reardon, D.A., 2016). Estos muestran características muy avanzadas de malignidad tales como una gran proliferación vascular y necrosis, siendo muy resistentes a radio/quimioterapias. El diagnóstico y la eliminación de estos tumores son complicados debido a su naturaleza difusa e infiltrativa. Además, la heterogeneidad genética y molecular de los gliomas contribuye a que la respuesta a los tratamientos sea pobre, (Godard, S., et al., 2003) (Shai, R., et al., 2003) (Ohgaki, H., et al., 2004) (Li, A., et al., 2010).

El diagnóstico de estos tumores se basa en el examen de la morfología celular del tumor, para evaluar su presunta célula de origen, y en marcadores indirectos de la agresividad tumoral (necrosis, pleomorfismo nuclear, mitosis) para determinar el grado del tumor (Louis, D.N. et al., 2007). Sin embargo, el uso de estos parámetros histopatológicos se encuentra limitado por la gran variabilidad existente entre los observadores a la hora del diagnóstico histopatológico y a que son insuficientes para predecir la evolución de cada paciente ya que tumores de igual grado histológico pueden poseer diferentes pronósticos (Ware, M.L., et al., 2003) (Wen, P.Y., & Reardon, D.A., 2016). Es por esto que existe una necesidad urgente de identificar biomarcadores predictivos que los pueda clasificar en subtipos diferentes.

El glioma más frecuente en USA, Europa y Argentina (constituyendo en este pais el 25% de los 1600 tumores cerebrales primarios diagnosticados) [www.msal.gov.ar/inc/equipos analisis.php] es el GBM, el cual representa hasta el 55% de todos los gliomas (figura 8).

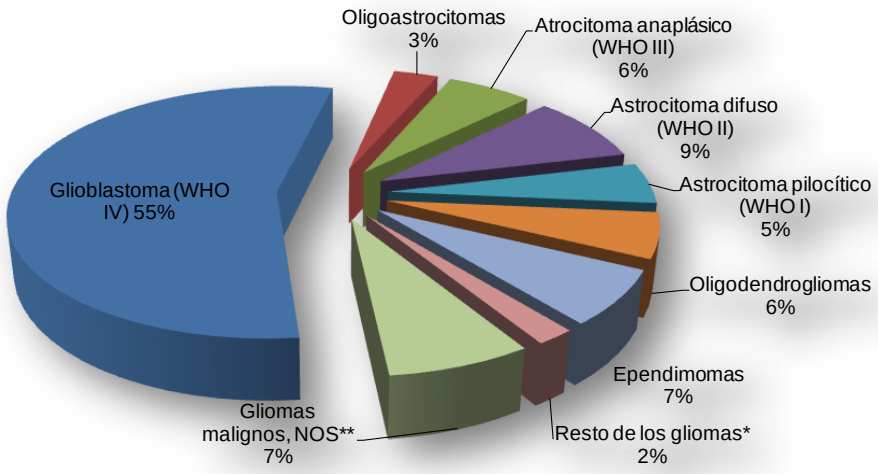


Figura 8. Incidencia de los distintos tipos de gliomas (n = 97.910). Los astrocitomas representan el 75% de los gliomas. Los porcentajes suman más de 100% debido al redondeo. *Incluye histologías de variantes únicas de astrocitoma, otros tumores neuroepiteliales, y tumores neuronales y gliales mixtos. ** NOS, (not otherwise specified) incluye tumores del plexo coroideo, otros tumores neuro-epiteliales, tumores neuronales y mixtos gliales-neuronales, tumores de la región pineal, otros tumores de los nervios craneales y espinales, tumores mesenquimatosos, lesiones melanocíticas primarias, otras neoplasias relacionados con las meninges, otras neoplasias hematopoyéticas, hemangioma y todos los demás. Tomado y adaptado de Ostrom, Q. T., et al., (2015).

Un glioma de bajo grado puede progresar a un GBM, originando así los llamados GBM secundarios, mientras que los tumores que surgen de *novo* se denominan GBM primarios. El término “multiforme” pretende reflejar la heterogeneidad intratumoral, a nivel genómico y transcripcional, de los glioblastomas. Esta complejidad, sumada a la presencia de sub-poblaciones de células madre tumorales, hacen de este tumor uno de los más difíciles de comprender y tratar (Furnari, F.B., et al., 2007). La heterogeneidad mencionada es consecuencia, a nivel molecular, de alteraciones en ciertas vías de señalización claves en los procesos de proliferación celular, sobrevida celular, invasión y angiogénesis (Assi, H., et al., 2012). Una de las vías que a menudo se encuentra sobre-activada es la del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR/PI3K/AKT). Como consecuencia, el 85% de los GBM ha demostrado poseer Akt activa (Wang, H., et al., 2004) y altos niveles de Ras-GTP (Guha, A., et al., 1997). También se ha observado una hiperactivación del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), alteraciones de la vía p16 INK4/ CDK4/RB1 y pérdida de la expresión de supresores tumorales tales como p53, PTEN y el gen reparador del ADN MGMT. La figura 9 muestra un esquema de los mecanismos moleculares más comúnmente implicados en la patogénesis de los gliomas difusos.

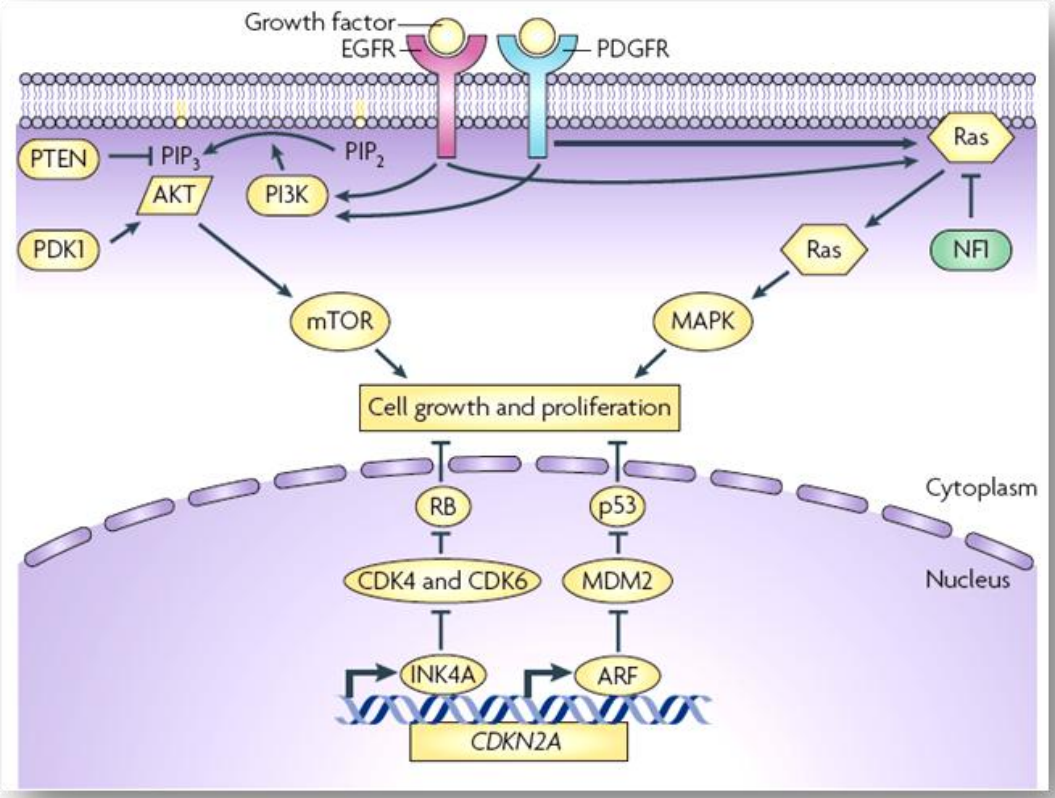


Figura 9. Mecanismos moleculares más comúnmente involucrados en la patogénesis de gliomas. Tomado de Huse, J.T. & Holland E.C. (2010).

Las alteraciones genéticas de los glioblastomas se hallan dispersas por todo el genoma (1p, 6q, 9p, 10p, 10q, 13q, 14q, 15q, 17p, 18q, 19q, 22q, e Y). Muchas representan la pérdida de genes supresores de tumores y algunas tienen que ver con la inestabilidad genómica propia de las células tumorales. Las alteraciones más frecuentes son la pérdida de heterocigosidad en el cromosoma 10 (60-80% de los casos) y la amplificación del gen EGFR en el cromosoma 7. A la vez, se producen errores en la replicación y reparación del ADN, en la segregación cromosómica y alteración de numerosas cascadas de señalización (Adamson, C., et al., 2009). La sobre expresión de EGFR es más común en los glioblastomas primarios (40-60%) que en los secundarios (10%). La amplificación de dicho gen incrementa el crecimiento, la proliferación, la migración y la neovascularización tumoral; además, el receptor truncado otorga resistencia a la quimioterapia por modulación de Bcl- XL y de las caspasas. Algunas de las mutaciones inactivadoras tienen como blanco las importantes vías de TP53, RB1 (retinoblastoma) y PTEN (fosfato homólogo de tensina) (Adamson, C., et al., 2009).

Una característica de las células de GBM es su gran resistencia o insensibilidad a los estímulos que desencadenan muerte celular tales como radio- o quimioterapia. Esta propiedad biológica se relaciona con las alteraciones genéticas en las vías de EGFR y de PI3K-PTEN-AKT ya descriptas, así como también con alteraciones en las moléculas efectoras de las vías intrínseca (dependiente de la mitocondria) y extrínseca (mediada por receptores de muerte) de la apoptosis. Paradójicamente, a pesar de la resistencia a estímulos apoptóticos, las células de GBM exhiben una alta propensión a la necrosis celular. La necrosis es la forma más prominente de muerte celular espontánea en GBM y se presenta como pequeños focos de micro-necrosis rodeados de tejido normal o de infiltraciones del parénquima (Raza, S.M. et al., 2002).

La infiltración por todo el cerebro es otra de las características más prominentes de los gliomas, constituyendo la causa principal de imposibilidad de una efectiva intervención quirúrgica (Lefranc, F., et al., 2005) (Hambardzumyan, D., & Bergers, G., 2015) (Harrison, W.T., et al., 2016). La invasión de células de glioma en las regiones de cerebro normal se produce por el gran movimiento celular activo de las células malignas y por la interacción de estas con la matriz extracelular (ECM), con la consecuente degradación proteolítica de la ECM. Sin embargo, y a pesar de su alta invasividad, las células de glioma no son capaces de invadir tejidos fuera del sistema nervioso central, propiedad cuya explicación no ha sido aún encontrada (Furnari, F.B., et al., 2007). Otra característica de los GBM y que está relacionada con su capacidad de invadir tejido sano es su gran capacidad angiogénica y vascularizante, principalmente a través de VEGF.

El diagnóstico de los astrocitomas malignos se establece sencillamente a través de imágenes por resonancia magnética (figura 10). La lesión presenta contraste irregular, de manera frecuente con forma de anillo y suele estar rodeada de edema. El tumor involucra la sustancia blanca, puede extenderse a través del cuerpo calloso (tal como se describió estos tumores son altamente infiltrantes) e involucrar el otro hemisferio también (DeAngelis, L.M., 2001). Los signos y síntomas más comunes entre los pacientes son dolores de cabeza, convulsiones y déficits neurológicos progresivos (Adamson, C., et al., 2009).

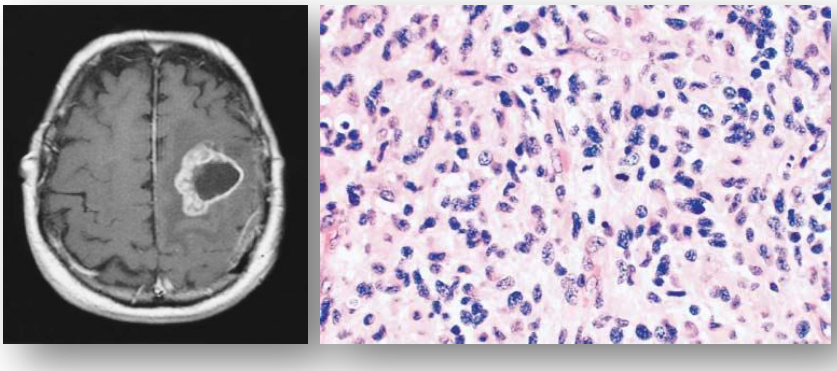


Figura 10. Glioblastoma Multiforme A) Imagen por resonancia magnética (MRI) de un glioblastoma en el lóbulo frontal izquierdo B) Hematoxilina-eosina de un glioblastoma. Se observa necrosis, con células dispuestas alrededor del borde del tejido necrótico. Tomado y adaptado de DeAngelis, L.M., (2001).

La intervención estándar del glioblastoma continúa siendo la resección quirúrgica de la masa tumoral seguida de radio y quimioterapia (con Temozolomida, un agente alquilante de nueva generación) post-operatoria. Esta estrategia prolonga la supervivencia media hasta los 14,6 meses. Los pacientes sin tratamiento presentan una superivencia media de 3 meses y los pacientes que sólo reciben la radioterapia presentan una supervivencia media de 12,1 meses (Chaudhry, N.S., et al., 2013) (Kotliarova, S., & Fine, H. A., 2012) (Wang, H., et al., 2015). Por otra parte, en la actualidad existen varios ensayos clínicos terminados o en ejecución cuyo objeto es estudiar drogas inhibidoras de las vías de señalización alteradas con mayor frecuencia en estos tumores (Tabla 4) o evaluar la factibilidad de la aplicación de inmunoterapia, terapia génica, terapia basada en células madres y nanotecnología (Wang, H., et al., 2015).

Blanco molecular	Droga/s	Terapia	Fase	Ref.
VEGF	Bevacizumab	Bevacizumab + irinotecan	II	(Demirci, U., et al., 2013)
	Bevacizumab	Bevacizumab + TMZ + RT	II	(Lai, A., et al., 2011)
VEGF	Aflibercept	Monoterapia	II	(de Groot, J.F., et al., 2011)
VEGFR, PDGFR, FGFR, c-KIT	Cediranib	Monoterapia	II	(Batchelor, T.T., et al., 2010)
VEGFR, c -KIT, PDGFR	Vatalanib	Vatalanib + TMZ + RT	I/II	(Brandes, A.A., et al., 2010)
VEGFR, PDGFR, c-KIT	Pazopanib	Monoterapia	II	(Iwamoto, F.M., et al., 2010)
Integrina αvβ3/αvβ5	Cilengitide	Cilengitide + TMZ + RT	I/IIa	(Stupp, R., et al., 2010)
	Cilengitide	Cilengitide + TMZ + RT	II	(Nabors, L.B., 2012)
Integrina αvβ3/αvβ5	Thalidomide	Thalidomide + procarbazine	II	(Ruiz, J., et al., 2012)
	Thalidomide	Thalidomide + irinotecan	II	(Giglio, P., et al., 2012)
EGFR	Cetuximab	Monoterapia	II	(Lv, S., et al., 2012)
EGFR	Gefitinib	Monoterapia	II	(Uhm, J.H., et al., 2011)
		Gefitinib + RT	II	(Chakravarti, A., et al., 2013)
EGFR	Erlotinib	Erlotinib + TMZ + RT	II	(Peereboom, D.M., et al., 2010)
		Monoterapia	I/II	(Kesavabhotla, K., et al., 2012)
EGFR, HER2	Lapatinib	Monoterapia	I/II	(Thiessen, B., et al., 2010)
PDGFR, c-KIT, BCR-ABL	Imatinib	Imatinib + hydroxyurea	II	(Reardon, D.A., et al., 2009)
PDGF R , S RC , c-KIT, BCR-ABL	Dasatinib	Dasatinib + lomustine	I/II	(Franceschi, E., et al., 2012)
mTOR	Temsirolimus	Monoterapia	II	(Galanis, E., et al., 2005)
	Temsirolimus	Temsirolimus + TMZ + RT	I	(Sarkaria, J. N., et al., 2010)
mTOR	Everolimus	Everolimus + TMZ + RT	I	(Sarkaria, J.N., et al., 2011)
RAS	Lonafarnib	Lonafarnib + TMZ	I	(Desjardins, A., et al., 2011)
RAS	Tipifarnib	Monoterapia	II	(Lustig, R., et al., 2008)
Proteasoma	Bortezomib	Monoterapia	I	(Phuphanich, S., et al., 2010)
	Bortezomib	Bortezomib + TMZ + RT	I	(Kubicek, G.J., et al., 2009)

Tabla 4. Ensayos clínicos con drogas dirigidas contra blancos moleculares comúnmente alterados en gliomas. RT, radioterapia. Tomado y adaptado de Wang, H., et al., (2015).

Algunos de esos ensayos clínicos han finalizado, obteniendo resultados moderados en la mayoría de los casos. Por ejemplo, inhibidores del receptor de EGF (erlotinib y gefitinib) presentaron poca actividad y modesta respuesta en pacientes con un PTEN intacto (Prados, M., et al., 2003) (Rich, J.N., et al., 2004) (Mellinghoff, I.K., et al., 2005). También presentaron poca actividad los inhibidores de PDGFR (imatinib), de RAS (tipifarnib) y de mTOR (temsirolimus) (Chang, S.M., et al., 2005) (Galanis, E., et al., 2005) (Cloughesy, T.F., et al., 2006) (Wen, P. Y., et al., 2006) (Franceschi, E., et al., 2007). Si bien estos agentes han tenido poco efecto, su especificidad y sus humildes efectos secundarios los vuelven moléculas de elección en la actualidad en terapias combinadas con otros agentes citotóxicos (Furnari, F.B., et al., 2007).

Un resumen de las vías y procesos celulares más importantes en el desarrollo de los GBM, asi como también las drogas actualmente bajo estudio, se muestra en la figura 11.

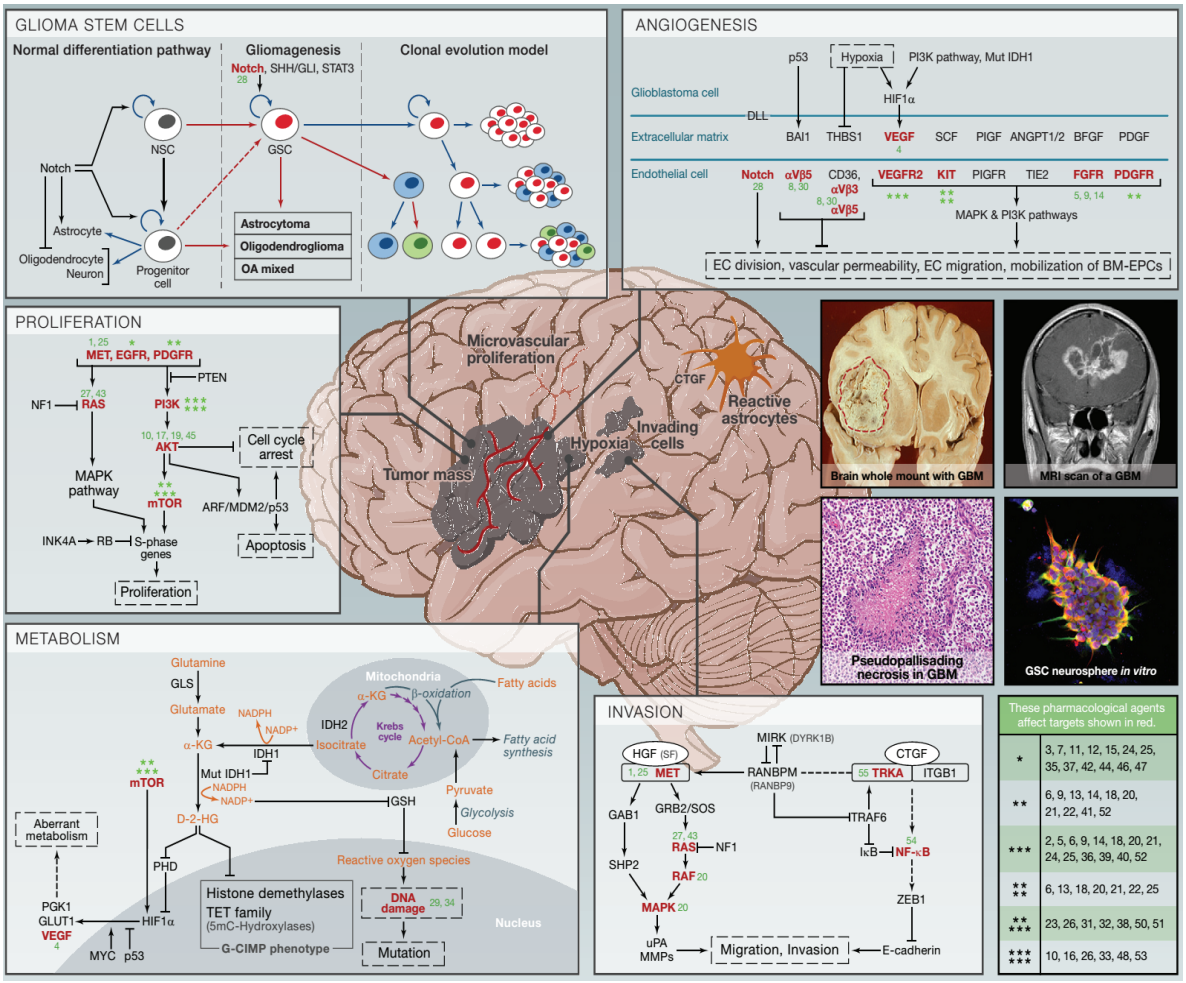
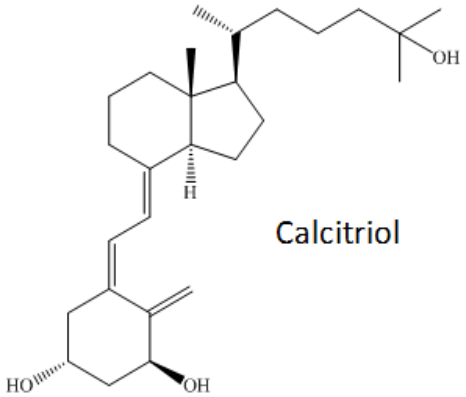


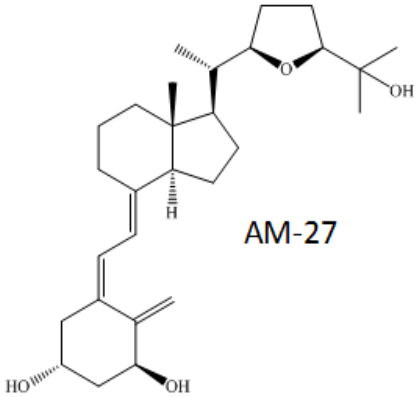
Figura 11. Resumen de las principales alteraciones moleculares que ocurren en los GBM. Los asteriscos muestran las etapas que pueden ser inhibidas por drogas actualmente en estudio. 1:Rilotumumab; 2:Aflibercept; 3: Afatimib; 4: Bevacizumab; 5: Brivanib; 6: Cediranib; 7: Cetuximab; 8: Cilengtide; 9: Lenvatinib mesylate; 10: Enzastaurin; 11: Erlotinib; 12: Gefitinib; 13: Imatinib; 14: Intedanib; 15: Lapatinib; 16: BKM120; 17: Nelfinavir; 18: Pazopanib; 19: Perifosine; 20: Sorafenib; 21: Sunitinib; 22: Tandutinib; 23: Temsirolimus; 24: Vandetanib; 25: Cabozantinib; 26: XL765; 27: Tipifarnib;28: Ro4929097;29: Veliparib; 30: ATN-161; 31: AZD8055; 32: AZD2014; 33: BKM120; 34: Iniparib; 35: Rindopepimut; 36: Pegdinetanib; 37: Matuzumab; 38: Everolimus; 39: Foretinib; 40: Ramucirumab; 41: Olavatumab; 42: I-125 MAB-425; 43: Lonafarnib; 44: ABT-806; 45: MK2206; 46: Nimotuzumab; 47: Dacomitinib; 48: PX-866; 49: Panobinostat; 50: Ridaforolimus; 51: Sirolimus; 52: Vatalanib; 53: XL147;54: Bortezomib; 55: AZD7451. Tomado de Kotliarova, S. & Fine, H.A., (2012).

Tal como describimos anteriormente, el GBM es un tumor muy heterogéneo que presenta una elevada resistencia a la radio y quimioterapia. Dicha resistencia, sumada a la limitada radiación que puede administrarse por la baja tolerancia por parte del cerebro normal, a la presencia de la barrera hematoencefálica que impide el pasaje de algunas drogas potencialmente efectivas, el *cross talk* entre las vías de señalización alteradas y los pocos resultados clínicos satisfactorios obtenidos por el empleo de un único agente dirigido (monoterapia) vuelven imperativa la búsqueda y aplicación de nuevas estrategias terapéuticas contra este cáncer (Sminia, P., & Westerman, B. A., 2016) (Wang, H., et al., 2015).

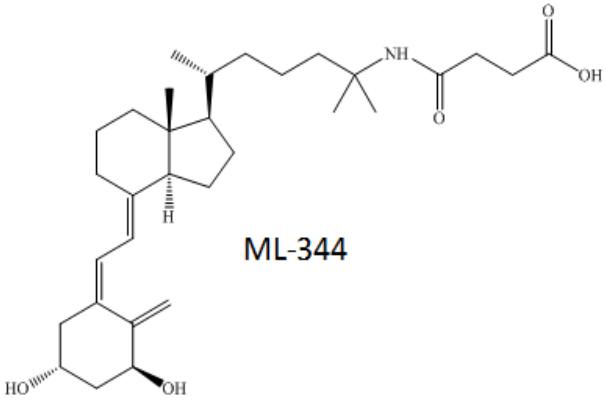
Primera parte: estudio de estrategias terapéuticas para CCECC y GBM, basadas en la síntesis de nuevos análogos del calcitriol



Calcitriol



AM-27



ML-344

Vitamina D

Generalidades

A pesar de su nombre, la vitamina D no es en realidad una vitamina (Feldman, D., et al., 2014) sino que es el precursor de la potente hormona esteroidal llamada 1α, 25-dihidroxi vitamina D_3 (calcitriol). La vitamina D puede ser sintetizada en la piel utilizando la radiación ultravioleta del sol, de manera que no es un elemento esencial que debe ser ingerido, como el resto de las vitaminas. Sin embargo, muchas personas no reciben la cantidad adecuada de luz solar para poder sintetizar este precursor del calcitriol, debido a varias razones, entre ellas el hecho de vivir lejos de la línea del ecuador, pasar poco tiempo afuera de las casas, usar indumentaria que cubre completamente el cuerpo o poseer piel oscura. Esto hace que muchos individuos sufran de déficit de vitamina D. En estos casos se puede incorporar por la ingesta ya que ciertos alimentos la poseen.
La energía de la radiación UV convierte, en la piel, al 7-dehidrocolesterol en vitamina D_3 (Holick, M.F., 2007). Posteriormente la vitamina D_3 es activada secuencialmente mediante dos etapas: una es la hidroxilación en el carbono 25 dando 25(OH) vitamina D_3 que ocurre en el hígado y es catalizada por la enzima CYP27A1 (Zhu, J., & DeLuca, H.F., 2012) y la otra es la hidroxilación del 25(OH) vitamina D_3 en el carbono C1α que ocurre en riñón, es catalizada por la CYP27B1 y genera el metabolito activo llamado calcitriol o $1,25(OH)_2$ vitamina D_3 (Jones, G., et al., 2014). Ambas hidroxilasas pertenecen a la familia de la citocromo p450 (Colonese, F., et al., 2015). Además de encontrarse en riñón, la CYP27B1 se encuentra en muchos otros órganos, pudiéndose sintetizar calcitriol extrarenalmente (Lehmann, B., et al., 2004) (Tangpricha, V., et al., 2001) (Pillai, S., et al., 1988).

Funciones biológicas y mecanismo de acción

Una de las principales funciones biológicas del calcitriol es el mantenimiento de la homeostasis del calcio y del fósforo y por ello sus respuestas típicas se producen mayormente en el intestino, el hueso y el riñón (Mozos, I., & Marginean, O., 2015). Sin embargo, la unión del calcitriol a su receptor VDR (que tiene una amplia distribución en casi todos los tejidos del organismo) también regula la expresión de varios genes que no se relacionan con su función biológica clásica y que intervienen en la regulación de

muchos procesos fisiológicos y patológicos (Lucisano, S., et al., 2013), tal como se describirá a continuación.

El calcitriol actúa principalmente uniéndose y activando al receptor de vitamina D (VDR), el cual es un miembro de la familia de receptores nucleares de hormonas esteroideas-tiroideas-retinoideas. Esta unión fomenta la dimerización con el receptor del ácido retinoico (RXR) para luego unirse a elementos de respuesta a la vitamina D (VDRE) en múltiples regiones regulatorias localizadas en promotores y regiones distales de los genes blanco (Bouillon, R., et al., 2008), lo que lleva a la modulación de la expresión de más de 900 genes (Wang, T.T., et al., 2005) (Schuster, I., 2011). Entre estos se han descripto genes implicados en el crecimiento celular, la diferenciación, la apoptosis, la invasión y la metástasis de las células tumorales (Colonese, F., et al., 2015). Esta acción del calcitriol que ocurre a través de su unión al VDR para modular la transcripción génica se la conoce como efectos genómicos del calcitriol. A través de la vía genómica, la hormona induce la expresión de, por ejemplo, el inhibidor del ciclo celular $p21^{Cip/Waf}$, el receptor de insulina, la 24-hidroxilasa, la fibronectina y el TGF. Además, se ha descripto que el calcitriol regula la transcripción de varios oncogenes y genes supresores de tumores en tejidos normales y tumorales, aunque en la mayoría de los casos no se han encontrado elementos de respuesta al VDR en los mismos (Beer T.M., &Myrthue, A. 2004) (Trump, D.L., et al., 2010).

Además de sus acciones genómicas, también se han descripto efectos rápidos o no genómicos, que no requieren de la transcripción génica, mediante los cuales se activan vías de transducción de señales que pueden o no terminar en la modulación de la transcripción génica (Haussler, M.R., et al., 2011) (Guessous, I., 2015). La figura 12 muestra las vías genómica y no genómica del calcitriol y su interrelación.

Más del 85% de la vitamina D que circula en plasma lo hace enlazada a la proteína de unión a vitamina D (VDBP). Esta proteína es una alfa globulina (58 kDa), producida en el hígado (Speeckaert, M., et al., 2006) y entre sus funciones se destacan: prolongar la vida media de la vitamina D al protegerla de la degradación, modular su ingreso en las células blanco y mantener los niveles plasmáticos de la vitamina D a través de la reabsorción renal (Brown, A.J., & Coyne, D.W., 2012) (Nykjaer, A., et al.,1999) (Kalousova, M., et al., 2015).

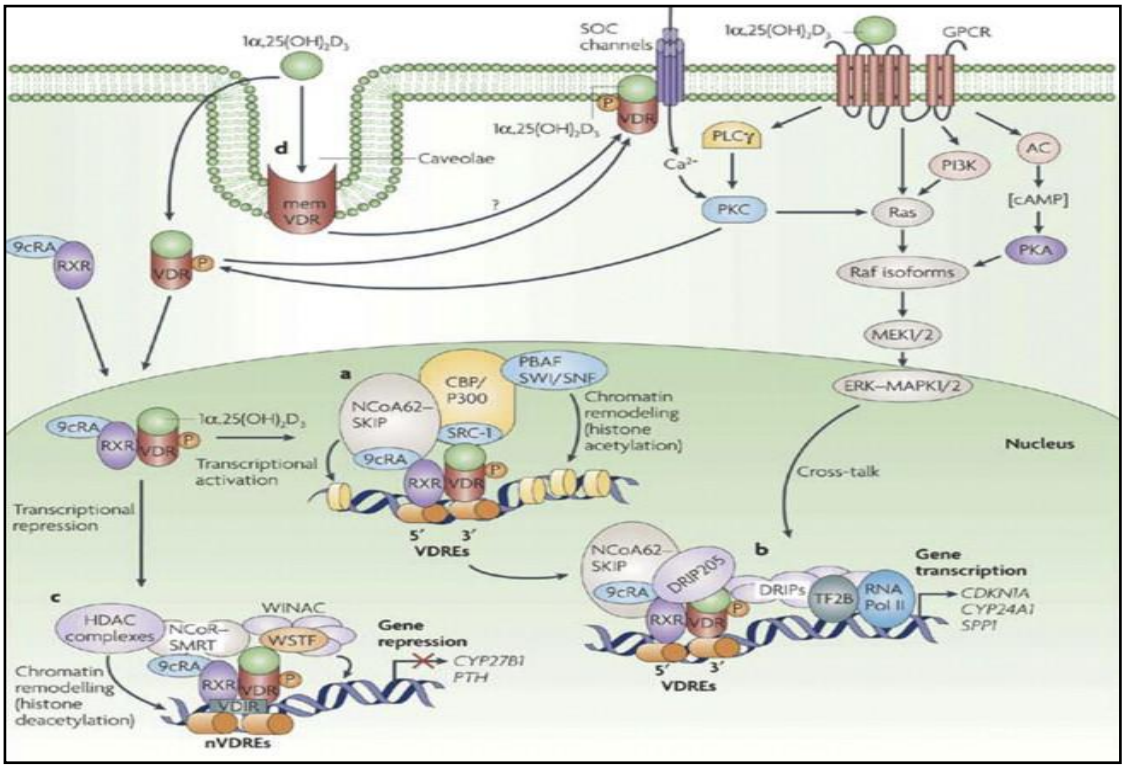


Figura 12. Vías de acción genómica y no genómica del calcitriol y su *crosstalk*. Tomado de Campbell, F.C., et al., (2010).

Deficiencia e insuficiencia de vitamina D

La deficiencia de este compuesto es un problema sanitario común, a menudo no tratado, que se vincula con complicaciones esqueléticas y extraesqueléticas como raquitismo, caries dentales, retraso del crecimiento en niños, osteomalacia, osteopenia, osteoporosis, disminución de la fuerza muscular, caídas, mayor riesgo de fracturas. La insuficiencia se asocia con obesidad, diabetes mellitus, colesterol HDL bajo, edad avanzada, mayor distancia del ecuador, piel oscura, temporada de invierno, contaminación atmosférica, tabaquismo, mala absorción, enfermedad renal y hepática, y el consumo de cierta medicación como anticonvulsivos y glucocorticoides (Lee, J.H., et al., 2008) (Al Mheid, I., et al., 2013) (Somjen, D., et al., 2005) (Zhou, C., et al., 2008) (Adams, J.S., & Hewison, M., 2012) (Chowdhury, R., et al.,2014) (Norman, P.E., & Powell, J.T., 2014) (Wang, L., et al., 2013) (Lee, J.H., et al., 2011) (Patel, R., & Rizvi, A.A., 2011) (Kunadian, V., et al., 2014) (Mozos, I., & Marginean, O., 2015). La prevalencia de la deficiencia de vitamina D es alta a nivel mundial. Se estima que mil millones de personas sufren de deficiencia de

vitamina D (Holick, M.F., & Chen, T.C., 2008), afectando al 40% de la población norteamericana y europea (Holick, M.F., 2007).

A pesar de los múltiples debates acerca de cuál es la concentración de vitamina D deseable para el mantenimiento de la salud, no se ha llegado a un consenso general para definir deficiencia e insuficiencia de vitamina D. Los niveles de vitamina D se miden a través de su metabolito, el $25(OH)D_3$ dado que este es considerado el biomarcador que mejor refleja el estatus de vitamina D, especialmente en invierno (Feldman, D., et al., 2008). Mientras que la deficiencia de vitamina D se define como una concentración sérica de $25(OH)D_3$ menor a 20 ng/ml (50 nmol/L), la insuficiencia se define entre 20 y 29 ng/ml (50-75 nmol /L). Los debates acerca de cada definición se incrementaron luego de que en el 2011 el Instituto de Medicina (IOM) perteneciente a la Academia Nacional de Medicina de Estados Unidos elaborara su informe en relación a los requerimientos de vitamina D y sus beneficios para la salud. En definitiva, se consideran como adecuados los niveles séricos de vitamina D cuando la concentración de $25(OH)D_3$ es superior a 30 ng/ml; los niveles entre 15 a 30 ng/ml se consideran como insuficientes y los valores inferiores a 15 ng / mL definen a la deficiencia de vitamina D (Guessous, I., 2015) (Holick, M.F., 2007) (Nigwekar, S.U., et al., 2012) (Kalousova, M., et al., 2015) (Lee, J.H.,et al.,2008) (Holick, M.F., & Chen, T.C., 2008) (Mozos, I., & Marginean, O., 2015). De acuerdo con un informe del IOM, una dosis de vitamina D de 600 UI / día sería beneficiosa para los huesos, pero no es seguro si las dosis más altas podrían reducir el riesgo de enfermedades crónicas, incluyendo el cáncer y la patología cardiovascular (Del Valle, H. B., et al., 2011) (Hilger, J., et al., 2014).

En relación a nuestra región, sólo se publicaron unos pocos estudios sobre el estatus de la vitamina D en América del Sur. La mayoría de estos estudios utilizaron pocos individuos y pertenecen a unos pocos países. En un estudio realizado en Argentina se halló un gradiente norte-sur con niveles más altos de vitamina D cerca del ecuador, tal como es esperable (figura 13) (van Schoor, N.M., & Lips, P., 2011).

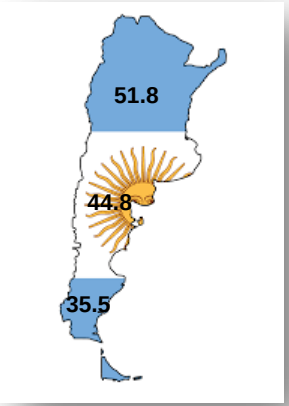


Figura 13. Niveles plasmáticos de 25 (OH) D en Argentina. Se evidencia un gradiente Norte-Sur, disminuyendo a medida que la latitud aumenta. Tomado y adaptado de Van Schoor, N. M., & Lips, P. (2011).

Vitamina D y la prevención del cáncer

La primera evidencia, en seres humanos, de la existencia de una relación entre la vitamina D y la prevención del cáncer provino de estudios ecológicos y geográficos que sugirieron que una buena exposición a la luz solar (UV) o el hecho de vivir en latitudes menores, se relacionaba con una menor incidencia de cáncer de colon (Garland, C.F., & Garland, F.C., 1980). Posteriormente, otros estudios mostraron correlaciones similares para el cáncer de próstata (Schwartz, G.G., & Hulka, S., 1990) (Hanchette, C.L., & Schwartz, G.G., 1992). Estos estudios estimularon el desarrollo de nuevas investigaciones sobre la existencia de asociación entre los niveles circulantes de $25(OH)D_3$ y la incidencia y mortalidad de diferentes tipos de cancer (Giovannucci, E., 2011). Varios meta-análisis demostraron una reducción estadísticamente significativa de entre un 30 a un 40% en el riesgo de contraer cáncer de colon en personas con altos niveles de $25(OH)D_3$ en comparación con aquellas que poseen bajos niveles (Lee, J.E., et al., 2011). En cambio, para otros tipos de cancer no se han encontrado asociaciones significativas y para el cáncer de mama las asociaciones encontradas han sido contradictorias. Posteriores estudios, algunos de los cuales están aún en curso, incluyen el testeo de compuestos de vitamina D en ensayos clínicos con el objetivo de evaluar si el consumo de dichos compuestos disminuye la incidencia de cáncer. En general, algunos de estos estudios ya finalizados sugieren que la vitamina D o el calcitriol podrían ser terapéuticamente beneficiosos (Feldman, D., et al., 2014). Estos ensayos clínicos se han diseñado y se llevan a cabo guiados por los resultados obtenidos en los numerosos ensayos preclínicos que demuestran que los compuestos de vitamina D ejercen potentes efectos antitumorales, tal como se describirá a continuación.

Efectos antitumorales de compuestos de la vitamina D

El calcitriol, además de su participación en la homeostasis del calcio y del fósforo, modula la mayoría de las capacidades que la célula tumoral adquiere en su progresión hacia el estado maligno y posterior diseminación metastásica, capacidades que se han denominado "*hallmarks*" del cáncer (Hanahan, D., & Weinberg, R. A., 2000). Se describieron, como ya hemos mencionado, seis capacidades, dos características facilitadoras y dos capacidades emergentes (Hanahan, D. & Weinberg, R.A., 2011). El

calcitriol, por ser capaz de modular varias de las capacidades detalladas es que se convierte en un buen candidato para la terapia antitumoral (figura 14).

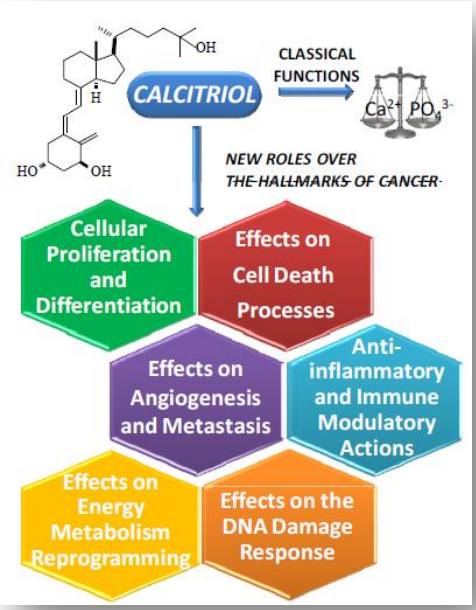


Figura 14. Capacidades que la célula tumoral adquiere en su progresión hacia el estado maligno y que se han demostrado estar moduladas por el calcitriol. Tomado de Salomón, D.G., et al., (2014).

A continuación, se describirán algunos de los principales trabajos que han reportado efectos de compuestos de la vitamina D en cada una de estas capacidades.

Efectos sobre la proliferación y diferenciación celular

En 1981 Colston y col. reportaron por primera vez un efecto del calcitriol sobre la proliferación de células de melanoma (Colston, K., et al., 1981) y, a partir de este reporte, numerosos trabajos demostraron efectos anti-proliferativos de la vitamina D sobre células malignas y no malignas (Colston, K.W., & Hansen, M., 2001) (Stewart, L.V.,& Weigel, N.L., 2004) (Bouillon, R., et al., 2006) (Gombart, A.F., et al., 2006) (Deeb, K.K., et al., 2007) (Krishnan, A.V., et al., 2007) (Welsh, J. et al., 2007). Ese mismo año fue publicado un trabajo que demuestra que el calcitriol induce la diferenciación en células de leucemia mieloide (Abe, E., et al., 1981). Posteriormente, se demostró el efecto de la hormona sobre la diferenciación de varios tipos celulares diferentes (Diaz, G.D., et al., 2000) (Huerta, S., et al., 2002) (Cross, H.S., & Kállay, E., 2005). Es importante resaltar que se observó que dichos efectos antitumorales eran específicos del tipo celular y de su

contexto (Gocek, E., & Studzinski, G. P., 2009). Sin embargo, en la mayoría de las células el mecanismo celular de acción del calcitriol parece ser común y consistir en un arresto del ciclo celular en G_0/G_1 (Stewart, L.V., & Weigel, N.L., 2004) (Bouillon, R., et al., 2006). Analizando los mecanismos moleculares a través de los cuales el calcitriol ejerce efectos antiproliferativos, se encontró que produce inhibición de ciclinas y de quinasas dependientes de ciclinas (Yang, E.S.,& Burnstein, K.L., 2003) ya sea modulando su expresión o mediante la inducción de los inhibidores $p21^{waf1}$ (aumenta los niveles tanto del ARNm como de la proteína) y $p27^{kip1}$ (disminuye su fosforilación, evitando su reconocimiento por el sistema ubiquitin-ligasa SKP2 y prolongando la vida media de esta proteína) (Liu, M., et al., 1996) (Freedman, L.P., 1999) (Yang, E.S., & Burnstein, K.L., 2003) (Bouillon, R., et al., 2006). Además, el calcitriol estimula la expresión de E-cadherina (Pálmer, H. G., et al., 2001), inhibe la actividad transcripcional de β-catenina (Shah, S., et al., 2006), modula la activación de las vías del TGF-β, el IGFBP3, el EGFR y reduce los niveles de c-myc y c-jun (Bouillon, R., et al., 2006) (Fleet, J.C., 2008).
En relación a su efecto sobre la diferenciación celular es importante aclarar que es muy raro que la diferenciación de las células tumorales conduzca a células completamente normales; sin embargo, el objetivo final de la diferenciación es detener la proliferación de esas células al arrestar el ciclo celular (Coffman, F.D., & Studzinski, G.P., 1999) (Harrison, L.E., et al.,1999) (Wang, Q.M., et al., 2000) en fase G_0/G_1 (Yang, E.S., & Burnstein, K.L., 2003) (Stewart, L.V., & Weigel, N.L., 2004) (Bouillon, R., et al., 2006) (Krishnan, A.V., et al., 2007) y reducir la supervivencia de las células dferenciadas.

Efectos sobre la muerte celular

El calcitriol promueve la apoptosis en células de diferentes tipos de tumores tales como carcinoma mamario, celular escamoso, colorrectal y de próstata, en mieloma, retinoblastoma y leucemias (Vandewalle, B., et al., 1995) (Guzey, M., et al., 2002) (Simboli-Campbell, M., et al., 1994 y 1997) (Diaz, G.D., et al., 2000). Se ha descripto que la inducción de apoptosis se debe a la disminución de la expresión de proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2 y Bcl-XL) e inducción de la expresión de proteínas pro-apoptóticas (Bad, Bax y Bak) (Welsh, J. et al., 2007) (Blutt, S.E., et al., 2000) (Chen, T.C., & Holick, M.F., 2003) con la consecuente liberación del citocromo C, seguido del clivaje de PARP (Flanagan, L.,et al., 2003); además, induce la expresión de las caspasas 3, 4, 6 y 8 (Swami, S., et al., 2003). Por otra parte, también se asoció el efecto del calcitriol sobre la

muerte celular con la reducción de la expresión de IFGR (Xie, S.P., et al.,1997), la inducción de MEKK1 (McGuire, T.F., et al., 2001), la activación de la vía de señalización de la esfingomielina-ceramida-gangliósido GD3 (Bektas, M., et al., 2000), la reducción de la expresión de Akt (Bernardi, R.J., et al., 2001) (Bernardi, R.J., et al., 2002) y el incremento de TNFα (Rocker, D., et al.,1994).

También se ha descripto que el calcitriol y varios de sus análogos inducen autofagia indirecta en células cancerosas (Tavera-Mendoza, L., et al., 2006) (Wang, J., et al., 2008) (Høyer-Hansen, M., et al., 2005). Por otro lado, se observó que los agentes movilizadores del Ca^{2+} (como lo es el calcitriol) incrementan el número de autofagosomas (Høyer-Hansen, M., et al., 2010) (Bristol, M.L., et al., 2012); el calcio activaría a CaMKK- ß –un inductor de autofagia– que activa a AMPK (Høyer-Hansen, M., et al., 2007)[b] el cual inhibe el complejo mTORC1, regulador de la autofagia (Corcelle, E.A.,. et al., 2009). También se ha demostrado que el calcitriol incrementa la sensibilidad de las células tumorales al tratamiento con varias drogas citotóxicas y con radiación (Weitsman, G.E, et al., 2005).

Efectos sobre la angiogénesis y la metástasis

La formación de nuevos vasos es esencial para el crecimiento del tumor primario y para la migración de la célula neoplásica a sitios distantes (Folkman, J., 1995). Se ha reportado que el calcitriol puede inhibir la angiogénesis mediante la disminución de la expresión del factor inducible por hipoxia 1-α (HIF 1A), del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-β) (Ben-Shoshan, M., et al., 2007) o de la interleuquina 8 (IL-8) (Bao, B.Y.,et al., 2006). *In vivo* se ha demostrado que disminuye la vascularización de los tumores de mama (Mantell, D.J., et al., 2000) y colon (Iseki, K., et al., 1999). En relación a la invasión y la metástasis se ha reportado que el calcitriol reduce el potencial metastásico de las células tumorales mediante la inhibición de serin-proteasas, la disminución de la secreción de las metaloproteinasas MMP2, MMP9 y/o MMP13, y mediante el incremento de la actividad del inhibidor de TIMP-1(metaloproteinasa -1) y TIMP2 (Schwartz, G.G., et al., 1997) (Bao, B.Y., et al., 2006) (Ma, Y., et al., 2013), (Chiang, K. C., et al.,2014) (Lin, R., et al., 2002) (Koli, K., & Keski-Oja, J., 2000) (Bao, B.Y., et al., 2005) (Chiang, K. C., et al., 2014)[b]. El cambio de expresión de E-cadherinas por N- cadherinas se considera un *hallmark* de la EMT (Cavallaro, U., et al., 2002). En relación a esto, se ha demostrado que el calcitriol reprime la expresión de N -cadherina y aumenta la expresión de E-cadherina en varias líneas celulares de cáncer de mama humano (Campbell, M.J., et al.,

1997) (Beer T.M., & Myrthue, A. 2004). Además, inhibe la expresión de α6-integrina y β4-integrina (Sung, V., & Feldman, D., 2000) (Pendás-Franco, N., et al., 2007) que participan en el proceso de transformación epitelio-mesenquimático que la célula tumoral sufre durante el proceso invasivo (Friedrichs, K., et al., 1995) (Mukhopadhyay, R.,et al., 1999).

Efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores

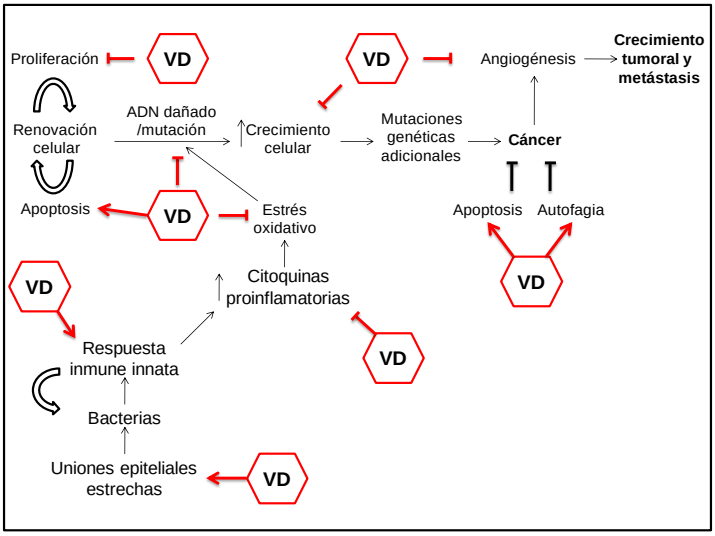
Como vimos, una de las características facilitadoras que desarollan las células tumorales es la activación de procesos inflamatorios (Hanahan D. & Weinberg R.A., 2011) y esto contribuye al desarrollo tumoral al activar múltiples vías de señalización en dichos tejidos (Allavena, P., et al., 2008) (Lucia, M.S., & Torkko, K.C., 2004) (Mantovani, A., et al., 2008). Se ha reportado que el calcitriol disminuye la expresión de COX-2 (enzima responsable de sintetizar PGs que favorecen la proliferación celular, promueven la angiogénesis e inhiben la apoptosis) e incrementa la de 15-PGDH (responsable de catabolizar a las PGs) en varios tumores (Moreno, J., et al., 2005) (Narayanan, B. A., et al., 2006) (Yan, M., et al., 2004) (Myung, S.J., et al., 2006). El calcitriol, además, disminuye la producción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-8 mediante el aumento de la expresión de MAP quinasa fosfatasa 5 (MKP5) (Peehl, D. M., et al., 2004). El factor de transcripción NF-κβ es clave tanto en la respuesta inmune como en la inflamación ya que activa la transcripción de citoquinas pro-inflamatorias, quemoquinas y factores anti-apoptóticos (Karin, M., & Lin, A., 2002) (Catz, S.D.,& Johnson, J.L., 2001), factores que promueven la progresión del ciclo celular (c-myc y ciclina D1), enzimas proteolíticas (MMP9) y factores angiogénicos (VEGF e IL-9) (Suh, J., & Rabson, A. B., 2004). El calcitriol bloquea la actividad de NF-κβ mediante un incremento de IκB (Stio, M., et al., 2007) (Cohen-Lahav, M. et al., 2006); además, reduce la traslocación nuclear de la subunidad p65 de dicho factor, suprimiendo la transcripción de IL-8 (Bao, B.Y., et al., 2006). Se ha demostrado que el calcitriol modula tanto la inmunidad innata como la adaptativa (Hart, P. H., et al., 2011) (Chen, Y., et al., 2013). Más específicamente, se reportó que el calcitriol inhibe la activación de linfocitos T efectores y la producción de citoquinas mediante la estimulación de los linfocitos T reguladores (Adams J.S., & Hewison M., 2008). Además, se demostró que inhibe a los linfocitos B productores de anticuerpos, promueve la diferenciación de las células CD34+ inmaduras en células presentadoras de antígenos (Kulbersh, J.S., et al., 2009) y revierte los mecanismos inmunosupresores en pacientes (Walsh, J.E., et al., 2010).

Efectos sobre la reprogramación del metabolismo energético

Las células cancerosas reprograman el metabolismo de la glucosa y su producción energética conduciendo a un estado denominado glucólisis aeróbica. Esto lo consiguen, en parte, por aumento de expresión de transportadores de glucosa como Glut-1 el cual incrementa la concentración del hidrato de carbono dentro del citoplasma (Jones, R.G., & Thompson, C.B., 2009) (Hsu, P. P., & Sabatini, D.M., 2008). Se ha demostrado que el calcitriol modula al transportador Glut-1 en varias líneas tumorales humanas (Ben-Shoshan, M., et al., 2007).

Efectos sobre la respuesta al daño al ADN

El calcitriol incrementa la expresión de varios genes que reparan el ADN, como Rad50, ATM, XPC (xeroderma pigmentosum complementation group C) y DDB2 (damage-specific DNA binding protein 2) (Chiang, K. C., & C Chen, T., 2013) (Demetriou, S.K., et al., 2012) (Moll, P.R., et al., 2007). Por oro lado se demostró que los queratinocitos de la epidermis de ratones carentes de VDR son deficientes en la respuesta al daño en el ADN (DDR, DNA damage response), mostrando una disminución en el clearence de ciertos aductos de ADN (dimeros de pirimidina), producidos luego de irradiación con UVB (Demetriou, S.K., et al., 2012). En cambio, en ratones conteniendo un VDR intacto, el calcitriol incrementa el clearence de los dimeros de primidina y los niveles de p53 (Dixon, K.M., et al., 2005) (Gupta, R., et al., 2007). Tambien se reportó que el calcitriol atenuó los niveles de daño al ADN inducido por productos del metabolismo oxidativo en linfocitos normales, en carcinoma pulmonar y en células tumorales linfoblásticas (Halicka, H.D., et al., 2012).



La figura 15 resume los principales procesos y vías moduladas por calcitriol.

Figura 15. Resumen de los potenciales eventos moleculares regulados por calcitriol (VD) relevantes en cáncer. Tomado y adaptado de Fleet, J.C., et al., (2012).

Aplicaciones terapéuticas del calcitriol y análogos en cáncer

Tal como hemos detallado, existen numerosos reportes sugiriendo la potencialidad de los compuestos de la vitamina D en la prevención o en el tratamiento del cáncer. Si bien el rol del calcitriol en la quimioterapia tumoral está en sus albores, el hecho de que se trate de una sustancia fisiológica lo vuelve atractivo, ya que difícilmente provoque muchas reacciones adversas. Uno de los efectos secundarios del calcitriol puede ser el desarrollo de hipercalcemia, el cual se produce a dosis supra-fisiológicas y limita su empleo (Jung, S. J., et al., 1994) (Jones, G., 2008). Por esto, la estrategia empleada es desarrollar análogos del calcitriol que emulen sus efectos beneficiosos y posean reducida la capacidad hipercalcemiante (Bouillon, R., et al., 1995) (Ji, Y., et al., 2002) (Collins, E.D., et al., 2005) (Aparna, R., et al., 2008) (Gocek, E., & Studzinski, G. P., 2009). La mayoría de estas moléculas sintéticas poseen modificaciones en la cadena lateral, en el anillo A (a veces combinado con cambios en la cadena lateral), en los anillos C y D y en el sistema triénico. Los ligandos deben producir, al unirse, un cambio conformacional del VDR produciendo una disociación eficiente de las proteínas co-represoras del receptor, así como una unión específica de las proteínas co-activadoras, para conducir a la activación transcripcional, es decir, para actuar como agonistas (Carlberg, C., 2003). Las modificaciones planificadas en los análogos procuran, por un lado aumentar la afinidad de los compuestos por el sitio de unión del ligando (VDR-LBD) sustituyendo átomos de hidrógeno por otros más electronegativos o adicionando átomos de carbono y por otro lado modular la estabilidad metabólica de los compuestos introduciendo átomos de oxígeno o enlaces dobles o triples (Carlberg, C., & Mouriño, A., 2003). Hay algunos análogos del calcitriol que ya se utilizan en la clínica aunque, hasta la fecha, es para el tratamiento de patologías no malignas (DeLuca, H. F., & Plum, L. A., 2016). Sin embargo hay muchos otros que se han diseñado y sintetizado y se encuentran en alguna etapa de ensayos preclínicos o clínicos para el tratamiento del cáncer. En la tabla 5 se detallan algunos análogos del calcitriol sintetizados hasta la fecha, con su correspondiente modificación estructural, y un comentario acerca de sus efectos.

Nombre	Modificación	Comentario
(20S,23S)-epoxymethano-1a,25(OH)2D3	Incorporación a la cadena lateral de un anillo oxolano al C20	Actúa como un superagonista en cultivo. Es pro diferenciador y antiproliferativo. Muestra efecto calcemiante in vivo.
1a,25(OH)2D3-20(22),23-diyne-21-nor-D3	Alquilación de la cadena lateral, le confiere rigidez	Posee una actividad biológica similar al calcitriol aunque con una afinidad menor por VDR.
20(17 12)-abeo-1a,25(OH)2-24-dihomo-21-nor-D3	La cadena lateral comienza en el C12 y no en el C17	Tiene un 70% de afinidad por VDR respecto al calcitriol, pero media solo un 20% de la actividad transcripcional del receptor.
20(17 18)-abeo-1a,25(OH)2-24-dihomo-21-nor-D3	La cadena lateral comienza en el C18 y no en el C17	Significativo efecto antiproliferativo y prodiferenciador en cultivo de líneas tumorales y disminuida actividad calcemiante.
CD578	Fluoración de la cadena lateral	Posee resistencia a la degradación por parte de la enzima 24-hidroxilasa.
Triciferol	Modificación de la cadena lateral	Hiperacetila tubulina, acetila histonas y presenta actividad antiproliferativa y citotóxica más eficaz que el calcitriol en cultivo de células tumorales.
QW-1624F2-2	Modificación en el Anillo A (metanol en 1-α) , insaturación en el C16 e incorporación de 2 átomos de Flúor en C24	Altamente antiproliferativo, de baja actividad celcemiante. Inhibe el crecimiento de neuroblastoma in vivo.
CD578,WU515 y WY1113	Fluoración en el Anillo D	Incrementa la diferenciación celular en cultivo.
6-methyl-1a,25(OH)2D3	Modificación en el sistema triénico	Similar afinidad de enlace por VDR que el Calcitriol, pero menor potencia en las actividad biológica.
Ro27-2310	Dos cadenas laterales en el C20	In vitro se comporta como un agonista débil; sin embargo, in vivo demostró mayor potencia que el calcitriol.

Tabla 5. Ejemplos de análogos del calcitriol. Tomado y adaptado de Carlberg, C., et al., (2012).

Análogos del calcitriol en ensayos clínicos

Algunos análogos del calcitriol han llegado a ser evaluados en ensayos clínicos en algunos tipos de cáncer ya sea solos o combinados con otros agentes citotóxicos. Algunos análogos tienen efectos variados sobre diferentes tipos de cáncer por lo que es necesario desarrollar estudios en cada caso para definir fehacientemente su utilidad terapéutica. Por ejemplo, aunque el análogo EB1089 fue beneficioso en pacientes con carcinoma hepatocelular (ensayo clínico, fase II) (Dalhoff, K., et al., 2003), ensayos posteriores mostraron resultados negativos para el cáncer pancreático (Evans, T.R., et al., 2002), adenocarcinoma mamario y cáncer colorrectal (Gulliford, T.,et al., 1998). Un estudio de fase I/II del análogo 19-nor-1α-25-dihidroxivitamina D_2 (paricalcitol) en

pacientes con cáncer de próstata avanzado mostró que, aunque la droga fue bien tolerada, no hubo una respuesta significativa (Schwartz, G.G., et al., 2005). El 1α-hidroxi vitamina D_3 fue testeado en ensayos clínicos en fase I y II en pacientes con cáncer de próstata, solo o combinado con docetaxel, y generó una limitada respuesta antitumoral (Liu, G., et al., 2002) (Liu, G., et al., 2003) (Attia, S., et al., 2008). Este análogo también fue testeado en ensayos de fase II en glioma y se observó respuesta favorable en el 20% de los pacientes (Trouillas, P., et al., 2001). El Inecalcitol (19 nor-, 14 epi-, 23-yne, 1α, 25-dihidroxivitamina D_3) es un reciente análogo que combinado con docetaxel fue administrado a pacientes con cáncer de próstata avanzado y mostró actividad antitumoral sin generar hipercalcemia (Medioni, J., et al., 2009). En algunos de los ensayos clínicos realizados hasta la fecha la administración diaria de los análogos del calcitriol ha generado hipercalcemia; en otros ensayos no se evidenciaron efectos tóxicos aunque tampoco se observaron efectos beneficiosos. La ausencia de la respuesta favorable podría deberse a que es dificultoso conseguir *in vivo* las dosis eficaces del compuesto debido a la baja biodisponibilidad de él (Trump, D.L., et al., 2004). También podría deberse al hecho de que las células tumorales expresan altos niveles de la enzima catabólica CYP24A1 lo que limita la concentración de la droga en el tumor. Por ello la síntesis de nuevos análogos de la vitamina D y su análisis en ensayos preclínicos continúa.

Estudios de calcitriol y análogos en Carcinoma Celular Escamoso de Cabeza y Cuello y en Glioma

Se han llevado a cabo algunos estudios de la potencialidad terapéutica del calcitriol o de sus análogos en CCECC y en gliomas. La mayoría de estos fueron realizados utilizando células en cultivo pero algunos de ellos han llegado a ensayos clínicos (Trouillas, P., et al, 2001; Mulpur, B. H., et al., 2015). Nuestro grupo de trabajo demostró que un análogo alquinilfosfonato del calcitriol (C10) poseía efectos sobre la viabilidad de líneas de CCECC (Salomón, D. G., et al. 2011); sin embargo, al realizar ensayos *in vivo* en dos modelos animales de CCECC no se observó actividad antitumoral (resultados no publicados).
La tabla 6 muestra los resultados reportados hasta la fecha de estudios de calcitriol y análogos en carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello y la tabla 7 detalla los estudios efectuados en glioma.

Molécula/s	Efectos	Referencias
Calcitriol	Aumenta la expresión de p27 (ARNm y proteína) en cultivo, anfiregulina	(Hershberger, P.A. et al., 1999)
	Induce anfiregulina, en cultivo, colaborando con la inhibición del crecimiento celular.	(Akutsu, N. et al., 2001)
	Disminuye la expresión de p21 (ARNm y proteína) en cultivo.	(Hershberger, P.A. et al., 1999)
	Suprime la expresión de ARNm y la producción de la proteína relacionada con la hormona paratiróidea (PTHrP).	(Abe, M. et al., 1998)
	↓Vol. Tumoral in vivo, con ↓ de la expresión de p21 intratumoral. El nivel de p27 no se modificó.	(Hershberger, P.A. et al., 1999)
	Se observó, en cultivo, que evita la desorganización del citoesqueleto que ocurre en las células endoteliales expuestas a los productos derivados de CCECC.	(Witt, C.J. et al., 2000)
	Se observó, en cultivo, arresto del ciclo en G0/G1 con aumento de la expresión de p27.	(Kornfehl, J. et al., 1996; Hager, G. et al., 2001)
	Desfosforilación de MEK y ERK 1/2. Se inhibe la fosforilación y expresión de Akt en cultivo. La apoptosis podría ser mediada por p38 MAPK.	(McGuire, T.F. et al., 2001)
	↑VDR, ↓angiopoietina-2 en cultivo.	(Bernardi, R.J. et al., 2002)
	↑p18 en cultivo.	(Gedlicka, C. et al., 2006)
	Retrasa la carcinogénesis in vivo.	(Meier, J.D. et al., 2007)
	↑células T CD4(+) y CD8(+) en pacientes. Además, el tiempo de recurrencia del tumor es mayor en pacientes tratados con calcitriol.	(Walsh, J.E. et al., 2010)
	↓CD34+ ↑células dendríticas maduras en pacientes.	(Kulbersh, J.S. et al., 2009)
	↑CYP2R1 y la expresión de ARNm de VDR. ↑la expresión c-Fos, p-c-Jun y la actividad de c-Jun N-terminal quinasa (JNK) en tejidos tumorales.	(Sundaram, K. et al., 2014)

Tabla 6. Efectos observados en cultivo e *in vivo* para el tratemiento de CCECC con calcitriol. Se informa la referencia correspondiente a cada observación.

Molécula/s	Efectos	Referencias
22-oxa-1,25-(OH)2D3 (OCT)	Se observó en cultivo: ↓proliferación celular, ↑ apoptosis y detiene el ciclo celular, ↑la sensibilidad hacia los fármacos quimioterapéuticos y down regularó varios factores de la angiogénesis y un factor de apoptosis; survivina.	(Satake, K. et al., 2003)
MC1288 y CB1093	Redujeron la proliferación celular y detuvieron el ciclo celular en G0/G1 en cultivo.	(Hager, G. et al., 2004)
PRI-1906 y PRI-2191	Se determinó efecto antiproliferativo en cultivo, y combinado con citostáticos se observó sinergísmo u aditividad de efectos. PRI-1906 es más efectivo como potencial agente antitumoral.	(Wietrzyk, J. et al., 2007)
Calcitriol + cisplatino	Se potenciaron *in vitro* e *in vivo* a través de la inducción de p73 y de la apoptosis.	(Ma, Y. et al., 2008)
MART-10	Redujo el crecimiento tumoral *in cultivo* e *in vivo*, no produjo hipercalcemia. Arrestó el ciclo celular en G0/G1, ↓ la expresión de Ki-67,↑p21 y p27, y suprimió la expresión de la telomerasa *in cultivo*.	(Chiang, K.C. et al., 2013)
Calcitriol + erlotinib (inhibidor de EGFR)	Se ensayó *in vivo*, inhibió el crecimiento tumoral, fue bien tolerado y no provocó cambios en el peso corporal, redujo el grado de displasia y down reguló fosfo-akt y fosfo-EGFR.	(Bothwell, K.D. et al., 2015)
Calcitriol + paclitaxel	Sinergia en la citotoxidad *in vitro* e *in vivo*	(Hershberger, P.A. et al., 2001)
C10	Redujo la viabilidad celular *in cultivo*. Sin efecto hipercalcemiante *in vivo*.	(Salomón, D.G. et al., 2011)

Tabla 6 (continuación). Efectos observados *in cultivo* e *in vivo* para CCECC tratados con análogos del calcitriol y con calcitriol en tratamientos combinados.

Molécula/s	Efectos	Referencias
Calcidiol y Calcitriol	Reduce el crecimiento e induce apoptosis en cultivo	(Magrassi, L. et al., 1995)
KH 1060	Induce apoptosis más poderosa que la del calcitriol y fragmentación de ADN e inducción de c-myc en cultivo.	(Baudet, C. et al., 1996)
MC 1288 y CB 1093	Induce apoptosis semejante a la del calcitriol y fragmentación de ADN e inducción de c-myc en cultivo.	(Baudet, C. et al., 1996)
Colecalciferol	Induce apoptosis, a través de la vía de la esfingomielina que produce incremento de la concentración intracelular de ceramidas, en cultivo.	(Magrassi, L. et al., 1998)
Alfacalcidiol	Regresión progresiva y perdurable de gliomas malignos en pacientes. Rediferenciación celular en cultivo	(Trouillas, P. et al., 2001)
Calcitriol	La modulación de las vías de señalización de Notch por calcitriol no regularía el crecimiento de líneas celulares de GBM. ↑ c-myc, GADD45, p53, evidencia que apoya la idea de que el calcitriol induce muerte celular programada en cultivo. ↑ IL-6 en cultivo.	(Reichrath, S. et al., 2010) (Baudet, C. et al., 1996 [b])
Suplemento de vitamina D	Reducción de la mortalidad de los pacientes consumidores.	(Mulpur, B.H. et al., 2015)
Calcitriol + Temozolomide	Efectos antitumorales sinérgicos en cultivo entre ambos agentes. La apoptosis se efectuaría mediante autofagia.	(Bak, D.H. et al., 2016)
C10	Reduce la viabilidad celular en cultivo. Sin efecto hipercalcemiante in vivo.	(Salomón, D.G. et al., 2011)

Tabla 7. Efectos observados *in cultivo* e *in vivo* para gliomas tratados con análogos del calcitriol y con calcitriol.

Hipótesis y Objetivos

“La realidad no tiene la menor obligación de ser interesante…,
Pero no las hipótesis.”
La muerte y la brújula — Jorge Luis Borges

Hipótesis y objetivos

Tal como se detalló en Introducción, el cáncer se ha convertido en una de las enfermedades de mayor impacto socio-económico en el mundo occidental. Lamentablemente, a pesar de los avances realizados en las terapias oncológicas, la sobrevida de los pacientes se ha mejorado levemente en algunos tipos de cáncer, tal es el caso de los carcinomas celulares escamosos de cabeza y cuello (CCECC) y el glioblastoma multiforme (GBM). Por ello resulta importante profundizar la búsqueda y el desarrollo de terapias novedosas, evaluando nuevas drogas o combinación de agentes nuevos o ya utilizados.

Tal como describiéramos, el calcitriol posee actividad antitumoral en varios tipos de cáncer. Algunos ensayos clínicos realizados a la fecha, ya sea en forma individual o en combinación con agentes citotóxicos han mostrado resultados alentadores, aunque en la mayoría de los casos se ha observado una importante hipercalcemia como efecto secundario. Este efecto colateral dificulta la administración de la dosis necesaria para inducir una respuesta antitumoral y por ello se están diseñando racionalmente nuevos análogos del calcitriol que posean iguales o mayores efectos antitumorales pero que carezcan de la actividad hipercalcemiante. El **objetivo general** de esta primer parte del trabajo de tesis es estudiar la potencialidad terapéutica de dos análogos del calcitriol sintetizados por nuestro equipo de trabajo para el tratamiento del CCECC y de gliomas.

La **hipótesis de trabajo** es que los análogos del calcitriol AM-27 y ML-344, modificados en la cadena lateral con la adición de un grupo oxolano y de un grupo amida, respectivamente, ejercen efectos antitumorales en CCECC y GBM, presentando escasa o nula actividad calcémica y con altas probabilidades de ser efectivos en futuros ensayos clínicos para estos tipos de cáncer.

Objetivos específicos

Debido a que el calcitriol o algunos de sus análogos poseen fuertes efectos hipercalcemiantes que imposibilitan su administración en las dosis necesarias para la acción antitumoral, es capital evaluar la capacidad calcemiante de los nuevos análogos sintetizados, así como su toxicidad. Por lo tanto, el primer objetivo fue:

1. Evaluar la toxicidad y los efectos hipercalcemiantes de los nuevos análogos AM-27 y ML-344 en ratones, comparándolos con los de la hormona natural.

Dado que es necesario comenzar a evaluar si los análogos poseen actividad antitumoral en células en cultivo, el segundo objetivo que nos propusimos fue:
2. Estudiar los efectos de AM-27 y ML-344 sobre la proliferación, apoptosis y migración de células de líneas tumorales de CCECC y GBM, comparándolos con los ejercidos por calcitriol.

El comportamiento de las células en cultivo puede ser diferente al de las células cuando se encuentran formando parte integral de los tejidos en el organismo. Por esta razón, las potenciales drogas antitumorales deben testearse también en modelos animales. Por lo tanto, el siguiente objetivo fue:
3. Investigar la actividad antitumoral de los análogos en modelos animales de CCECC y GBM.

Los ensayos preclínicos pueden trasladarse a ensayos clínicos más efectivamente si se conocen los mecanismos de acción de las drogas. Uno de los mecanismos de acción del calcitriol es el genómico, que requiere de su unión al receptor VDR. Es conocido que los diferentes análogos poseen diferente afinidad por el VDR, la cual es una de las explicaciones de la acción diferencial de los mismos. Con el fin de comenzar a evaluar la afinidad por el VDR de los nuevos análogos sintetizados, el siguiente objetivo fue:
4. Desarrollar estudios computacionales, partiendo desde la estructura cristalográfica del complejo calcitriol-VDR con el objeto de comparar el tipo y fuerza de interacción intermolecular que se establecen entre cada uno de los análogos con el VDR.

Materiales y Métodos

"Give us the tools and we will finish the job"
Winston Churchill (1874-1965)

Materiales

Células utilizadas

Línea celular T98G, derivada de un glioblastoma multiforme humano, facilitada gentilmente por el Dr. Silvio Gutkind.
Línea celular U251, derivada de un glioblastoma multiforme humano, facilitada gentilmente por el Dr. Silvio Gutkind.
Línea celular GL26, derivada de un glioblastoma murino aparecido en la cepa C57BL/6, cedida gentilmente por la Dra. Marianela Candolfi.
Cultivo primario de astrocitos humanos, obtenido de Science Cell Research Laboratories. Derivado de cerebro humano y criopreservados en el primer pasaje.
Línea celular HN12, de carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello derivada de una metástasis nodal humana, facilitada gentilmente por el Dr. Silvio Gutkind.
Línea celular HN13, derivada de carcinoma celular escamoso de lengua humana, facilitada gentilmente por el Dr Silvio Gutkind.

Cepas de ratón utilizadas

El trabajo con los animales se desarrolló en conformidad con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio y todos los estudios contaron con protocolos aprobados por el CICUAE de la Universidad Nacional del Sur. Los ratones macho CF1 fueron gentilmente cedidos por el Bioterio del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur. Los ratones machos N:NIH(S)-Fox1^{nu} SPF (Specific Pathogen Free) cuyos progenitores proceden del National Institute of Health (USA) fueron obtenidos de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de la Plata. Los ratones macho C57BL/6 se adquirieron de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de la Plata.

Métodos

Síntesis del calcitriol y sus análogos

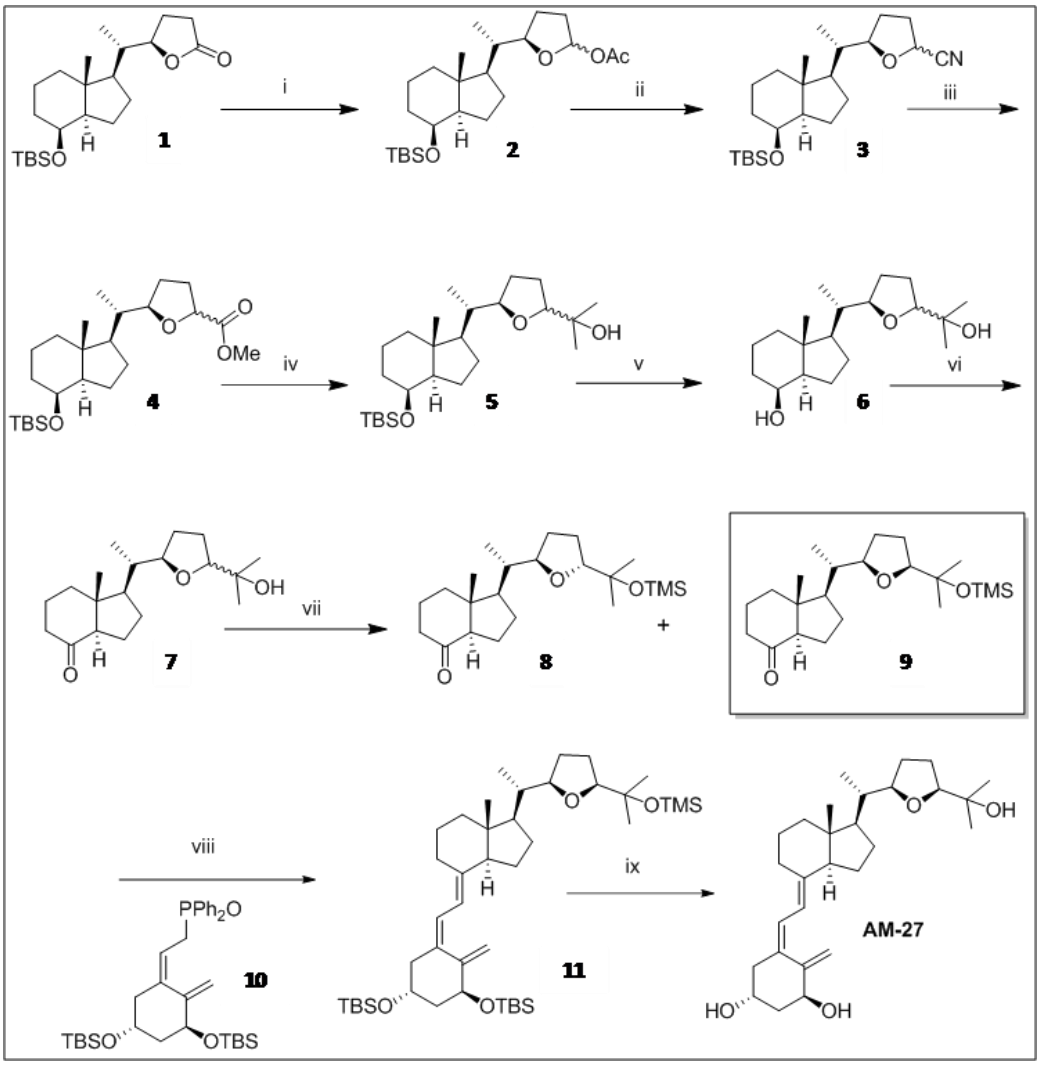
En colaboración con dos laboratorios de Química Orgánica (Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina y Universidad de Vigo, Vigo, España), hemos diseñado y sintetizado los dos análogos del calcitriol que se utilizaron en esta sección del trabajo de tesis. El análogo AM-27 posee un grupo oxolano en su cadena lateral, y el ML-344 presenta un grupo amida en su cadena lateral.

Síntesis del calcitriol

La síntesis del calcitriol se llevó a cabo siguiendo el protocolo descripto por Mouriño y colaboradores (Mouriño, A., et al., 1997), y por Fall y colaboradores (Fall, Y., et al., 2000).

Síntesis del análogo AM-27

Recientemente se ha descripto la síntesis de análogos del calcitriol con un grupo oxolano en su cadena lateral (Martínez, A., et al., 2013). Empleando la misma metodología, el análogo oxolano **AM-27** [Nombre IUPAC: (1S,3R)-Dihydroxy-(20S)-[(5'S)-(2''-hydroxy-2''-propyl)-(2'R)-tetrahydrofuryl]-22,23,24,25,26,27-hexanor-1α hydroxyvitamin D_3] fue preparado desde la lactona 1, como se muestra en el esquema 1. Por consiguiente se hizo reaccionar la Lactona **1** con DIBAL-H y se acetiló in situ, obteniéndose la correspondiente mezcla de acetatos **2**, los cuales se convirtieron en cianohidrinas cíclicas **3** al tratarse con TMSCN y BF3OEt2 a -78 ºC en CH2Cl2.

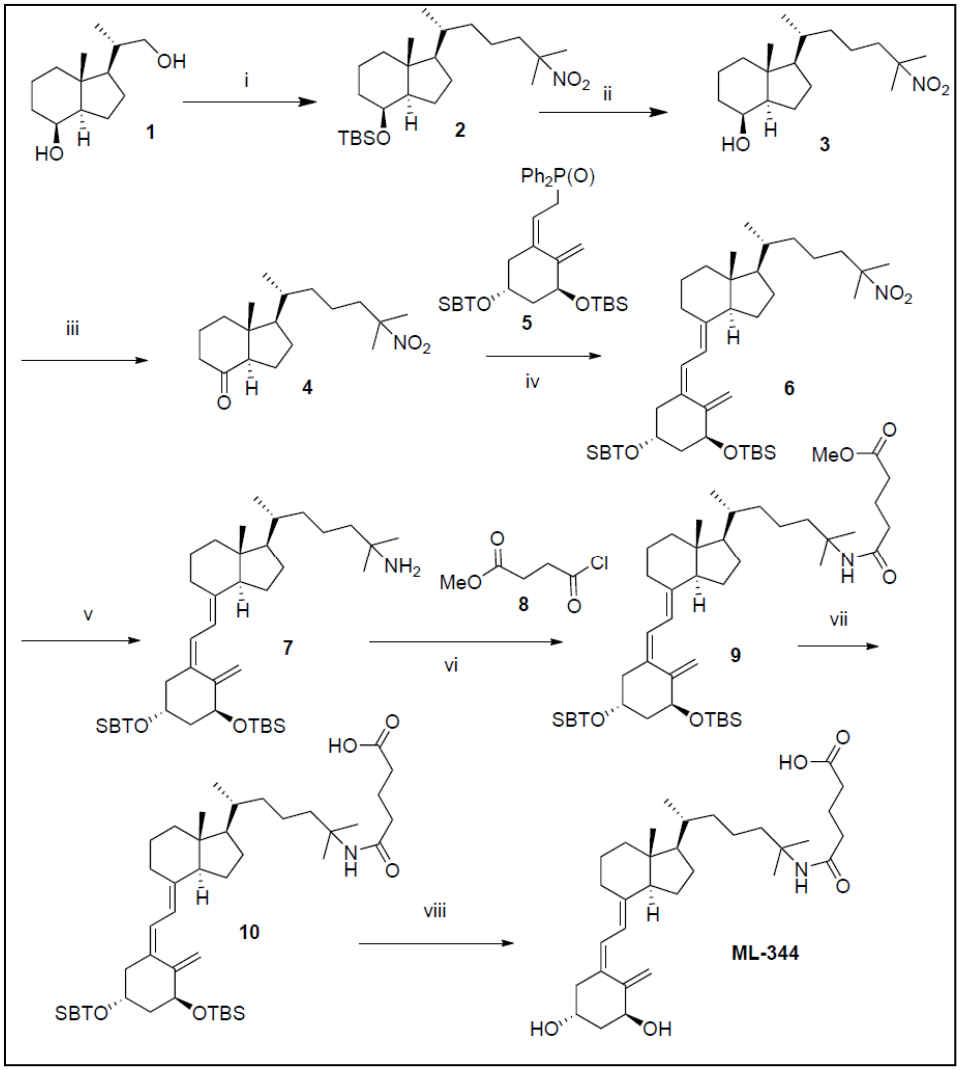


Esquema 1. Síntesis del análogo oxolano AM-27. *Reactivos y condiciones*: (i) (a) DIBAL-H, CH_2Cl_2, -78ºC, (b) Py, Ac_2O, DMAP, DCM; (ii) BF_3OEt_2, TMSCN, DCM, -78ºC; (iii) MeONa, MeOH; (iv) MeLi, THF, -78 ºC, 16 h, (65 %, from **1**, **5** pasos); (v) . HF, THF, r.t., 16 h, (92%); (vi) NMO, TPAP, MS4Å, DCM, r.t., 2 h, (90 %); (vii), TMS-Imid, THF, **8** (56%), **9** (25%); (viii) **10**, *n*-BuLi, THF, -78 ºC (70%); (ix) TBAF, THF, r.t. (95%).

Los nitrilos **3** se convirtieron a metilésteres **4**, los cuales por reacción con MeLi proporcionaron los alcoholes **5** (el rendimiento global desde la lactona **1** fue del 65%). El grupo protector TBS de **5** fue removido con HF dando como resultado una mezcla de dioles **6** (80%), los cuales se sometieron a oxidación TRAP rindiendo un 90% de cetonas **7**. La protección por TMS del grupo 25-hidroxi de **7** proporciona las cetonas **8** (56%) y **9** (25%) los cuales pueden separarse por columna cromatográfica. Con la cetona **9**disponible se procedió con la reacción de Wittig-Homer con óxido de fosfina **10**, que continúa con una destilación final que genera el análogo del calcitriol deseado, el **AM-27**.

Síntesis del análogo ML-344

Recientemente se ha descripto la síntesis de análogos del calcitriol con un grupo amida en su cadena lateral (Rivadulla, M.L., et al., 2013). El análogo ML-344 [**5-(((R)-6-((1R,3aS,7aR,E)-4-((Z)-2-((3S,5R)-3,5-dihydroxy-2-methylenecyclohexylidene) ethylidene)-7a-methyloctahydro-1H-inden-1-yl)-2-methylheptan-2-yl)amino)-5-oxopentanoic acid**] fue preparado desde el nitro derivado **2**, al cual se le retiró el grupo protector éter de sililo y se obtuvo **3**. El compuesto **3** se oxidó, obteniéndose de esta manera la cetona **4**. La cetona fue acoplada con óxido de fosfina **5**, dando como producto el compuesto **6**. A continuación se procedió a convertir el grupo nitro en amina, por lo que se obtuvo el compuesto **7**. A la amina resultante se le acopló **8**, lo que nos proporcionó el grupo amida enlazado al C25, compuesto **9.** Mediante la reacción del compuesto **9** con LiOH.H20, THF/H20 se obtiene el compuesto **10** con el grupo functional buscado al final de la cadena lateral. La posterior desprotección de los grupos hidroxilos del anillo A rinde el análogo deseado, el **ML-344**.



Esquema 2. Síntesis del análogo amida ML-344. *Reactivos y* condiciones:i) ver (Rivadulla, M.L., et al., 2013). ii) TBAF, THF (80%); iii) PDC, CH2Cl2 (92%); iv) n-BuLi, THF, -78 ºC, **5** (83%); v) LiAlH4, THF, -78 ºC (78%); vi) **8**, CH2Cl2, Et3N, 0 ºC (92%); vii) LiOH.H2O, THF/H2O, (76%); viii) TBAF, THF (75%).

Previo a los ensayos biológicos se purificaron los análogos AM-27, ML-344 por sucesivas cromatografías preparativas en placa. La pureza se determinó mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear de 1H y 13C, y por HPLC analítico (> 95%).

Preparación de la solución stock de calcitriol y análogos

El calcitriol y sus análogos fueron resuspendidos en isopropanol (calidad HPLC). Se protegieron de la luz, se gasearon con N_2 y se conservaron a -20 °C en viales de vidrio. La concentración de los mismos fue determinada por espectrometría UV realizando un

espectro de absorción entre 200 y 300 nm (Jasco V-630) y determinando la concentración mediante el empleo de la siguiente fórmula:

Concentración = dilución x DO máxima /18300 (coeficiente de extinción molar).

La concentración de las soluciones madre fueron las siguientes:

Calcitriol = 2,13 10^{-4} M; **AM-27** = 5,17 10^{-3} M; **ML-344** = 2,89 10^{-3} M

Análisis de la actividad calcemiante

Se utilizaron ratones macho, de la cepa CF1, de entre 8-10 semanas de vida y con un peso aproximado de 40 g. Los estudios de los niveles de calcio se llevaron a cabo tras una serie de inyecciones por vía intraperitoneal, durante 4 días. Se utilizaron 5 animales por condición a los cuales se los trató con una dosis de 5 µg/kg de peso corporal de calcitriol o, sus análogos (AM-27 y ML-344) o vehículo (isopropanol). Esta concentración se eligió en base a material bibliográfico en los cuales se demuestra que el calcitriol en esa concentración es suficiente para ejercer efectos antitumorales (Muindi, J.R., et al., 2010), obteniéndose en estudios farmacocinéticos una concentración máxima (C máx.) > 10,0 ng/ml y un área debajo de la curva (AUC) > 40,0 ng h/ml (Muindi J.R., et al., 2004). Además, existen estudios adicionales en los cuales se ha utilizado calcitriol u análogos del mismo en dosis menores a 5 µg/Kg de peso corporal que han logrado demostrar una reducción en la carga tumoral (Kumagai, T., et al., 2003) (Light, B.W., et al., 1997) (Prudencio, J., et al., 2001). Nuestro equipo de trabajo ya ha utilizado esta dosis en el estudio de la actividad antitumoral y calcemiante de otros análogos del calcitriol (Salomón, D.G., et al., 2011) (Ferronato, M.J., et al., 2015)[a,b]. Se tomaron muestras de sangre para analizar los niveles de calcio, a las 0 (niveles basales), 24, 48, 72 y 96 h posteriores a la administración de las drogas. Para ello, los animales fueron anestesiados con una combinación de Ketamina y Acedan ® (Holliday Scott, Argentina) en una dosis combinada de 50 mg de Ketamina y 1 mg de Acedan/kg de peso corporal y posteriormente se colectó sangre del seno retro-orbital utilizando capilares heparinizados. Las muestras fueron procesadas, protegidas de la luz y se mantuvieron en hielo. Se separó el plasma por centrifugación a 5000 rpm durante 5 min y se almacenó a -20 °C hasta su procesamiento. Se obtuvieron aproximadamente 10-30 µl de plasma por ratón.

La concentración de calcio se determinó utilizando el kit colorimétrico Ca-Color Arsenazo III AA kit (Wiener Lab, Argentina), según las indicaciones del fabricante. En tres tubos: un blanco (B), un standard (S) y la muestra a analizar (D) se procedió de la siguiente manera:

	Blanco	Estándar	Muestra
Muestra	-	-	10 µl
Estándar	-	10 µl	-
Agua destilada	10 µl	-	-
Reactivo A	1 ml	1 ml	1 ml

Se incubó la mezcla de reacción durante 2 min a temperatura ambiente (15-25 °C) y se leyó la absorbancia (Abs) en espectrofotómetro a 650 nm. El calcio plasmático se determinó utilizando la siguiente fórmula:

Calcio Sérico (mg/dl) = abs D x f; dónde f = 10 (mg/dl) /S; y S = abs estándar.

Para ajustar las diferencias debido a la posible hemólisis en las muestras, se prepararon blancos y su lectura de absorbancia se restó de la lectura de las muestras. Los niveles de calcio plasmático se consideraron normales en el rango de 8,8 a 10,4 mg/dl (Spina, C., et al., 2005). Previo a la determinación del calcio plasmático se midió el hematocrito para cada ratón antes y después de los tratamientos, sabiendo que los niveles normales del mismo varían entre 39 y 47% (Windberger, U., et al., 2003) y que niveles elevados del mismo son un síntoma de intoxicación (OECD, 1995). Los ratones fueron observados durante el tratamiento chequeando la aparición de conjuntivitis, escalofríos y sed que son síntomas que han sido asociados a la hipercalcemia (Hathcock, J.N., et al., 2007). Los datos fueron analizados utilizando el software GraphPad Prism 5 y luego se graficaron los niveles de calcio plasmático obtenidos a distintos tiempos de tratamiento con los análogos, comparándolos con los niveles obtenidos por el calcitriol.

Tratamientos con calcitriol y análogos

Los cultivos de las líneas celulares T98G, U251, GL26, HN12, HN13 y cultivo primario de astrocitos humanos fueron tratados con calcitriol, AM-27, ML-344 e isopropanol (control) durante los tiempos y las dosis indicadas en cada experimento.

Cultivos Celulares

Mantenimiento de los cultivos celulares

Se utilizaron las líneas celulares de glioma humano T98G y U251, murino GL26 y el cultivo primario de astrocitos humanos. Se utilizaron las líneas de carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello humano HN12 y HN13. Las células HN12, HN13, T98G, U251 y el cultivo primario de astrocitos se mantuvieron a 37 °C, 5% CO_2 en DMEM supplementado con 100 U/ml penicilina, 100 U/ml estreptomicina, 4 mM glutamina y 10% de suero fetal bovino (FBS). Las células GL26 se mantuvieron en medio RPMI (Sigma) suplementado con 10% (v/v) de FBS (Gibco), L-gltamina (5 mM, Gibco), penicilina (100 U/ml, Gibco) y estreptomicina (100 µg/ml, Gibco). Las células de todas las líneas fueron plaqueadas cada 3−4 días.

Ensayos Celulares

Análisis de la viabilidad celular: conteo manual de células en cámara de Neubauer y ensayo WST-1

En primera instancia, se estudió el efecto de los compuestos mediante conteo celular manual en cámara de Neubauer y posteriormente se analizaron los efectos empleando el ensayo WST-1. A tal fin, se sembraron las líneas celulares con una densidad de 500 a 2000 células por pocillo en placas de 96 pocillos dependiendo de la línea celular utilizada, en 100 µl de medio de cultivo completo. Se prepararon las dosis para los tratamientos celulares a partir de la solución madre eligiéndose concentraciones entre 0,01 a 100 nM de calcitriol, análogos (AM-27 y ML-344) o vehículo (isopropanol), preparadas de la siguiente manera: se prepararon diluciones 1 µM (10^{-6} M) en medio estéril partiendo de las soluciones madre, luego se tomaron 100 µl y se lo agregó a un tubo eppendorf estéril conteniendo 900 µl de medio completo, obteniéndose de este modo una solución de 100 nM (10^{-7} M). Se realizaron diluciones seriadas hasta llegar a la dilución de 0,01 nM (10^{-11} M). A las 24 h de sembradas las células se comenzó el tratamiento con 0.01 a 100 nM de calcitriol, AM-27, ML-344 o vehículo (isopropanol). El medio fue reemplazado cada dos días y el ensayo se prolongó por 120 h. Luego, se lavaron las células con PBS, se tripsinizaron y se resuspendieron en 100 µl del medio correspondiente a cada línea. A

posteriori, se procedió al conteo empleando un hemocitómetro. La información obtenida se analizó empleando ANOVA de dos vías. El test de Bonferroni se usó para determinar la significancia estadística entre los conjuntos de muestras. Los gráficos se hicieron usando el programa Prism 5.0 (GraphPad Prism Software). Por otro lado, una vez finalizados los tiempos de incubación de las células, se añadió a todos los pocillos el reactivo WST-1 (1:10) durante 1 h. Las placas se mantuvieron durante este tiempo a 37 ºC y 5% CO_2. Se extrajeron los 100 µl de cada pocillo y se colocaron en tubos individuales para leer las absorbancias en el espectrofotómetro (Jasco V-630). Cada tratamiento se realizó por triplicado para cada línea celular. El isopropanol se utilizó en una cantidad máxima de 0,1 % v/v por pocillo, no encontrándose que esta cantidad de alcohol tuviera un efecto significativo sobre la viabilidad de las líneas celulares utilizadas. Se graficó el número de células utilizando el software Graph Pad Prism 5 y se comparó la cantidad de células obtenidas luego del tratamiento con los análogos con las obtenidas luego del tratamiento con calcitriol. Se determinaron también las concentraciones inhibitorias al 50 % (IC_{50}) de las líneas que respondieron a los análogos y se compararon con las IC_{50} del calcitriol.

Determinación de la concentración inhibitoria media (IC_{50})

El log de la dosis de cada análogo se representó gráficamente frente al porcentaje de inhibición, y se utilizó el registro de análisis de regresión de la curva de dosis-respuesta para el cálculo de IC_{50} por medio del software GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA).

Análisis de la migración celular

Se realizó el ensayo de "*wound healing*" (Petit, V., et al., 2000). Este método imita la migración celular durante la cicatrización *in vivo*. Se genera una herida en una monocapa celular, se toman imágenes al comienzo y a intervalos regulares durante el tiempo de experimentación –que varía en función del tiempo de duplicación de cada línea-. Se compara el área de la herida, empleando las fotografías adquiridas, para cuantificar la tasa migratoria de las células.

Para esto, se sembraron las células en placas de Petri de 35 mm de diámetro y se cultivaron por 24 h hasta que formaron una monocapa. Luego se realizó una injuria con un tip de una micropipeta de 200 µl, lo que generó una sección descubierta de la monocapa

celular. Se retiró el medio de cultivo y se añadió nuevo medio de cultivo con análogo (AM-27 o ML-344) en una concentración de 0,01 nM, calcitriol o el vehículo (isopropanol). Las células fueron observadas y fotografiadas con un microscopio Nikon Eclipse TE 2000S con cámara digital Sony Coolpix 14 a las 0 h y a diferentes intervalos de tiempo según la línea. Se utilizó el programa 1.37v ImageJ (NIH) para medir el área descubierta para cada tratamiento, a las distintas horas, y se compararon los tratamientos. Los gráficos representan el porcentaje de herida no cubierta en los distintos intervalos de tiempo. Los resultados representan el promedio de tres experimentos independientes ± SD (con 4 réplicas cada uno). El test t se empleó para determinar la significancia entre los conjuntos de muestras. Los resultados se analizaron con ANOVA de dos vías con posterior test de Bonferroni. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

Análisis del ciclo celular por citometría de flujo

Se sembró en placas de petri de 100 mm una cantidad tal de células para que al momento de finalizar el tratamiento con los diferentes compuestos, la placa tuviera un 80% de confluencia. Entonces se sembraron las placas y 24 h después se cambió el medio de cultivo y se agregó medio de cultivo con el tratamiento (vehículo, calcitriol o análogo). El medio con cada droga se renovó cada dos días. A las 120 h las células se tripsinizaron, se lavaron con 1 ml de PBS frío y se centrifugaron a 1200 rpm por 5 min. Luego las células se re-suspendieron en PBS y se centrifugaron, nuevamente, a 1200 rpm por 5 min. Los pellets se re-suspendieron en un tubo mediante el agregado gota a gota de 1 ml de etanol 70% (v/v) a -20 ºC, donde fueron fijadas por 30 min a 2 ºC (las células se almacenaron a -20 ºC previo a la tinción y hasta el momento del análisis por citometría de flujo por un período no mayor a 15 días). Las células suspendidas en etanol se centrifugaron a 1200 rpm por 5 min, se lavaron con PBS frío, se re-suspendieron en 0,5 ml de PBS que contenía 10 µg/ml de ioduro de propidio (IP) y 250 µg/ml ARNasa. Se las conservó en oscuridad a 37 °C por 60 min. Se realizó el análisis en un citómetro de flujo FACSCalibur usando una longitud de onda de excitación de 488 nm y de 585 nm de emisión. Se empleó un programa para histogramas de deconvolución de la frecuencia del contenido de ADN (ModFit LT cell cycle analysis software) y se graficó el porcentaje de células en cada una de las distintas fases del ciclo celular. Se realizaron tres experimentos independientes por duplicado.

Análisis de TUNEL

Se sembraron 50.000 células en cubreobjetos dentro de una caja de 35 mm. A las 24 h se trataron con vehículo, calcitriol o AM-27 (100 NM) por 120 h. Una vez finalizado el tratamiento, las células se fijaron con formaldehido 4% en PBS, durante una hora a temperatura ambiente. Se realizaron dos lavados y se incubaron con solución de bloqueo (H_2O_2 3% en metanol) durante 10 minutos. Los cubreobjetos se lavaron nuevamente y se cubrieron con la solución permeabilizante (0,1% tritón X-100 en 0,1% de citrato de sodio). Se empleó el In Situ Cell Death Kit de detección, POD (Roche) para detectar las células apoptóticas. Se tomaron fotografías de los cubreobjetos, diez campos por condición, con un microscopio de fase invertida Nikon Eclipse TE 2000S. Magnificación 200X.

Análisis del potencial de membrana mitocondrial

Las células se sembraron en cubreobjetos dentro de cajas de petri de 35 mm. A las 24 h comenzó el tratamiento por 6 h con vehículo o con la IC_{50} de cada análogo. Concluidos los tratamientos, se retiró el medio y las células se incubaron por 30 minutos con la sonda fluorescente a una concentración de 200 nM (0.1 g/mL; MitoTracker; Molecular Probes) la cual marca con un color fluorescente rojo brillante a las mitocondrias activas, o sea a las que retienen su potencial de membrana. Luego, se lavaron y se fijaron con paraformaldehido 4% por 20 minutos. Después se colocaron sobre un portaobjetos con medio de montaje apropiado para fluorescencia (VectaShield®, Vector Labs). Se analizaron en un microscopio de fase invertida Nikon Eclipse TE 2000S a una magnificación de 200X. Se tomaron fotografías de, al menos, 10 campos al azar y se analizaron con el software ImageJ (Rotstein, N.P., et al., 2003) (Miranda, G.E., at al., 2011).

Análisis de la liberación de lactato deshidrogenasa

La enzima citosólica lactato deshidrogenasa (LDH) es liberada al medio frente a un aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática. Se emplea como marcador de daño oxidativo y para el análisis del proceso de necrosis. Analizamos la actividad de LDH espectrofotométricamente y empleando el kit LDH-P UV AA (Wiener Lab). Este método

cinético mide la conversión de la forma reducida del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADH) a su forma oxidada (NAD^+).

$$\text{Piruvato} + \text{NADH} + H^+ \xrightarrow{\text{LDH}} \text{L-Lactato} + NAD^+$$

Se tomaron alícuotas de 20µl del medio de cultivo donde se sembraron y trataron las líneas celulares y 20 µl del plasma extraído de los ratones tratados y se procedió a realizar el ensayo de acuerdo con lo descripto en el kit. En espectrofotómetro se comprobó que 1 ml de la mezcla de los reactivos poseía una lectura de absorbancia, a 340 nm, dentro del rango que asegura linealidad (0,8-1,4). A cada alícuota de medio de cultivo o de plasma, según corresponda, se agregó 1 ml de la mezcla de uso y este momento se consideró como el tiempo cero (t0) de la reacción. Se registraron los valores de absorbancia a 340 nm a los 30, 90, 150 y 210 segundos desde el t0, obteniéndose una curva de pendiente negativa. Luego se calcularon los diferenciales de absorbancia por minuto, los cuales fueron promediados y multiplicados por un factor provisto por el fabricante para la temperatura de reacción utilizada (35 °C). Como control positivo se empleó H_2O_2 300 µM. Los resultados se expresaron en unidades por litro (U/L). La evaluación estadística fue realizada con un test t de student.

Ensayos *in vivo*

Modelo de xenotrasplante subcutáneo de células HN12 en ratones inmunosuprimidos

Se empleó la cepa de ratones atímicos nude (N: NIH(S)-Fox1^{nu}) de 6 semanas de edad y con un peso aproximado de 20 g. Los animales fueron alojados en jaulas apropiadas en el bioterio del INIBIBB (Instituto Nacional de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca), con acceso irrestricto al alimento y al agua y bajo ciclos de luz/oscuridad de 12 horas cada uno.

Empleamos 10 ratones macho, los cuales fueron divididos en dos grupos de 5 animales cada uno. A los 70 días de edad se les administraron por vía subcutánea 7 x 10^6 de células HN12 (Patel, V., et al., 1998) (Kawakami, K., et al., 2004) en el flanco derecho utilizando una jeringa monoject 200. A las dos semanas de inocular las células tumorales, los animales presentaron tumores palpables, se dividieron aleatoriamente en dos grupos y se comenzó con el tratamiento con el análogo AM-27 (50 µg/Kg de peso), o vehículo, ambos disueltos en solución fisiológica para su inyección subcutánea en el flanco derecho

(Marinissen, M.J., et al., 2006) (Martín, M.J., et al., 2007) (Ferronato, M.J., et al., 2015)[a]. Los tratamientos con AM-27 se realizaron día por medio llegando a 9 dosis totales. De la misma manera se procesó el grupo control. En cada aplicación se midió el tamaño del tumor con calibre para estimar su volumen utilizando la fórmula **π/6 x a x b2**, donde a y b son las 2 dimensiones del tumor, se asume una forma elipsoidal (Geran, R.I., et al., 1972), y se controló el peso y estado general de los animales. Luego de las aplicaciones, los animales fueron sacrificados bajo una atmósfera de CO_2 según recomendaciones de la Guía de Buenas Prácticas con Animales de Experimentación (http://www.upei.ca/humanres/files/humanres/ExperimentalAnimals_ GDL.pdf). Los tumores disecados se volvieron a medir, se pesaron, se fotografiaron y se destinaron para su posterior procesamiento por las técnicas histológicas. Para analizar el volumen de los tumores obtenidos en ambos grupos se empleó la fórmula **π/6 x a x b x c**, donde a, b y c son las 3 dimensiones del tumor (se asume una forma elipsoidal) (Geran, R.I., et al., 1972). También fueron recolectados riñón, bazo e hígado para evaluar, mediante técnicas histológicas, posibles efectos adversos del análogo sobre los mismos. Se utilizó la prueba t de *Student* para determinar si existían diferencias entre el grupo tratado y el control.

Modelo singeneico subcutáneo de células de GBM en ratones C57BL/6

La línea GL26, que deriva de un neoplasma intracraneal de ratones hembra de la cepa C57BL/6, es altamente tumorigénica en esta cepa (Ausman, J.I., et al., 1970). Por lo tanto, se adquirieron del bioterio de La Plata ratones hembras de la cepa C57BL/6, de 6 a 8 semanas de edad. Las células GL26 se cultivaron en medio completo RPMI en las condiciones ya descriptas. Los ratones fueron inoculados subcutáneamente con 1×10^6 de células GL26 en el flanco izquierdo afeitado. Las aplicaciones de análogo y vehículo comenzaron y se realizaron de la manera descripta para el modelo animal de CCECC. El tamaño del tumor se evaluó tres veces a la semana y se registró el área del tumor mediante la medición de los diámetros mayores perpendiculares, tal como se detalló para el modelo anterior. De la misma manera se procesaron los tumores y los órganos.

Ensayos Histológicos. Procesamiento de órganos y tumores para histología

Los órganos y tumores removidos de los ratones se colocaron en *cassettes* individuales y se fijaron en formol 10% por 24 h. Luego, fueron enjuagados bajo agua corriente durante 15 min, escurridos y colocados en concentraciones crecientes de alcohol (70-96-100-100 %); posteriormente se colocaron en xilol por 2 h y, una vez transcurrido ese tiempo, se secaron y pasaron a frascos que contenían parafina a 56 ºC; transcurridas 3 h se procedió a armar los tacos y rotularlos. Se realizaron cortes de 0,5 µm de espesor con un micrótomo Leica RM 2145 y se colocaron en portaobjetos. Una vez secos, los vidrios se sumergieron en xilol y se colocaron en estufa a 60 ºC por 30 min para fundir la parafina. Posteriormente los tejidos fueron re-hidratados por medio de una secuencia de inmersiones alcohólicas consecutivas de 5 min de duración que consisten en baños de concentraciones decrecientes de alcoholes (100, 96, 80 y 70%). Luego se colocaron en agua destilada por 5 min, se pasaron por hematoxilina 15 segundos y por alcohol 70% por 2 min. Posteriormente, se sumergieron en eosina 30 segundos y se pasaron por concentraciones crecientes de alcohol (70, 96 y 100%), 30 segundos cada uno. Finalmente, se colocaron en xilol y se realizó el montaje utilizando el medio Permount. Al día siguiente, los preparados fueron observados con un microscopio Olympus CX31 equipado con una cámara Lumera Infinity Microscopy USB 2.0 para observar características histopatológicas. Además, cada corte fue evaluado por el Médico Patólogo, integrante y colaborador del laboratorio, Julián Arévalo.

Hematoxilina según Harrys		Eosina	
Hematoxilina	5 g	Eosina	1 g
Alcohol 100	50 ml	Agua destilada	100 ml
Alumbre de K	100 g	Alcohol 96	780 ml
Agua destilada	920 ml	Floxilina B (1g/100ml H2Od)	10 ml
Óxido rojo de Hg	2,5 g	Ácido acético	4 ml
Ácido acético	30 ml		

Estudios computacionales

Los estudios computacionales se desarrollaron empleando como referencia la estructura cristalográfica del complejo VDR-Calcitriol (código PDB: 1DB1) (Rochel, N., et al., 2000).

Las estructuras iniciales del calcitriol y de AM-27 se construyeron empleando el software MarvinSketch (MarvinSketch v.16.2.15.0, 2016); luego, los análisis energéticos y estructurales se desarrollaron empleando el software Gaussian03 (Frisch, M.J., et al., 2003).

Los ensayos de docking molecular se llevaron a cabo empleando los paquetes de software desarrollados por OpenEye Scientific Software. Los procedimientos de Docking consisten en tres etapas secuenciales: a) generación de una biblioteca de confórmeros del ligando, que se llevó a cabo en un umbral de energía de 10 kcal/mol usando el software OMEGA (Hawkins, P.C. & Nicholls, A., 2012); b) las corridas de docking, las cuales se desarrollan aplicando un método exhaustivo de docking como el implementado en el software FRED3 (McGann, M., 2011), con la función de puntuación ChemGauss3 utilizándose para evaluar y clasificar las poses resultante. La pose de menor energía fue considerada para posteriores análisis. c) involucra la visualización tridimensional y predicción de interacciones intermoleculares, los cuales se desarrollan empleando los paquetes de software VIDA (VIDA 4.2.1 OpenEye Scientific Software) y LigPlot+ (Laskowski, R.A., & Swindells, M.B. 2011), respectivamente.

Con el objetivo de obtener y analizar las trayectorias de dinámica molecular se empleó el paquete de software AMBER14 (Salomon-Ferrer, R., et al., 2013). Las cargas atómicas y los parámetros moleculares correspondientes al calcitriol y a AM-27 fueron asignados desde el campo de fuerza GAFF (Wang, J., et al., 2004), mientras que las correspondientes a la macromolécula fueron asignados desde el campo de fuerza 99SB, AMBER (Hornak, V., et al., 2006).

Los complejos predecidos por dinámica molecular fueron usados como las estructuras iniciales, solvatadas con una caja octaédrica pre -equilibrada TIP3P de moléculas de agua, y se sometieron a la minimización energética. Los sistemas minimizados se calentaron a 298 °K por 100 ps, el uso de un lapso de tiempo de 2 fs en condiciones de presión y temperatura constantes. El algoritmo SHAKE se aplicó a limitar enlaces que implican átomos de hidrógeno. Después de concluir la fase de calentamiento, se realizó una etapa de equilibrado (1 ns) y seguido de las etapas de producción correspondientes (80 ns). Los análisis de las trayectorias DM se llevaron a cabo utilizando el módulo Cpptraj de AMBER14, los análisis energéticos y de descomposición por residuo se realizaron mediante la aplicación de la mecánica molecular superficie Poisson -Boltzmann (MM-PBSA) método como el aplicado en la herramienta de MMPBSA.py (Miller, I., et al., 2012). Los resultados de las trayectorias fueron visualizados empleando el software VMD v.1.9

(Humphrey, W., et al., 1996). En todos los casos, las trayectorias de DM fueron obtenidas empleando el código designado CUDA (pmemd.cuda), con las facilidades computacionales provistas por el grupo computador GPGPU de la Facultad de Matemática, Astronomía y Física (FAMAF), Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Análisis estadístico

La evaluación estadística de los datos se realizó en base a los valores promedio y desvío estándar (SD) de "n" experimentos independientes. Para los ensayos de calcemia y hematocrito, citometría de flujo, TUNEL, potencial de membrana mitocondrial y peso relativo de los órganos se utilizó el test de *Student*. Para los ensayos de viabilidad celular, migración celular, LDH, peso corporal en función del tiempo y volumen tumoral en el tiempo se realizó un ANOVA (de dos vias) con posterior test de Bonferroni para la comparación de los grupos. Para los ensayos en los que se midió peso y volumen tumoral final se utilizó el test de Mann Whitney. Todos los análisis fueron realizados utilizando el software GraphPad Prism 5 (San Diego California USA).

Resultados

“Hay derrotas que tienen más dignidad que una victoria.”
Jorge Luis Borges

“Aun después de confirmada por varios experimentos, la hipótesis puede considerarse como verdadera sólo para las condiciones bajo las cuales se efectuaron las pruebas.”
William Ian Beardmore Beveridge

I- Estudio de la actividad hipercalcemiante y la toxicidad de los análogos AM-27 y ML-344 en ratones CF-1

Con la síntesis de análogos de la vitamina D se procura obtener compuestos que puedan suministrarse en las dosis necesarias para que manifiesten la actividad anitumoral, pero con escaso o nulo efecto sobre el aumento de calcio en sangre. Por lo tanto, es necesario que antes de estudiar la potencialidad antitumoral, se analice la actividad calcémica de los compuestos sintéticos, así como también su toxicidad (objetivo 1). Para estudiar si el AM-27 y el ML-344 producen hipercalcemia, se inyectaron intraperitonealmente a ratones CF-1 diariamente. La dosis de partida de los compuestos se seleccionó en función de bibliografía previa y de trabajos de nuestro laboratorio. Un ensayo farmacocinético demostró que 5 µg/kg de calcitriol administrado en una única dosis de manera intraperitoneal, manifiesta una Cmax > 10 ng/ml y deja un área bajo la curva (AUC) mayor de 40 ng/ml. Estas concentraciones son superiores a las necesarias para que se manifieste la actividad antitumoral (Muindi, J.R., et al., 2004) (Muindi, J.R., et al., 2010). Además, otros trabajos (Light, B.W., et al., 1997) (Prudencio, J., et al., 2001) (Kumagai, T., et al., 2003) también demostraron reducción de la carga tumoral en ratones tratados con calcitriol o análogos de este en dosis menores a la de 5 µg/kg de peso.

Por todo lo mencionado en el párrafo anterior, comenzamos los estudios de calcemia evaluando la dosis de 5 µg/kg de peso. Se realizaron extracciones de sangre del seno retro-orbital seguidas de la inyección de los análogos AM-27, ML-344 o de calcitriol a las 0, 24, 48, 72 y 96 h, con posterior análisis de los niveles de calcio plasmáticos de acuerdo a lo descripto en la sección de Materiales y Métodos. Se tomaron como valores normales de referencia de calcio plasmático entre 8,8 y 10,4 mg/dl (Spina, C., et al., 2005). La figura 16 muestra que los nuevos análogos AM-27 (A) y ML-344 (B) no son hipercalcemiantes a la concentración y tiempos ensayados. Sin embargo, y como era de esperar, el calcitriol sí produjo hipercalcemia ya a las 24 h (10,88 mg/dl ± 2,38 mg/dl; ***$p < 0.001$), y mantuvo el efecto hasta la muerte de los ratones que ocurrió a las 72 h de comenzados los tratamientos. Además de presentar hipercalcemia, los animales tratados con calcitriol presentaron conjuntivitis, escalofríos y sed, signos que se asocian con hipercalcemia (Hathcock,J.N., et al., 2007) así como también presentaron signos de dolor (letargo, contracción de los músculos orbitales, aplanamiento de la parte superior de la nariz y aplanamiento de las almohadillas de los bigotes, cambios en la posición, orientación y forma de las orejas y, por último, cambios en la disposición de los bigotes)

(Sotocinal, S.G.,et al., 2011). Además, a las 72 h de tratamiento se incrementó el hematocrito por encima de los valores normales (calcitriol: 54,11% ± 1,41% **vs** vehículo: 42,04% ± 4,98%; **p= 0,0021), evento relacionado con intoxicación (OECD, 1995) (figura 16 A y B). Por otro lado, ninguno de los dos análogos demostró producir en los ratones los mencionados signos de intoxicación. Los hematocritos de los animales también se mantuvieron dentro de los rangos normales (AM-27: 47,09% ± 4,71% y ML-344: 47,25% ± 3,48%).

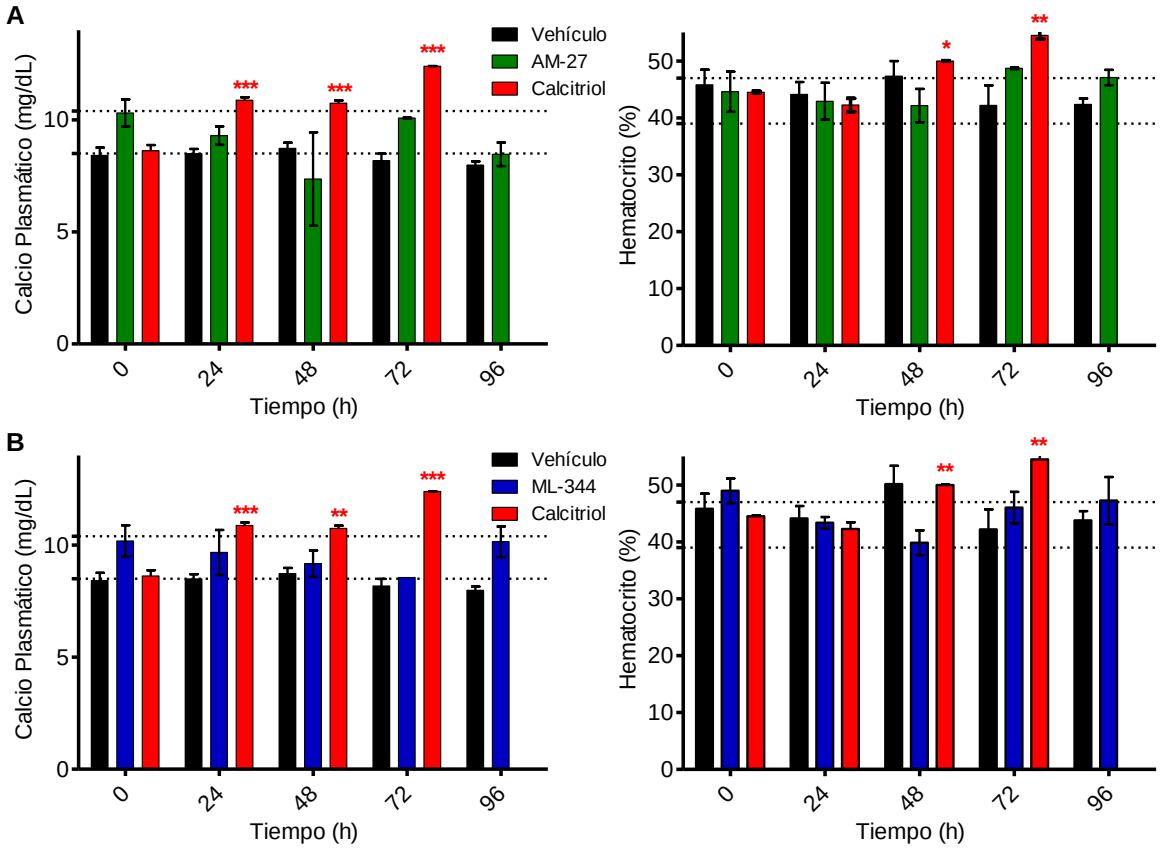


Figura 16. Niveles plasmáticos de calcio y hematocritos, en respuesta a inyecciones intraperitoneales diarias delos análogos AM-27 y ML-344 o calcitriol. Cada barra representa el promedio ± SD de los valores plasmáticos de calcio de 5 animales luego de la administración de 5 µg/kg de peso de AM-27 (A) o ML-344 (B), calcitriol o vehículo. El ensayo fue repetido 3 veces. Se realizó un test de Student, ***p<0,001 y **p<0,01.

II- Efecto de los análogos AM-27 y ML-344 sobre la viabilidad de células de CCECC y GBM

Luego de comprobar la ausencia de efectos hipercalcemiantes de los análogos AM-27 y ML-344 comenzamos a desarrollar el segundo objetivo, que incluía evaluar el efecto de

los análogos sobre la viabilidad celular. A tal fin se llevaron a cabo ensayos de dosis-respuesta en las líneas de CCECC (HN12 y HN13), de GBM humano (T98G y U251) y murino (GL26) y de células de cultivo primario de astrocitos humanos, luego del tratamiento con diferentes dosis de los análogos. Se analizaron concentraciones de los análogos que corresponden a dosis fisiológicas y supra-fisiológicas del calcitriol. Debido a que trabajos previos de nuestro laboratorio con otros análogos habían demostrado que la reducción de la viabilidad celular comienza a observarse a partir de las 72 h de tratamiento, comenzamos estos estudios utilizando tiempos más prolongados (120 h). Se comparó el efecto de cada uno de los análogos con el efecto producido por el calcitriol y se calculó cada concentración inhibitoria media (IC_{50}) para cada tipo celular.

En la figura 17 se puede observar que luego del tratamiento con una concentración 10^{-7} M de **AM-27** hay una importante disminución en el conteo celular de las líneas de carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello HN12 y HN13, y de las líneas de glioblastoma multiforme GL26, T98G y U251. En cambio no se observó efecto sobre la viabilidad de las células no malignas, es decir aquellas provenientes del cultivo primario de astrocitos. El calcitriol también produjo una disminución en el conteo de todas las líneas, excepto de la línea U251. Sin embargo, a diferencia del AM-27, redujo la cantidad de células del cultivo primario de astrocitos. El ensayo con WST-1 mostró resultados similares a los observados en el conteo manual para cada línea celular. En la tabla 8, se detallan las concentraciones inhibitorias medias (IC_{50}) para el AM-27 y para el calcitriol en todas las líneas ensayadas.

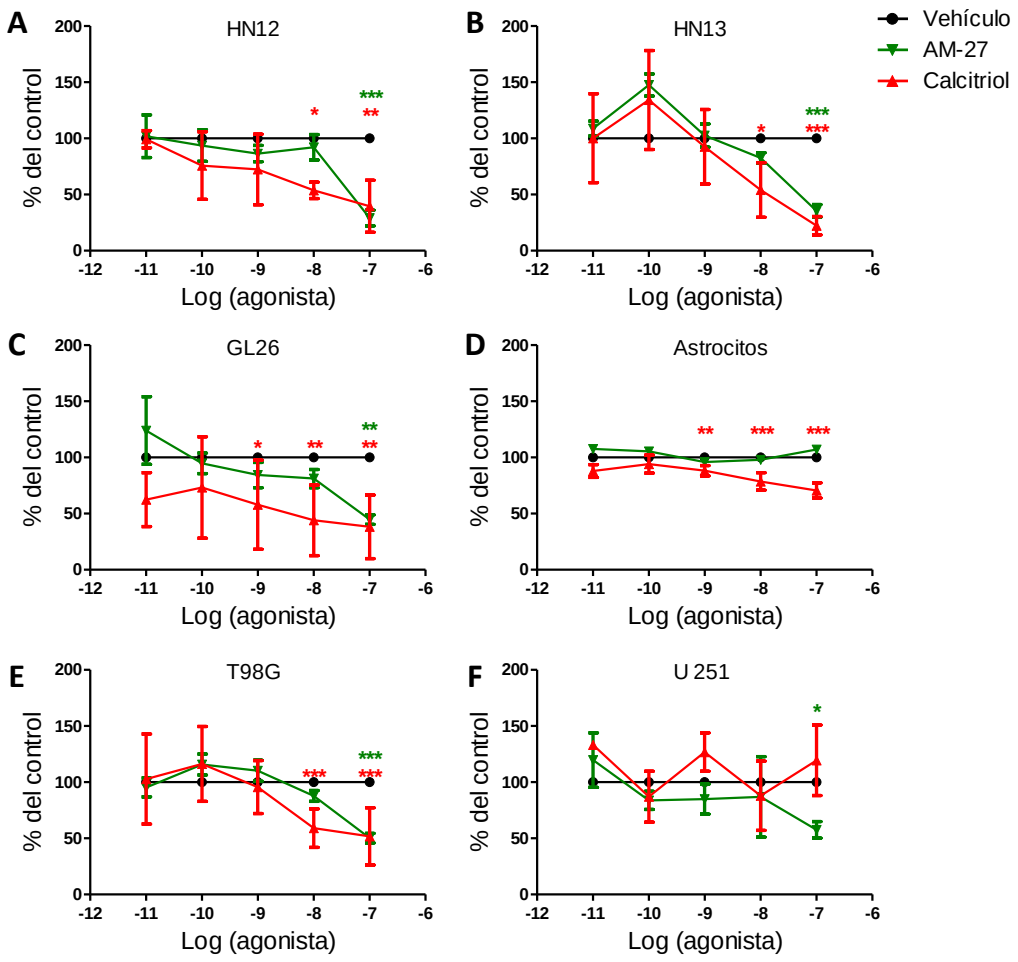


Figura 17. Ensayos dosis-respuesta del análogo AM-27 (verde) ydel calcitriol (rojo) sobre la viabilidad celular de diferentes líneas celulares de cáncer. A. HN12, B. HN13, C. GL26, D Astrocitos, E. T98G, F. U251. Las células fueron tratadas con las dosis indicadas de AM-27, calcitriol o vehículo (isopropanol), por 120h. Cada punto representa el promedio de cuatro repeticiones ± SD. El ensayo fue repetido 3 veces para cada línea. Se realizó ANOVA (de dos vías) con posterior test de Bonferroni, *** p<0,001; ** p<0,01; * p<0,05.

Línea celular	IC_{50} (nM)	
	Calcitriol	AM27
HN12	76.31	180.5
HN13	18.14	64.54
GL26	10.87	393.8
Astrocitos	48.88	–
T98G	17.80	174.1
U251	–	306.9

Tabla 8. Valores IC_{50} (nM) del AM-27 obtenidos para cada línea, comparados con los valores de IC_{50} del calcitriol.

Para el caso del análogo denominado **ML-344** se comenzó de la misma manera que con el AM-27, estudiando el efecto del compuesto sobre el número de células (viabilidad celular). En la figura 18, se puede observar que el análogo **ML-344** redujo el conteo celular de HN12 y no afectó el conteo de las líneas humanas HN13, T98G y U251, aunque fue significativo su efecto sobre la línea murina de GBM GL26. A diferencia de lo que ocurrió con el análogo anterior, ML-344 afectó significativamente la viabilidad del cultivo primario de astrocitos.

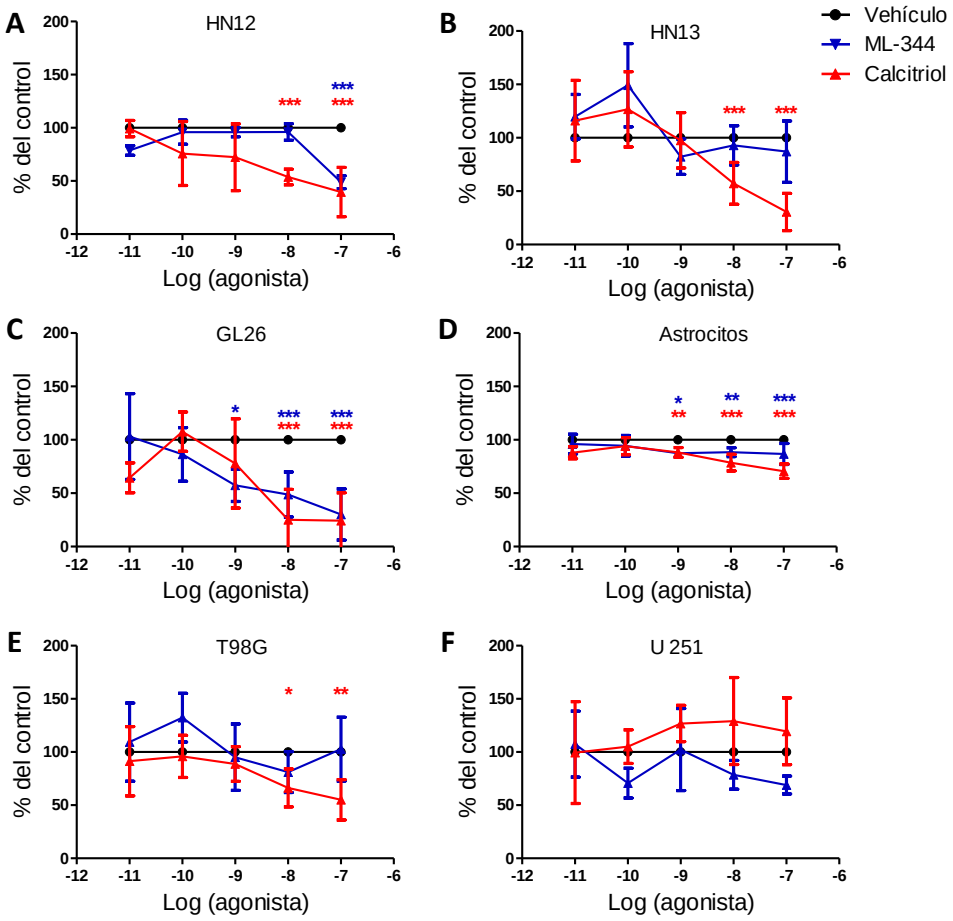


Figura 18. Ensayos dosis-respuesta del análogo ML-344 (azul) y del calcitriol (rojo) sobre la viabilidad celular de diferentes líneas celulares de cáncer. A. HN12, B. HN13, C. GL26, D. Astrocitos, E. T98G, F. U251. Las células fueron tratadas con las dosis indicadas de ML-344, calcitriol o vehículo (isopropanol), por 120h. Cada punto representa el promedio de cuatro repeticiones ± SD. El ensayo fue repetido 3 veces para cada línea. Se realizó ANOVA (de dos vías) con posterior test de Bonferroni, *** p<0,001; ** p<0,01; * p<0,05.

En la tabla 9, se detallan las concentraciones inhibitorias medias (IC_{50}) para el ML-344 y para el calcitriol en todas las líneas ensayadas

Línea celular	IC_{50} (nM)	
	Calcitriol	ML-344
HN12	22,08	183,5
HN13	38,38	63,87
GL26	16,09	2,437
Astrocitos	77,94	10,22
T98G	70,68	463,88
U251	–	88,45

Tabla 9. Valores IC_{50} (nM) del ML-344 obtenidos para cada línea, comparados con los valores de IC_{50} del calcitriol.

III- Efecto de los análogos AM-27 y ML-344 sobre la migración de células de CCECC y GBM

Dentro de las "capacidades" que adquiere una célula en su transformación hacia una célula tumoral, se encuentra la invasividad. Se ha documentado con anterioridad, incluso nuestro laboratorio lo ha hecho (Salomón, D.G., et al., 2011) (Ferronato, M.J., et al., 2015)[a,b] que el calcitriol y algunos de sus análogos consiguen modular este proceso. Por estas razones, y como parte del objetivo 2, comenzamos evaluando si los análogos AM-27 y ML-344 poseen algún efecto inhibitorio sobre la migración celular, que es una de las capacidades celulares involucradas en la invasión. Los tiempos del ensayo de migración celular nunca fueron superiores al tiempo de duplicación correspondiente para cada línea celular. En la figura 19 puede observarse que el análogo **AM-27** retarda levemente la migración celular de las líneas de glioblastoma multiforme humano T98G (AM-27: 33,05% vs. vehículo: 19,97%) y U251 (AM-27: 66,32% vs. vehículo: 58,25%), pero no altera la migración de la línea de glioblastoma multiforme murino GL26. Por otra parte, no se observaron diferencias en la migración de las líneas de carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello HN12 y HN13 luego del tratamiento con AM-27.

En la figura 20 puede observarse que el análogo **ML-344** se comportó de manera similar al AM-27 dado que no afectó la migración de las líneas de carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello HN12 y HN13 ni tampoco la de glioblastoma multiforme murino GL26 y sí retardó la migración de las líneas de glioblastoma multiforme humano T98G (ML-344: 31,90% vs vehículo: 6,04%) y U251 (AM-27: 67,36% vs vehículo: 58,25%).

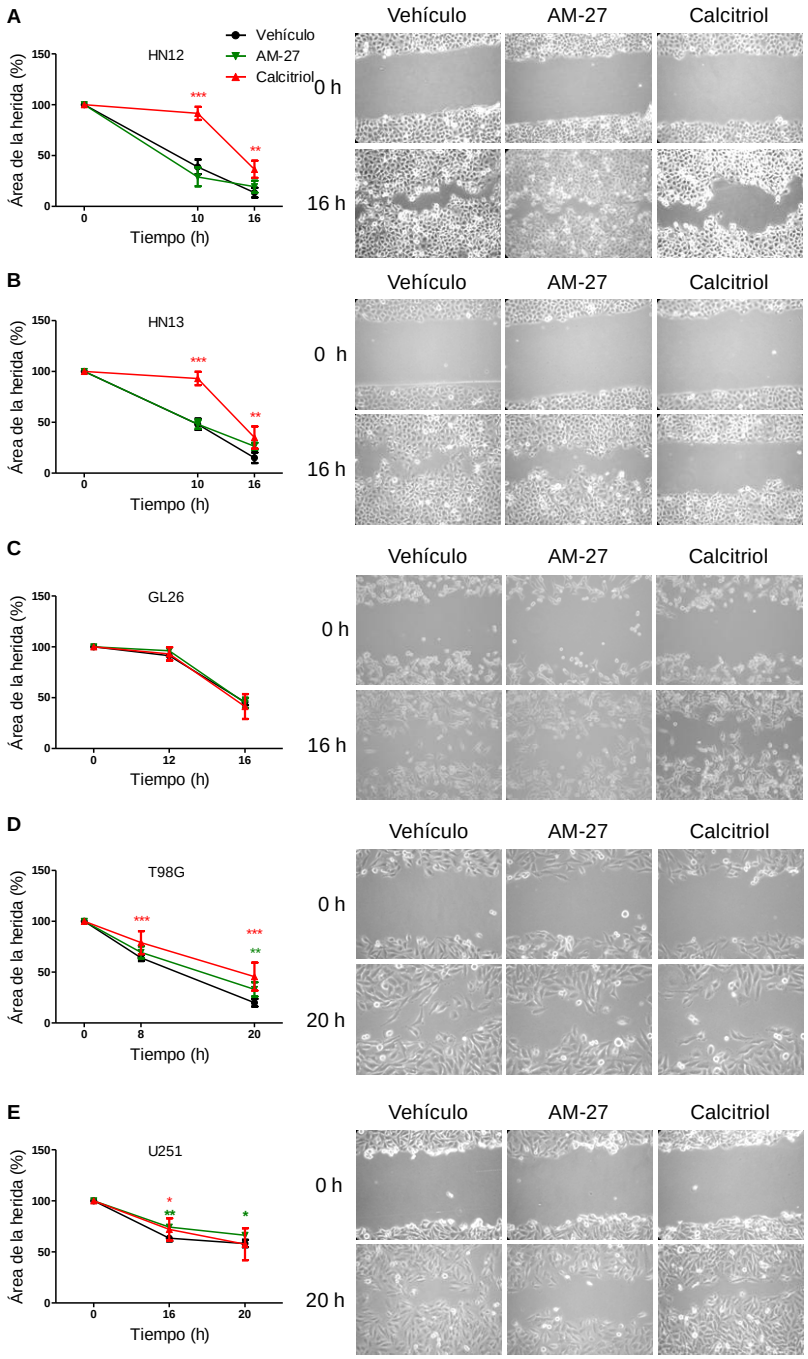


Figura 19. Estudio de la migración celular luego de la exposición de las distintas líneas celulares a AM-27 (verde). A. HN12, B. HN13, C. GL26, D. T98G, E. U251. Las células fueron expuestas a 100 nM de AM-27, calcitriol o vehículo por un tiempo no mayor al tiempo de duplicación de la línea correspondiente. Se representa el promedio de cuatro heridas ± SD. El ensayo fue repetido 3 veces para cada línea.Se realizó ANOVA (de dos vías) con posterior test de Bonferroni, *** p< 0,001;** p< 0,01;* p<0,05.

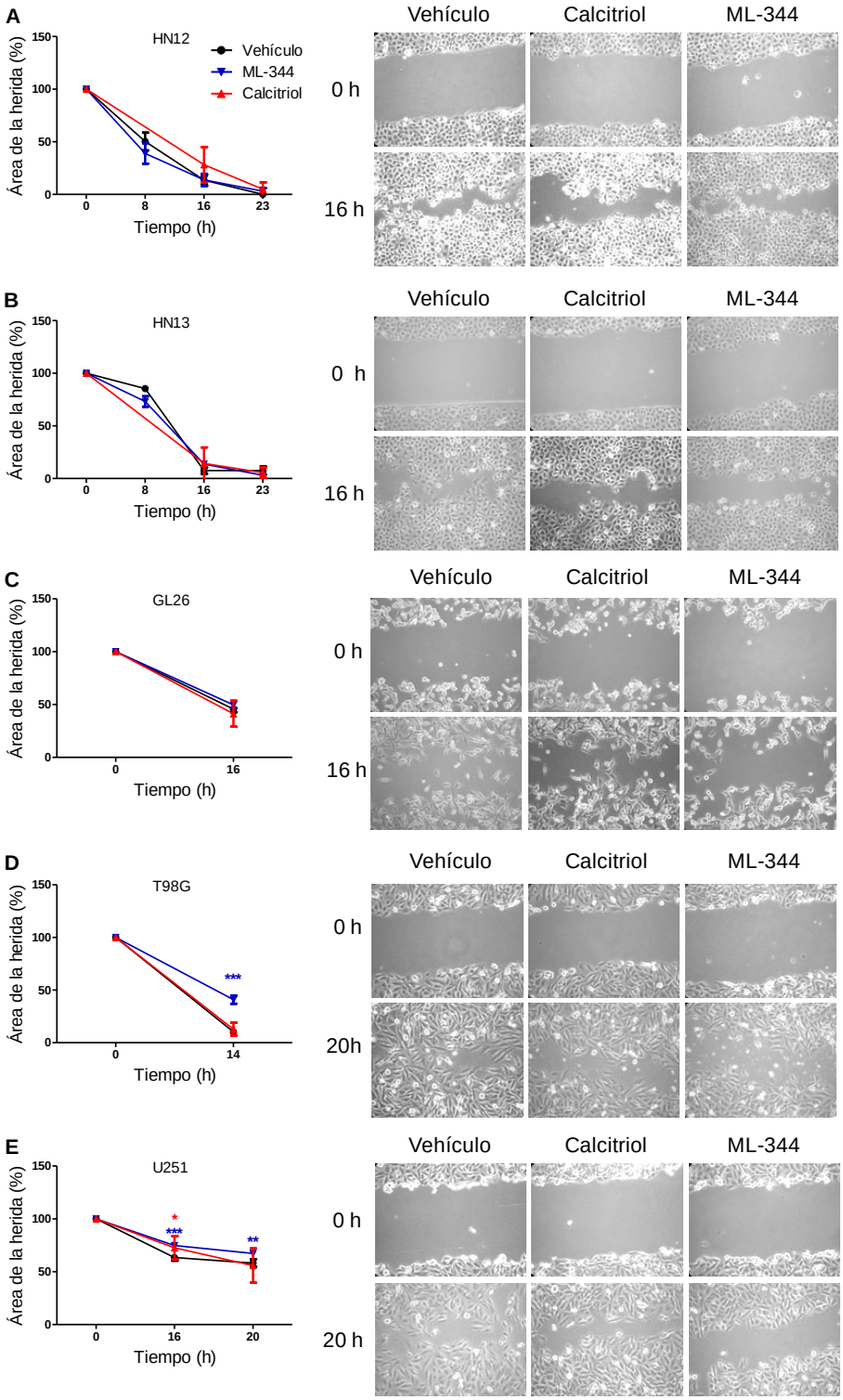


Figura 20. Estudio de la migración celular luego de la exposición de las distintas líneas celulares a ML-344 (azul).A. HN12, B. HN13, C. GL26, D. T98G, E. U251. Las células fueron expuestas a 100 nM de ML-344, calcitriol o vehículo por un tiempo no mayor al tiempo de duplicación de la línea correspondiente. Se representa el promedio de cuatro heridas ± SD. El ensayo fue repetido 3 veces para cada línea.Se realizó ANOVA (de dos vías) con posterior test de Bonferroni, *** p< 0,001;** p< 0,01;* p<0,05.

IV- Estudio de los mecanismos de acción subyacentes al efecto del análogo AM-27 sobre la viabilidad celular: análisis del ciclo celular y muerte celular.

El análogo AM-27 demostró disminuir la viabilidad de todas las líneas celulares estudiadas y carecer de efectos sobre células normales (astrocitos). Por otra parte, el ML-344 no tuvo efecto sobre las líneas de GBM humanas y sí redujo la viabilidad de las células normales. Por esta razón, se decidió continuar con los ensayos preclínicos de AM-27 en CCECC y GBM comenzando a analizar los mecanismos celulares que podían estar implicados en los efectos sobre la viabilidad celular. Para ello, y con el fin de verificar si el AM-27 afecta la progresión del ciclo celular, realizamos estudios de distribución de la población celular usando la tinción con ioduro de propidio con análisis por citometría de flujo. Como es conocido, resulta habitual encontrar desregulado el ciclo celular en células tumorales; por lo tanto, incluir compuestos que inhiban la progresión del ciclo es de suma importancia dentro de la estrategia del tratamiento oncológico (Singh, R.P., et al., 2002). Se eligió seguir trabajando con la línea celular de CCECC HN12 y con la de GBM GL26, dado que el laboratorio tiene puesto a punto modelos animales de CCECC y GBM con sendas líneas celulares. Como se muestra en la figura 21, el tratamiento de HN12 por 120 h, con una dosis de AM-27 100 nM produce una elevación muy significativa de la población celular en fase subG_0/G_1 con respecto al vehículo (65,97% ± 13,62% para AM-27 vs 2,9% ± 0,46% para las células tratadas con vehículo; $p < 0.001$). El gran incremento de la población celular en dicha fase se asocia a un detrimento de la población celular en el resto de las fases del ciclo, siendo muy significativo el descenso en G_0/G_1, con respecto al vehículo (20,20% vs 65,03%) (Tabla 10). Estos resultados sugieren que la disminución en la viabilidad celular originalmente observada luego del tratamiento con AM-27 podría deberse a un aumento de la muerte celular.

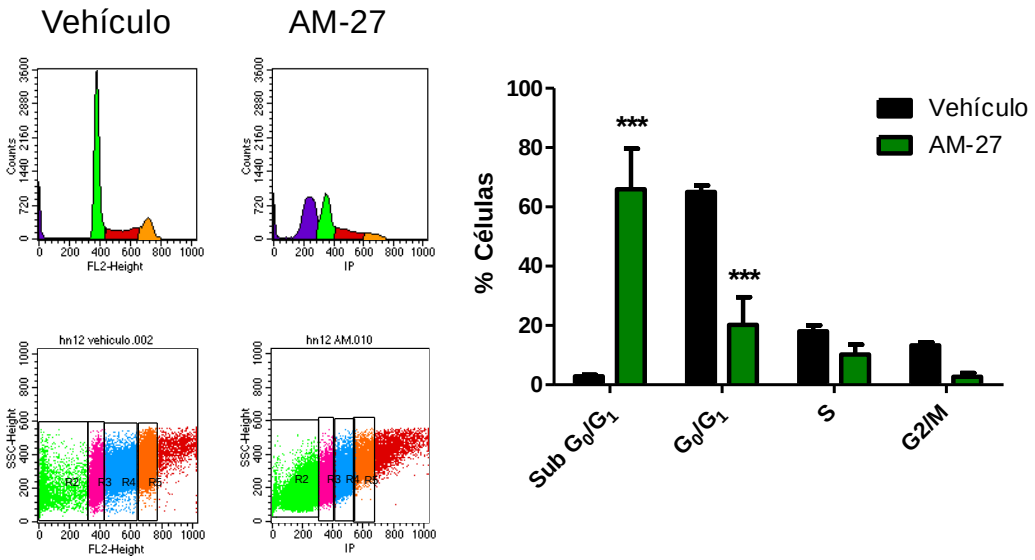


Figura 21. Análisis de ciclo celular luego del tratamiento de HN12 con AM-27. El histograma de ioduro de propidio (IP) muestra las diferentes fases del ciclo celular. El gráfico de la derecha muestra la cuantificación de las subpoblaciones de la línea celular HN12 luego del tratamiento con AM-27 o vehículo (100 nM; 120 h). El ensayo se realizó por triplicado. Los resultados se analizaron mediante ANOVA (de dos vías) con posterior test de Bonferroni *** p <0.001.

Población celular	% ± SD de células adquiridas	
	Vehículo	AM-27
Sub G_0/G_1	2.903 ± 0.46	65.97 ± 13.62
G_0/G_1	65.03 ± 2.15	20.20 ± 9.53
S	18.00 ± 2.06	10.17 ± 3.38
G_2/M	13.27 ± 1.00	2.737 ± 1.22

Tabla 10. Porcentaje (± SD) de células de la línea HN12 en cada fase del ciclo celular luego del tratamiento con AM-27 o vehículo (100 nM; 120 h).

Para comprobar si el incremento de la población celular en sub G_0/G_1 se debía a la inducción de apoptosis, se desarrolló el ensayo de TUNEL luego del tratamiento de la línea HN12 con el análogo o el vehículo (120 h, 100 nM). Como puede observarse en la figura 22, el tratamiento con AM-27 produjo un incremento de las células TUNEL positivas con respecto al control (10,75% ± 0.75% vs 2,017% ± 0.03%; p = 0,0005). Estos ensayos sugieren que AM-27 induce una disminución de la viabilidad celular de las células HN12 mediante la inducción de apoptosis.

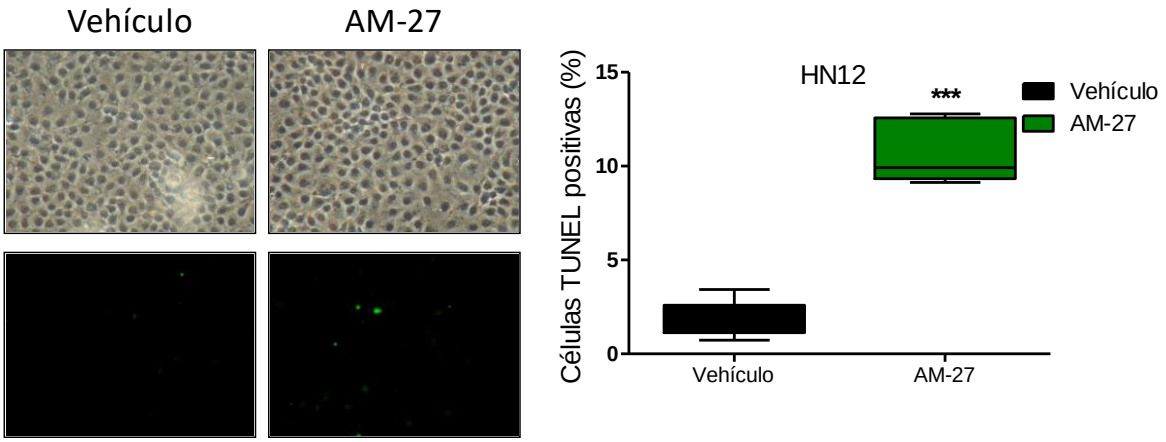


Figura 22. Análisis de TUNEL luego del tratamiento de HN12 con AM-27. El gráfico muestra el porcentaje de células HN12 TUNEL positivas. Las imágenes son fotomicrografías representativas de células de la línea HN12 tratadas con AM-27 o vehículo (100 nM; 120 h). Los datos se analizaron empleando test de student. *** p <0.001.

Asimismo, el tratamiento de la línea celular de glioblastoma GL26 por 120 h, con una dosis de 100 nM produjo una elevación significativa de la población celular en fase subG_0/G_1 (10,11% ± 1,70% vs 5,71 % ± 0,25%, $p < 0,05$) (figura 23). El incremento de la población celular en dicha fase se asocia a una disminución en la cantidad de células en el resto de las fases del ciclo, siendo significativo el descenso en G_0/G_1, con respecto al vehículo (37,39% ± 1,73% vs 42,96% ± 1,55%; $p< 0,01$) (tabla 11).

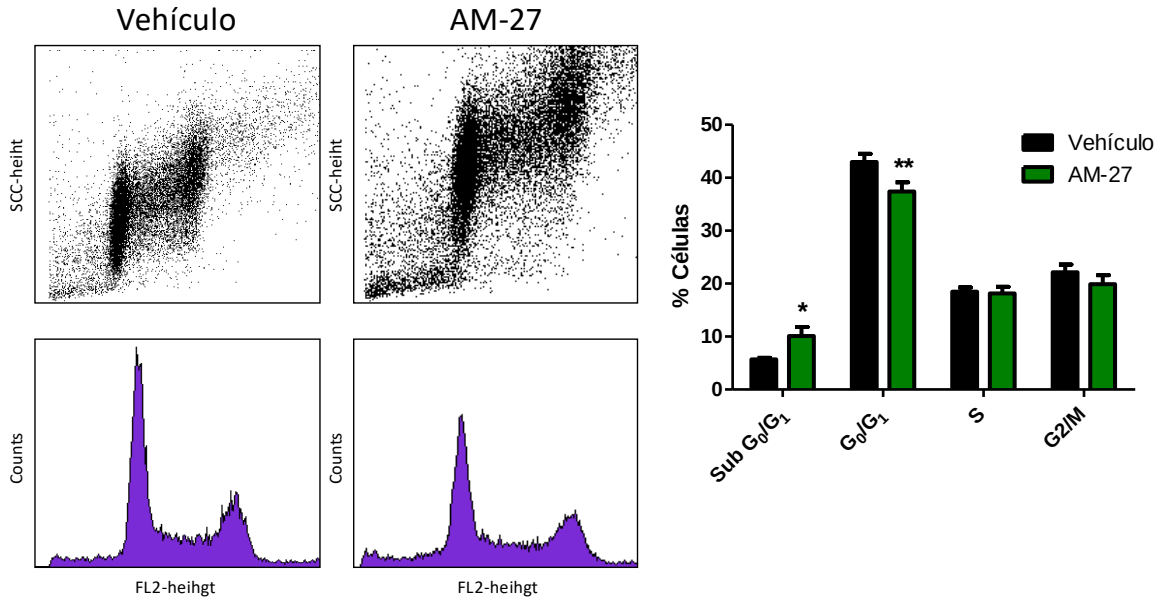


Figura 23. Análisis de ciclo celular luego del tratamiento de GL26 con AM-27. El histograma de ioduro de propidio (IP) muestra las diferentes fases del ciclo celular. Los resultados detallan la distribución de la población de la línea celular GL26, en las distintas etapas del ciclo, luego del

tratamiento con AM-27 o vehículo. El ensayo se realizó por triplicado. Los resultados se analizaron mediante ANOVA (de dos vías) con posterior test de Bonferroni *** p <0.001.

Población celular	% ± SD de Células adquiridas	
	Vehículo	AM-27
Sub G_0/G_1	5.706 ± 0.256	10.11 ± 1.705
G_0/G_1	42.96 ± 1.557	37.39 ± 1.737
S	18.48 ± 0.764	18.16 ± 1.238
G_2/M	22.13 ± 1.485	19.90 ± 1.709

Tabla 11. Porcentaje (± SD) de células de la línea GL26, en cada fase del ciclo celular, luego del tratamiento con AM-27 o vehículo (100 nM; 120 h).

Para comprobar si el incremento de la población celular en sub G_0/G_1 se debía a la inducción de apoptosis, se desarrolló el ensayo de TUNEL luego del tratamiento de la línea GL26 con el análogo o el vehículo (120 h, 100 nM). Como puede observarse en la figura 24, el tratamiento con AM-27 produjo un incremento de las células TUNEL positivas con respecto al control (7,352% ± 0,52% vs 3,26% ± 0,57%; p = 0,0041). Estos ensayos sugieren que AM-27 induce disminución de la viabilidad celular de GL26 mediante la inducción de apoptosis.

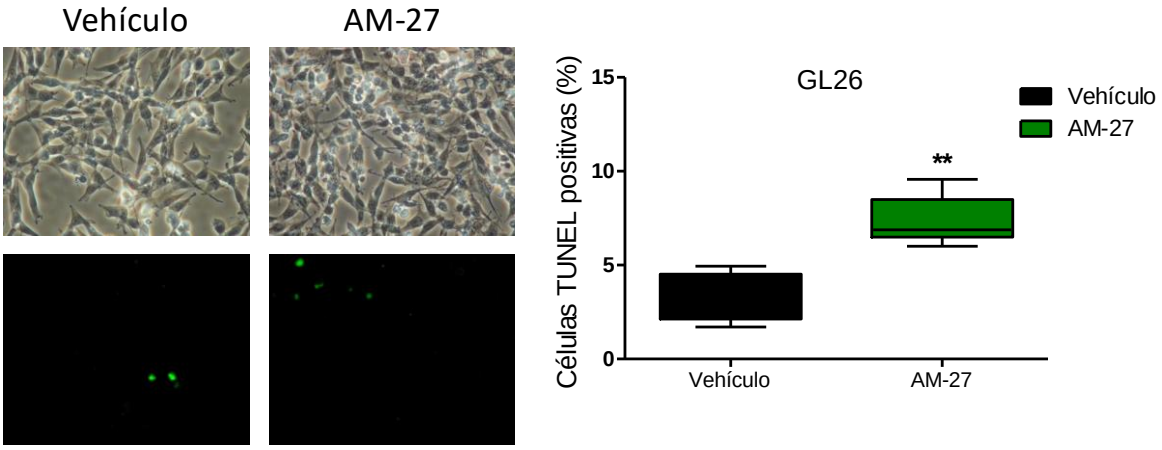


Figura 24. Análisis de TUNEL luego del tratamiento de GL26 con AM-27. El gráfico muestra el porcentaje de células GL26 TUNEL positivas. Las imágenes son fotomicrografías representativas de células de la línea GL26 tratadas con AM-27 o vehículo (100 nM; 120 h). Los datos se analizaron empleando test de student. ** *p*< 0,01.

V- Profundización de los mecanismos de acción subyacentes al efecto del análogo AM-27 sobre la muerte celular: análisis del potencial de membrana mitocondrial y liberación al medio de LDH

Continuamos procurando conocer más acerca del proceso de muerte que produce el análogo AM-27 en CCECC y en GBM. Para ello evaluamos si bajo el efecto del análogo se conserva o se pierde el potencial de membrana mitocondrial, que nos habla acerca de la permeabilidad mitocondrial. La alteración de esta última es uno de los dos mecanismos de activación de la via intrínseca de la apoptosis (Sola, S., et al., 2016). Los cultivos fueron incubados por 30 minutos, previo a la fijación, con la sonda fluorescente MitoTracker Red (0.1 lg/mL). Las mitocondrias marcadas con un color rojo brillante son las que conservan el potencial de membrana (Abrahan, C.E., et al., 2009). La figura 25, muestra que las células de la línea HN12 tratadas con el análogo pierden de manera significativa su potencial de membrana (AM-27: 22,29 UAF ± 1,24 UAF vs vehículo: 34,74 UAF ± 3,30 UAF), sugiriendo la activación por parte del AM-27 del proceso de apoptosis por la via intrínseca.

Una observación colateral que pudimos realizar al ver los cultivos microscópicamente y que llamó nuestra atención fue la formación de nanotubos (TNTs - *Tunneling nanotubes*) con mitocondrias marcadas por la sonda que aumentaban en los tratados con AM-27. Los nanotubos son, junto con las uniones gap, un sistema de comunicación, descripto en 2004 (Rustom, A., et al., 2004), que permite el intercambio de factores entre los citoplasmas de las células conectadas. Se componen de F-actina, pero no de microtúbulos. Estos nanotubos coordinan procesos biológicos como desarrollo, metabolismo, homeostasis y respuesta inmune y, a diferencia de las uniones gap, alcanzan largas distancias y pueden transportar pequeñas moléculas, vesículas y organelas tales como mitocondrias (Koyanagi, M., et al., 2005) (Gerdes, H.H., et al., 2007). También se ha publicado el intercambio entre células tumorales de glicoproteína P, un transportador ABC de la membrana mitocondrial que media la resistencia a fármacos (Levchenko, A., et al., 2005). El hecho de que células que no se están dividiendo intercambien mitocondrias a través de los mencionados nanotubos es importante porque se produce una transferencia de material genético entre ellas.

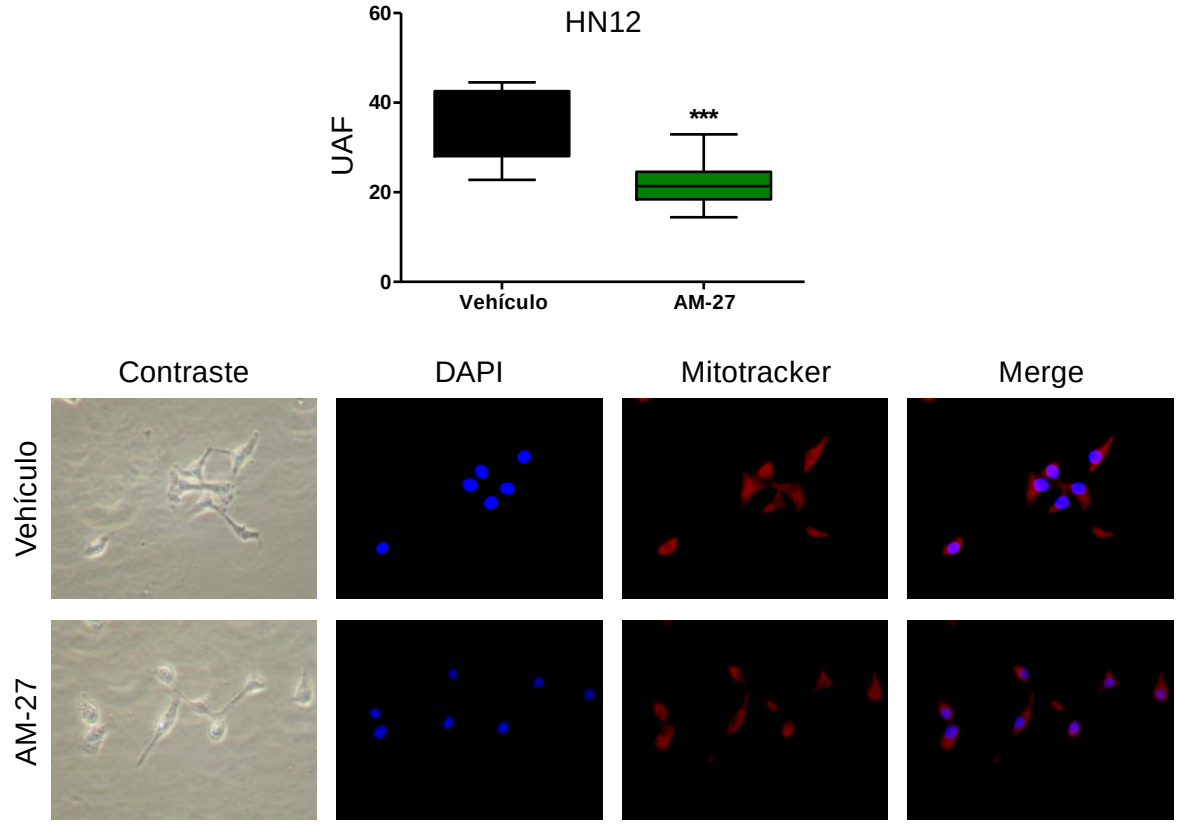


Figura 25. Evaluación del potencial de membrana mitocondrial luego del tratamiento de HN12 con AM-27. El gráfico muestra el descenso de las unidades arbitrarias de fluorescencia (medida con ImageJ) de la línea HN12 luego del tratamiento con la IC_{50} del análogo AM-27 o vehículo durante 6 h. Las imágenes son fotomicrografías representativas. Se aplicó el test de student. ***p = 0,0003.

De manera similar procedimos a evaluar el potencial de membrana mitocondrial de la línea de glioma GL26 luego del tratamiento con AM-27, esperando encontrar un comportamiento similar a la línea HN12 debido a los resultados que se venían observando. Efectivamente, el tratamiento de células GL26 con AM-27 produjo una disminución significativa en el potencial de membrana mitocondrial (AM-27: 27,86 UAF ± 1,84 UAF vs vehículo: 30,58 UAF ± 1,82 UAF) (figura 26).

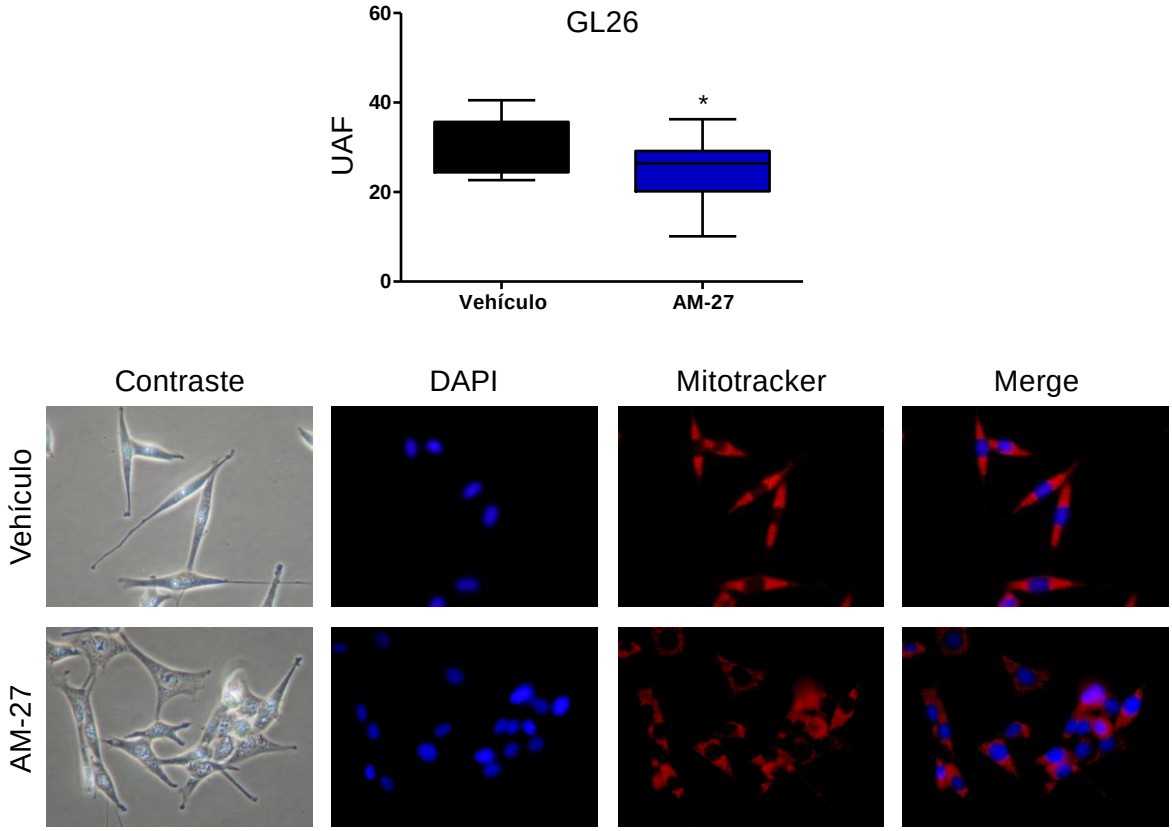


Figura 26. Evaluación del potencial de membrana mitocondrial luego del tratamiento de GL26 con AM-27. El gráfico muestra las unidades arbitrarias de fluorescencia (medida con ImageJ) de la línea GL26 luego del tratamiento con la IC_{50} del análogo AM-27 o vehículo durante 6 h. Las imágenes son microfotografías representativas. Se aplicó el test de student. *p = 0,0235.

Estos resultados demuestran que el análogo AM-27 produce un significativo aumento de la muerte celular en las líneas HN12 y GL26, que puede ser explicada, al menos en parte, por un aumento de la apoptosis, presumiblemente por la vía intrínseca.

Como parte de los estudios de los mecanismos de acción del análogo evaluamos sí, además, se produce un aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática, midiendo la liberación de la enzima LDH al medio de cultivo. La LDH es una enzima citosólica que es liberada al medio extracelular al producirse la ruptura de la membrana plasmática, la cual puede ocurrir como resultado de un proceso necrótico o en apoptosis tardías. La actividad de dicha enzima se mide espectrofotométricamente mediante el empleo del kit LDH-P UV AA (Wiener Lab.). En las condiciones experimentales detalladas, el análogo AM-27 indujo permeabilidad de la membrana plasmática en la línea de GBM GL26 (140,49 U/l ± 3,56 U/l vs 97,67 U/l ± 2,67 U/l; **p < 0.01); sin embargo, no se detectó efecto alguno sobre el parámetro medido para la línea de CCECC HN12 (116,07

U/l ± 4,77 U/l vs 123,63 U/l ± 13,49 U/l). Estos resultados se observan en la figura 27 y sugieren que en la línea GL26 el AM-27 podría inducir necrosis.

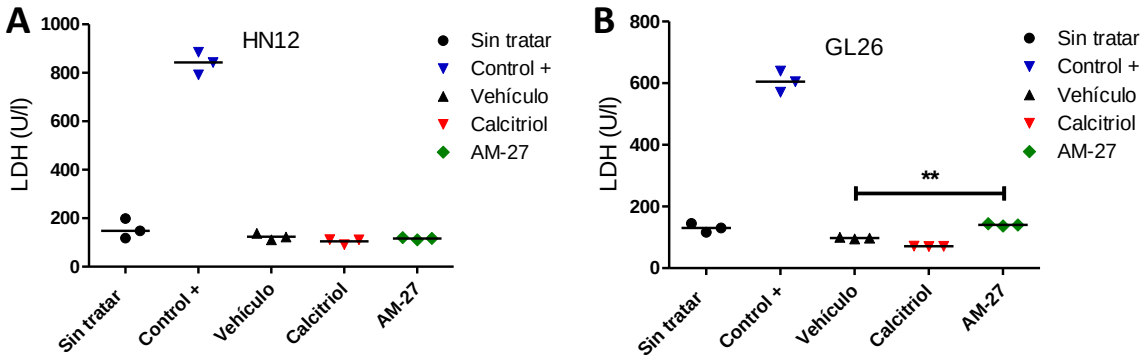


Figura 27. Permeabilidad de la membrana plasmática luego del tratamiento con AM-27. Evaluación de la liberación de LDH al medio de cultivode las líneas HN12 (A) y GL26 (B) luego del tratamiento con AM-27 (100 nM; 120 h). El ensayo se realizó por triplicado. Se aplicó ANOVA (de dos vías) con posterior test de Bonferroni, **p < 0,01.

VI- Actividad antitumoral del análogo AM-27 en un modelo murino de CCECC

Teniendo en cuenta la ausencia de efectos hipercalcemiantes del AM-27 así como también la reducción observada en la viabilidad luego del tratamiento de las líneas de CCECC HN12 y HN13 con AM-27, nos propusimos continuar los estudios en modelos animales de cáncer (objetivo 3). Para ello utilizamos un modelo de xenotransplante subcutáneo de HN12 en ratones inmunosuprimidos. Se inocularon subcutáneamente $7x10^6$ células pertenecientes a la línea HN12, se monitorearon los ratones periódicamente y cuando los tumores se volvieron palpables se comenzó con el tratamiento con el análogo AM-27 (50 µg/kg de peso, día por medio) o con vehículo. Se decidió emplear esta dosis elevada ya que en ensayos preliminares observamos que no se producían efectos tóxicos en los animales luego de la administración de la misma. Durante todo el período de tratamiento (18 días) se observó el estado general de los animales, se pesaron los ratones y se midieron *in vivo* los tumores con calibre digital. Al momento del sacrificio se les extrajo sangre del seno retroorbital para la medición de parámetros séricos, se pesaron los ratones, se extrajeron y pesaron los órganos de interés (riñón, hígado y bazo), se extrajeron los tumores y se tomaron las tres medidas de estos últimos.

El peso corporal entre los ratones del grupo control, tratados con el vehículo y aquellos pertenecientes al grupo tratado con el análogo no mostró diferencias significativas,

aunque se observó una tendencia a que los ratones tratados con AM-27 incrementen su peso (figura 28 A). El peso relativo de los órganos se determinó de acuerdo a la siguiente fórmula: peso relativo del órgano = peso del órgano/peso del animal x 100 (Cobbina, S.J., et al., 2015). No se encontraron diferencias significativas en los pesos relativos de los riñones, del hígado o del bazo (figura 28 E-G), confirmando su nula capacidad de generar toxicidad a tales órganos a la dosis y tiempos probados. Dentro de los parámetros séricos, observamos que tanto la calcemia como el hematocrito se mantuvieron dentro de los rangos normales (figura 28 B y C), confirmando la ausencia de toxicidad a mediano plazo. Cuando analizamos la enzima LDH en suero, indicadora de lesión celular o tisular, notamos que se mantuvo, también, dentro de los niveles esperados; incluso la media se ubicó por debajo de lo que indica la bibliografía para los valores de referencia en ratones nude machos: 464 UI (figura 28 D) [http://harlanisrael.com/nu.pdf].

Estos resultados corroboran y amplían (estos últimos provienen de tratamientos más prolongados) aquellos obtenidos en los ensayos de calcemia y toxicidad originales, llevados a cabo en los ratones CF1 (figura 16).

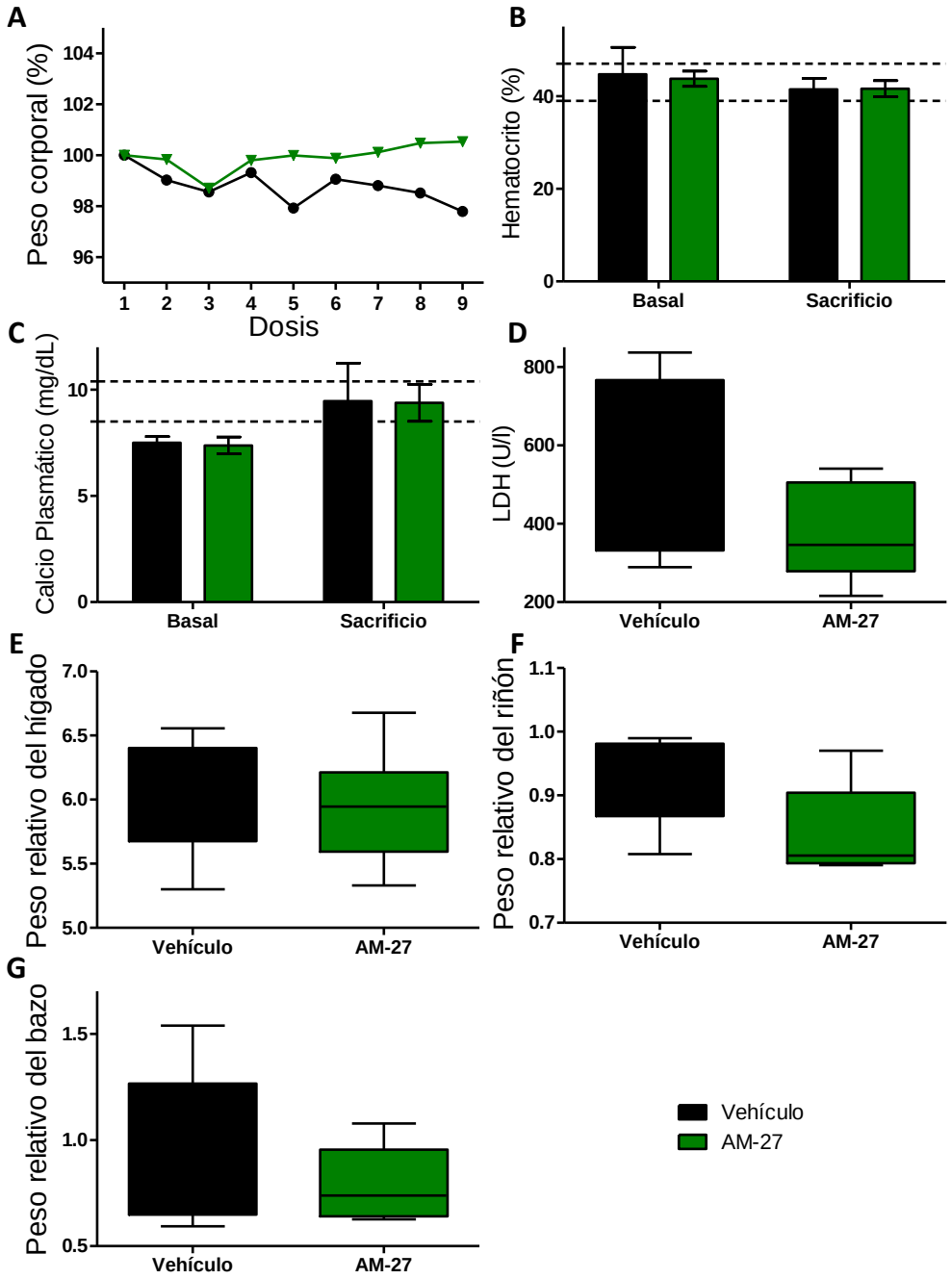


Figura 28. Modelo de xenotransplante subcutáneo de células HN12 en ratones nude (N=12). Evaluación del efecto del tratamiento con 50 µg/kg de AM-27 o vehículo sobre el peso corporal (A); sobre el Hematocrito, al comienzo y al final de la experiencia (B); sobre los niveles plasmáticos de calcio, al comienzo y al final del ensayo (C); sobre la actividad de LDH (D); y sobre el peso relativo de los órganos (*ex vivo*): Hígado (E), Riñones (F) y Bazo (G), donde pueden manifestarse los signos de toxicidad. Se realizó test de Student al análisis del hematocrito, de calcemia, de LDH y de los pesos relativos de los órganos. Se aplicó ANOVA (de dos vías) para la medición del peso en función del tiempo.

Del análisis de las dimensiones tumorales *in vivo*, se observó una tendencia mostrando que los ratones tratados con el análogo desarrollan un tumor de mayores dimensiones, aunque la diferencia no llegó a ser estadísticamente significativa (figura 29 A). Una vez sacrificados los ratones, se observó que el peso de los tumores y las dimensiones de éstos, *ex vivo*, no variaron significativamente entre el grupo tratado con el análogo y el grupo tratado con el vehículo (vehículo: 0,12 g ± 0,02 g vs AM-27: 0,13 g ± 0,03 g; vehículo: 27,80 mm^3 ± 8,94 mm^3 vs AM-27: 36,11 mm^3 ± 9,35 mm^3; figura 29 B y C, respectivamente).

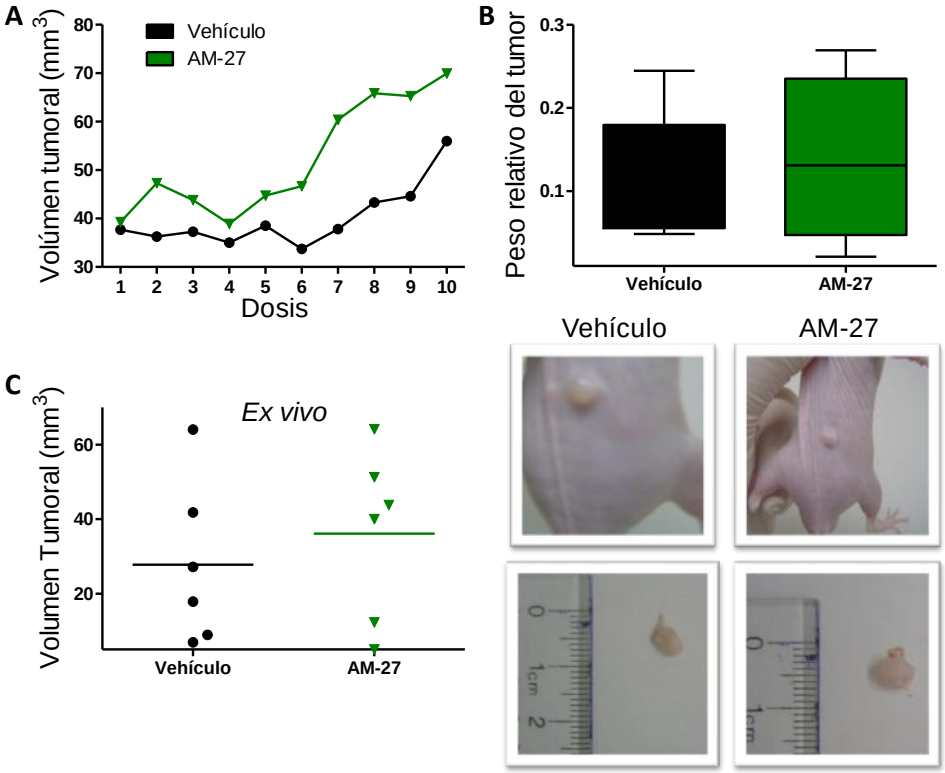


Figura 29. Modelo de xenotransplante subcutáneo de células HN12 en ratones *nude* (N=12). Evaluación del efecto del tratamiento con 50 µg/kg de AM-27 o vehículo sobre el volumen tumoral a lo largo del experimento (A); sobre el peso tumoral (B) y sobre el volumen tumoral (*ex vivo*) (C). En el gráfico se representa el promedio del volumen tumoral de cada grupo ± SD Se muestran fotografías de un tumor representativo para cada condición. Se realizó un test de Student a los análisis de peso y volumen tumoral. Se aplicó ANOVA (de dos vías) para el análisis del volumen tumoral en función del tiempo.

VII- Actividad antitumoral del análogo AM-27 en un modelo singeneico de células GL26 en ratones C57BL/6

A partir de los resultados obtenidos en los ensayos *in cultivo* que demuestran efectos antitumorales del análogo AM-27 en células provenientes de glioma (con ausencia de los mismos en astrocitos), decidimos proseguir con los ensayos preclínicos propuestos como parte del objetivo 3, evaluando los efectos antitumorales *in vivo* en un modelo singeneico de inoculación de células de la línea GL26 en ratones C57BL/6.

Se inocularon subcutáneamente $1x10^6$ células en el flanco derecho, se monitorearon los ratones periódicamente y cuando los tumores se volvieron palpables se comenzó con el tratamiento con el análogo AM-27 (50 ug/kg) o con vehículo, día por medio, durante 18 días. Se prosiguió de manera similar a lo descripto para el modelo de CCECC.

No se observaron diferencias significativas entre el peso corporal de los ratones tratados con el vehículo y el peso de los animales tratados con el análogo (figura 30 A). Dentro de los parámetros séricos, observamos que tanto el hematocrito (vehículo: 46,48 % ±1,57 % vs. AM-27: 45,25 % ± 1,72 %) (figura 30 B) como la calcemia (vehículo: 5,95 mg/dL ± 0,37 mg/dL vs. AM-27:6,23 mg/dL ± 0,52 mg/dL) (figura 30 C) se mantuvieron dentro del rango normal. Cuando analizamos la actividad de la LDH (figura 30 D) en suero, notamos que se mantiene, también, dentro de los niveles esperados para ambos grupos experimentales (vehículo = 496,1U/l ± 44,10 U/l; AM-27 = 474,2 U/l ± 46,70 U/l).No se encontraron diferencias significativas en los pesos relativos de los riñones, del hígado ni del bazo (figura 30 E-G) confirmando la ausencia de toxicidad a tales órganos a las dosis y tiempos ensayados.

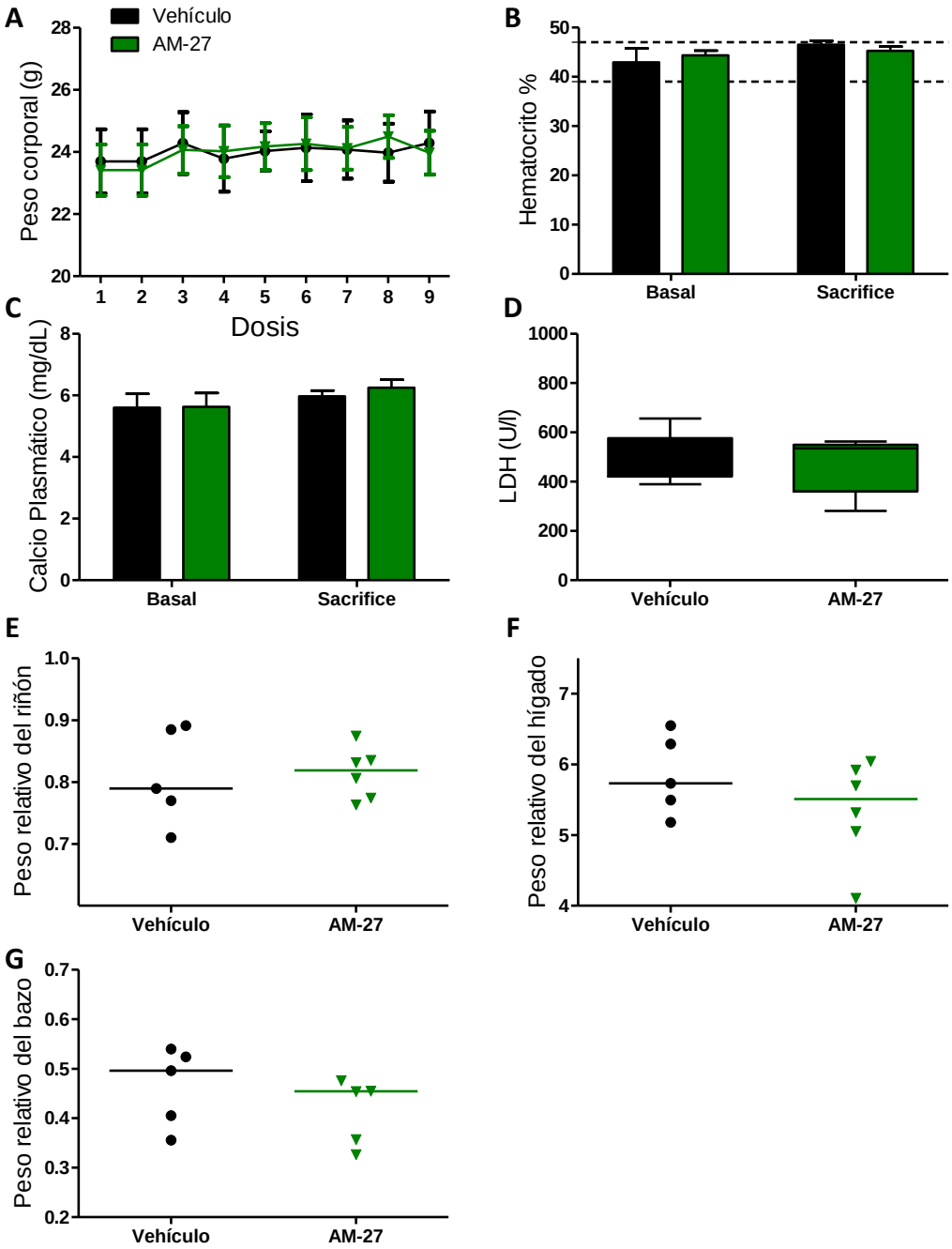


Figura 30. Modelo subcutáneo singeneico de células GL26 en ratones C57BL/6 (N = 11). Evaluación del efecto del tratamiento con 50 µg/kg de AM-27 o vehículo sobre el peso corporal a lo largo de la experiencia (A); sobre el hematocrito, al comienzo y al final de la experiencia (B); sobre los niveles plasmáticos de calcio, al comienzo y al final del ensayo (C);sobre la actividad de LDH (D); sobre el peso relativo de los órganos: riñón (E), hígado (F) y bazo (G), donde pueden manifestarse los signos de toxicidad. Se realizó test de Student al análisis del hematocrito, de calcemia, de LDH y de los pesos relativos de los órganos. Se aplicó ANOVA (de dos vías) para la medición del peso en función del tiempo.

Con respecto a la carga tumoral, no se produjeron diferencias significativas entre la carga tumoral de los animales tratados con vehículo y la carga tumoral de los ratones tratados con AM-27, ya sea que se estudie el peso tumoral (figura 31 A), el volumen tumoral *in vivo* (figura 31 B) o el volumen tumoral ex vivo (figura 31 C).

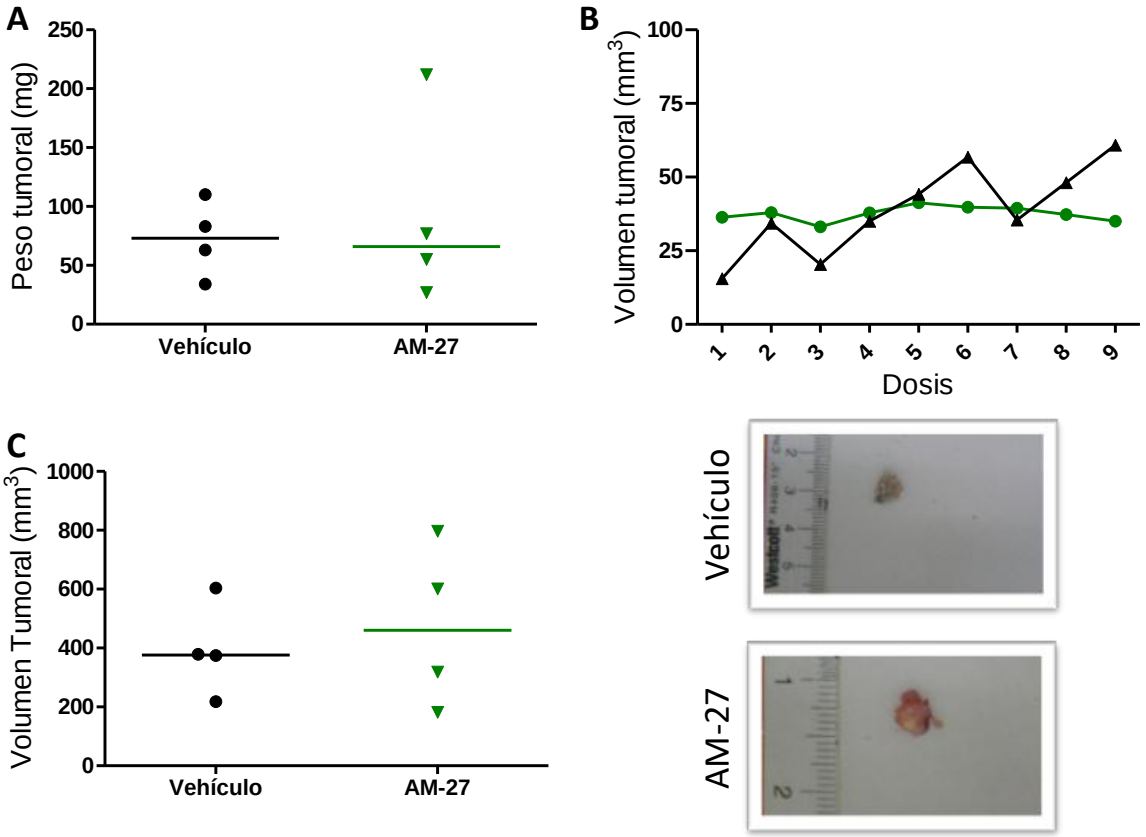


Figura 31. Modelo subcutáneo singeneico de células GL26 en ratones C57BL/6 (N = 8). Determinación del peso tumoral (A); del volumen tumoral *in vivo* en mm^3 (B); y del volumen tumoral *ex vivo* (C). Se muestran fotografías de un tumor representativo para cada condición. Se realizó un test de Student a los análisis de peso y volumen tumoral. Se aplicó ANOVA (de dos vías) para el análisis del volumen tumoral en función del tiempo.

VIII- <u>Estudios computacionales del nuevo análogo AM-27</u>

Los efectos genómicos del calcitriol se llevan a cabo a través de la unión de este al receptor de la vitamina D (VDR), el cual se halla en, al menos, 30 tejidos (Bendik, I., et al., 2014). El calcitriol circula en sangre unido a una α-globulina (VDBP – proteína de unión a vitamina D), ingresa a las células blanco y se une al VDR presente en el citosol. Este receptor está conformado por 427 aminoácidos y contiene dos regiones funcionales principales: el dominio de unión a ligando (LBD) y la región de unión al ADN. En la región

LBD se une el calcitriol, ejerciendo un cambio conformacional de la hélice H12 de este dominio, con la consecuente activación del receptor. Esta modulación alostérica promueve la activación funcional del dominio AF-2 (función de activación 2), que media la unión de co-moduladores transcripcionales. Este complejo calcitriol-VDR heterodimeriza con cualquiera de las tres isoformas de RXR (receptor X retinoide) y trasloca al núcleo. Por último, este heterodímero se une a secuencias específicas en las regiones promotoras de los genes diana regulando así la expresión de más de 900 genes (Carlberg, C., et al., 2012) (Guessous, I., 2015) (Campbell, F.C., et al., 2010).

Estos eventos en la activación del VDR permiten explicar, al menos en parte, el hecho de que los diferentes análogos del calcitriol presenten diferentes propiedades antitumorales y/o hipercalcemiantes entre ellos y con la hormona natural. Por ejemplo, un análogo podría poseer una capacidad mayor que el calcitriol de inducir dimerización con el RXR o podria reclutar más fuertemente proteínas co-reguladoras. Un enfoque que pretende dilucidar estas diferencias es aplicar tecnicas computacionales que permitan analizar las interacciones entre un análogo determinado y el VDR. Con el fin de continuar con los estudios de los probables mecanismos de acción de los análogos bajo estudio (objetivo 4), se aplicaron técnicas computacionales (acoplamiento molecular, dinámica molecular –MD- y la energía libre de los análisis de unión) para analizar comparativamente la unión de calcitriol y AM-27 a VDR, analizando su comportamiento farmacodinámico y la capacidad de provocar la modulación alostérica necesaria para la bioactividad.

Los estudios computacionales se desarrollaron utilizando como referencia la estructura cristalográfica del complejo calcitriol-VDR (Rochel, N., et al., 2000) (PDB code: 1DB1). El software Marvin se empleó para dibujar, visualizar y caracterizar las estructuras de calcitriol y AM-27 (MarvinSketch v.16.2.15.0, 2016). Los análisis estructurales y energéticos se llevaron a cabo con el software Gaussian03 (Frisch, M.J., et al., 2003) con el fin de obtener la conformación de energía mínima mediante la aplicación de métodos semiempíricos (AM1) y ab initio (HF/6-311+G*).

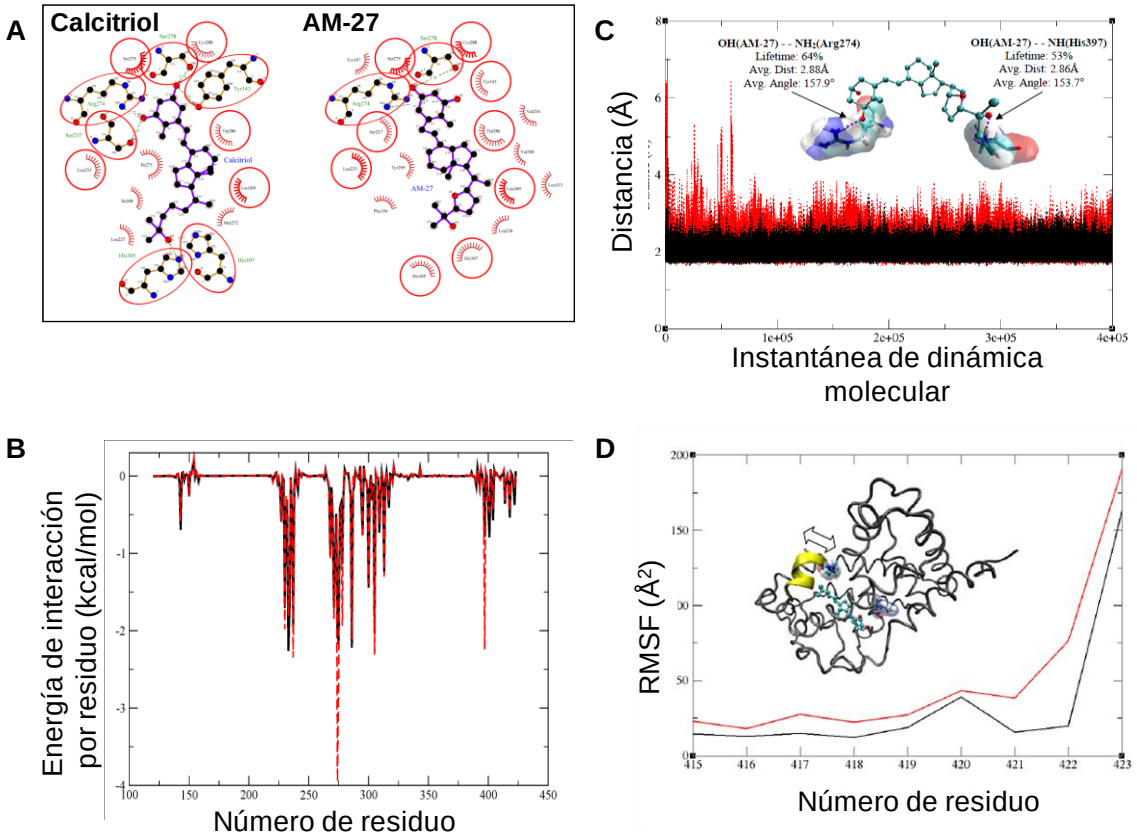


Figura 32. Cálculos computacionales A) Docking molecular. Posicionamiento sobre VDR del calcitriol y de AM-27. B) Componentes energéticos calculados para la interacción intermolecular entre calcitriol y AM- 27 con VDR por medio de simulaciones DM de disolvente explícitas. C) Huellas digitales de la interacción intermolecular por resíduo decalcitriol (negro) y de AM-27 (rojo). D) RMSF vs tiempo.

La figura 32 A muestra las interacciones intermoleculares entre VDR con calcitriol y AM-27. Se desprende de la imagen que AM-27 es capaz de unirse al sitio de unión a ligando (LBD) de VDR, estableciendo la mayoría de las interacciones intermoleculares observadas con el calcitriol. Con el objetivo de analizar el espacio disponible para el calcitriol y el análogo AM-27, se enumeraron los confórmeros hallados estableciendo una energía barrera. Se halló que ambas conformaciones bioactivas estuvieron presentes con una energía barrera de 10 kcal/mol, encontrando 71 confórmeros para el calcitriol y 49 para AM-27. Esta observación evidencia que AM-27 es capaz de establecer las interacciones intermoleculares necesarias con VDR dentro de un espacio conformacional restringido.

Componente	Calcitriol	AM-27
Van der Waals	-63.5	-64.8
Electrostática	-27.2	-39.2
Gas	-90.8	-104.1
Solvatación polar	25.6	30.3
Solvatación no polar	-8.4	-8.7
Total	-73.5	-82.5

Tabla 12. Componentes energéticos calculados para la interacción intermolecular entre calcitriol y AM-27 con VDR por simulaciones de MD.

Desarrollamos simulaciones de dinámica molecular de disolvente explícito para continuar estudiando el comportamiento farmacodinámico de AM-27. A partir de estos estudios se llevaron a cabo análisis estructurales y energéticos para el calcitriol y para AM-27. En la tabla 12 se ve que el AM-27 posee una energía de interacción total mayor en comparación a la del calcitriol (-82,5 y -73,5 kcal/mol, respectivemente), característica que se origina del fortalecimiento de las interacciones electrostáticas de AM-27 con VDR comparado con el calcitriol. Del análisis de la energía de interacción por resíduo (figura 32 B) se determina que esta interacción electrostatica superior se origina de los contactos intermoleculares con Arg274 y His397. Sin embargo, tanto el calcitriol como AM-27 establecen interacciones intermoleculares con esos aminoácidos como lo demuestran los estudios de acoplamiento molecular (MD) (figura 32 A); por lo tanto, la interacción fortalecida para AM-27 deriva de una conformación más favorecida y sostenida que para la hormona nativa. Para analizar este efecto, se controlaron las interacciones de enlaces de hidrógeno entre los dos ligandos y Arg274 y His397. Como puede verse en la figura 32 C, AM- 27 fue capaz de establecer interacciones de enlaces de hidrógeno estables con Arg274 y His397, con tiempos de vida media entre 50 y 60% durante toda la trayectoria de DM. Cuando se analizaron simulaciones de DM obtenidos para calcitriol, las interacciones de enlace de hidrógeno fueron muy transitorias a lo largo de las simulaciones, con un tiempo de vida media de 11% y 10% para los grupos hidroxilo primarios y secundarios, respectivamente. Estos análisis demuestran que la mayor afinidad por VDR calculada para AM-27 se origina principalmente en las interacciones eficientes de enlace de hidrógeno establecidas con Arg274 y His397, característica que es impulsada por la restricción conformacional de los cinco miembros de anillo presente en AM-27. La

eficiencia de la interacción del ligando unido a VDR con His397 parece ser determinante para la interacción estable con Arg274.

Finalmente, para evaluar el efecto de AM-27 en el mantenimiento de la conformación estructural de la hélice H12 del LBD observada para el ligando natural, se calculó la RMSF (root mean square fluctuation) vs el tiempo para este bucle. Como puede verse en la figura 32 D, AM-27 mantiene la conformación estructural de H12. La misma posee un papel significativo en la formación de una conformación activa de VDR (Kato, A., et al., 2016). La unión específica del ligando induce el plegamiento de la H12 del VDR generando la activación de AF-2 lo que proporciona la plataforma para el reclutamiento de los coactivadores. En este sentido, ya había sido demostrada la importancia que tiene la cadena lateral alifática de los análogos del calcitriol para el reposicionamiento de la H12 y el control de la actividad de VDR (Mizwicki, M.T., et al., 2010) (Yamamoto, K., et al., 2014) (Lee, K.Y, et al., 2016).

Discusión y Conclusiones

"Es mejor debatir una cuestión sin llegar a concluirla,
que llegar a una conclusión sin debatirla"
Joseph Joubert

Los cánceres de la cavidad oral presentan una tasa de supervivencia global a 5 años del 48%, no habiendo mejorado en los últimos años a pesar de los nuevos regímenes de tratamiento (Guntinas-Lichius O., et al., 2010). Por su parte, el glioblastoma es el tumor primario del sistema nervioso central más frecuente y más agresivo, siendo la sobrevida media de entre 12 a 15 meses luego del diagnóstico (Undabeitia, J., et al., 2016). El tratamiento de primera línea del GBM consiste en la extirpación quirúrgica máxima posible de la lesión, seguida de quimioterapia con temozolomida y de radioterapia (Wen, P.Y., & Kesari, S., 2008). Sin embargo, la recurrencia local se produce con elevada frecuencia (Ellison, D., et al., 2013).

Por ello es importante la búsqueda de terapias novedosas o alternativas, las cuales pueden incluir principios activos naturales o drogas sintéticas, o la combinación de estrategias terapéuticas (Moreno Ayal, M.A., & Candolfi, M., 2014), que permitan tratar con mayor eficiencia estos tumores.

En relación a la búsqueda de potenciales drogas sintéticas, nuestro grupo de trabajo ha diseñado análogos del calcitriol entre los que se encuentran el AM-27 y el ML-344 que poseen en la cadena lateral un grupo oxolano y un grupo amida, respectivamente. En esta parte del trabajo de tesis evaluamos la potencialidad terapéutica de estos análogos en GBM y CCECC. En relación a la calcemia y los efectos tóxicos se observó, alentadoramente, que ninguno de los dos análogos incrementa el calcio plasmático, modifica el hematocrito o produce daño a los órganos más comúnmente afectados con compuestos tóxicos a las dosis (5 µg/kg) y tiempos (96 h) estudiados. Con el análogo AM-27 se llevaron a cabo estudios de toxicidad adicionales ya que se obtuvieron resultados promisorios en los ensayos en cultivo. En estos estudios adicionales se extendió el tiempo de evaluación (hasta 18 días, toxicidad subaguda), se estudiaron dosis 10 veces mayores y se utilizaron otras dos cepas de ratones. En estas condiciones tampoco se observó toxicidad o hipercalcemia, sugiriendo la posibilidad que el AM-27 pueda ser administrado a pacientes en grandes dosis sin efectos tóxicos.

El AM-27 fue efectivo, con diferente potencia, en la reducción de la viabilidad de todas las líneas tumorales ensayadas (HN12, HN13, GL26, T98G Y U251) mientras que no tuvo efecto sobre los astrocitos, que son la contraparte normal de las células de GBM. La diferencia en la respuesta al análogo de las células malignas y su contraparte no maligna es deseable a la hora de seleccionar un compuesto con buenas posibilidades terapéuticas. Específicamente en las terapias de los GBM, el hecho que el potencial compuesto antitumoral no dañe a los tejidos normales es una característica beneficiosa,

dado que las actuales terapias radiantes disponibles en este tipo de tumores tienen como desventaja el hecho de dañar considerablemente los tejidos cerebrales aledaños al tumor. Por otro lado, la quimioterapia adicional tiene un efecto modesto en gliomas debido a que la llegada de los compuestos es limitada por la presencia de la barrera hemato-encefálica (Sul, J., & Fine, H.A., 2010). La comparación de los efectos del análogo AM-27 con el calcitriol muestra que, a pesar de ser este último más potente en las líneas que respondieron (en general las IC_{50} fueron menores que las de AM-27), no tuvo efecto en una de las líneas de GBM a la vez que sí tuvo efecto sobre las células normales. Esto, sumado al hecho que *in vivo* ocasiona hipercalcemia a la misma dosis que el AM-27 no lo hace, demuestra una ventana terapéutica que puede ser explotada. Por su parte, el análogo con el sustituyente amida en su cadena lateral (ML-344) no fue tan efectivo, mostrando disminución de la viabilidad solamente en la línea de CCECC HN12 y en la línea murina de GBM GL26. Además tuvo efecto sobre la viabilidad de los astrocitos. Se ha documentado, con anterioridad, la síntesis de análogos del calcitriol que presentan en su cadena lateral un grupo amida. Se observó que, aunque los análogos no cuenten con el OH en el C25 terminal, si poseen el nitrógeno del grupo amida en la posición C24, consiguen inhibir la proliferación celular de queratinocitos de manera similar a como lo hace el calcitriol. Sin embargo, se advirtió que cuando el nitrógeno no se encuentra en la posición C24, como por ejemplo en ML-344 que lo tiene en C26, la actividad antiproliferativa es menor a la del calcitriol (Sinishtaj, S., et al., 2006). Por esto, podríamos inferir que la razón por la cual el análogo ML-344 resultó ser poco efectivo en los ensayos de proliferación in vitro se debería a que el átomo de nitrógeno del grupo amida en ML-344 se halla en el C26; sin embargo, resta analizar los efectos electrónicos y estéricos que afectan al grupo amida por parte del grupo carboxilo terminal de su cadena lateral.

Las muertes por cáncer se deben, en un 90%, a la capacidad del tumor primario de metastatizar. Por lo tanto, migrar y colonizar otras regiones, lejos del tumor primario, es una característica que necesariamente debe controlarse en la terapia antitumoral. Como se describió, el calcitriol tiene la capacidad de inhibir el proceso metastásico. Por lo tanto, es fundamental analizar si los análogos bajo estudio inhiben esta capacidad adquirida por las células tumorales. Es por eso que nuestros siguientes estudios consistieron en analizar la capacidad de los análogos de inhibir *in cultivo* la migración celular, la cual es una de las capacidades de la célula necesaria para poder invadir tejidos. Pudimos observar que ambos análogos retardaron la migración de las líneas humanas de glioblastoma T98G y U251. Sería interesante, a futuro, analizar si estos análogos generan

alguna reorganización de las fibras de actina y evaluar si se activan las proteínas de la familia de Rho GTPasa, involucradas en la reorganización de estos filamentos (Rac1, Cdc42 y RhoA) (Nobes, C.D.,& Hall, A., 1995), vía sobreactivada en gliomas (Jansen, M., et al., 2010) (Fortin Ensign, S.P., et al., 2013) y modulada por calcitriol (Ordóñez-Morán, P., et al., 2008).

Además de estudiar los efectos de los análogos sobre algunos de los procesos desregulados en cáncer (viabilidad y migración celular, en nuestro caso), es importante conocer los mecanismos celulares y moleculares a través de los cuales actúan estos compuestos. Tal como describiéramos en la Introducción, el calcitriol puede reducir la viabilidad celular interfiriendo con la progresión del ciclo celular (generando un arresto del ciclo en la fase G_0/G_1) o induciendo apoptosis (Picotto, G., et al., 2012) (Feldman, D., et al., 2014). Es por ello que comenzamos a analizar los mecanismos de acción del AM-27 y, para esto, elegimos trabajar con dos de las líneas celulares (una de cada tipo de cáncer estudiado) con las cuales se podían desarrollar modelos animales de cáncer. Por otra parte se decidió no continuar investigando los mecanismos de acción del ML-344 debido a su baja efectividad para reducir la viabilidad celular y al hecho que afecta a las células normales.

Los estudios demostraron que AM-27 produce un significativo incremento de la fase subG_0/G_1 en la línea de CCECC HN12, sugiriendo que actúa sobre mecanismos de muerte celular. El posterior análisis de los mecanismos celulares dio como resultado que el tratamiento con AM-27 induce apoptosis y que la activación de este proceso se daría a través de la vía mitocondrial o vía intrínseca. Realizamos la misma secuencia de experiencias para la línea de glioma GL26. De la misma manera que para la línea HN12, el AM-27 hizo aumentar la fase sub G_0/G_1 y la cantidad de células TUNEL positivas, sugiriendo que la línea de glioma también responde al AM-27 con inducción de apoptosis. Sin embargo, a diferencia de lo observado en HN12, se alteró la permeabilidad de la membrana plasmática celular. Estos resultados sugieren que a los tiempos de tratamiento utilizados para hacer el análisis de permeabilidad de la MP se observa apoptosis tardía o bien que el proceso de muerte celular inducido por AM-27 en GL26 podría llevarse a cabo por necrosis. Hay algunos trabajos en la bibliografía que demuestran que el calcitriol induce necrosis. Por ejemplo, en uno de ellos se demostró que este compuesto administrado a ratones de un modelo de cáncer de mama indujo necrosis en los tejidos tumorales (García-Quiroz, J., et al., 2014). Es posible que el calcitriol o sus análogos induzcan necrosis al inducir la liberación y promover la movilización de ácido araquidónico

por activación de fosfolipasa A_2 (de Boland, A.R., & Boland, R.L., 1993) (Toniato, E., et al., 2015), lo cual podria afectar la fluidez y permeabilidad de la membrana celular (Agudelo, M.E.R., & López, M.R., 2012). Por otro lado, es reconocido que el proceso necrótico es un *hallmark* de los GBM, de manera que la célula de glioma es propensa a morir por necrosis, aunque las razones que esto sea así no se han dilucidado completamente (Ahn, S.H., et al., 2016) (Stegh, A.H., et al., 2008).

Estos resultados *in cultivo* nos impulsaron a seguir los ensayos preclínicos analizando la capacidad del AM-27 de reducir el crecimiento de tumores establecidos. Lamentablemente, no se pudo demostrar que el análogo bajo estudio produjera reducción del tamaño o volumen tumoral del modelo de CCECC o del modelo de GBM. Estas discrepancias entre lo observado *in vivo* e *in cultivo* es habitual (Brüggemann, W., et al., 2010) (Eisman, J.A., et al., 1987). Una explicación para esta observación podría deberse a que el medio extracelular circundante *in vivo* ejerce efectos moduladores de las vías y/o mecanismos involucrados en el mecanismo de acción de AM-27. Dado que el modelo de GBM utilizado involucra el implante de células de glioma en el tejido subcutáneo en el flanco del animal y, conociendo la importancia del estroma circundante para el desarrollo de tumores, procuraremos desarrollar, en un futuro próximo, un modelo intracraneal de glioma para reproducir más fehacientemente la enfermedad humana. Es importante destacar que dado que los compuestos de vitamina D atraviesan sin problema la barrera hemato-encefálica, esta sería una ventaja del análogo AM-27 sobre otros potenciales agentes terapéuticos para los gliomas. Por otro lado, la respuesta diferencial de los astrocitos normales y las líneas de glioma al AM-27 señala la posibilidad de obtener buenos resultados en futuros ensayos pre-clínicos con este análogo.

Por último, con el objeto de analizar la interacción del análogo con el receptor VDR, demostramos, junto con Mario Alfredo Quevedo (Unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica (UNITEFA), CONICET y Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba) que el AM-27 es capaz de interaccionar con el mencionado receptor. Mediante los estudios computacionales observamos que AM-27 se une al sitio de unión a ligando de VDR, estableciendo la mayoría de las interacciones intermoleculares que establece el calcitriol (hecho esperable ya que se trata de un análogo de él); sin embargo, la energía de interacción que establece el análogo es mayor a la del calcitriol debido al fortalecimiento de las interacciones electrostáticas en los contactos Arg274 e His397, que se deriva de una conformación más favorecida y sostenida para el análogo. Las acciones diferenciales observadas entre

los diferentes análogos del calcitriol, y entre estos con el calcitriol, podrían deberse a un reclutamiento selectivo, dirigido por el ligando, de coactivadores transcripcionales. El reclutamiento diferencial de los coactivadores es dependiente del contexto celular y del promotor del gen que regula y esto podria explicar la respuesta diversa del calcitriol y sus análogos (Issa, L.L., et al., 2002). Los ligandos (análogos) pueden exponer u ocultar un residuo de aminoácido que puede ser incluido o excluido de la interfaz funcional y de esta manera mejorar o disminuir la unión de coactivadores (de la familia de p160 o de la familia DRIP/TRAP) al receptor o modificar la preferencia del sitio de unión para coactivadores (Gardezi, S.A., et al., 2001). El análogo AM-27 conserva el 25-OH que es esencial para el enlace con el aminoácido Histidina 305 del VDR (Gardezi, S.A., et al., 2001). Por otra parte, el AM-27 conserva los grupos metilos de los C26 y C27 del calcitriol, los cuales establecen contactos de van der Waals con Valina 418 y Fenilalanina 422 de la hélice H12, la cual es reconfigurada después de la activación del ligando y es un importante punto de contacto para SRC-1 (Issa, L.L., et al., 2002). Además, los ensayos computacionales nos mostraron que el análogo AM-27 establece enlaces fuertes con dos aminoácidos fundamentales del receptor de la vitamina D, Arginina 274 e Histidina 397. Hay trabajos que demuestran la importancia de la interacción del ligando con la Arginina 274. Por ejemplo, en uno de ellos se observó que la mutación de Arg274 deriva en la pérdida del puente de hidrógeno con el OH del C1 del calcitriol (conservado en nuestro análogo) y un descenso de 1000 veces en la transactivación de coactivadores (Swann, S.L., et al., 2002). La Histidina 397, que pertenece a la hélice 11, interactúa con la hélice H12 y la estabiliza; pero además, como lo vemos con nuestro análogo oxolano, interactúa directamente con el ligando (Rochel, N., et al., 2000).

En conclusión demostramos que, a diferencia del ML-344, el análogo AM-27 fue efectivo en ensayos in cultivo ya que afectó la viabilidad de las líneas de CCECC, HN12 y HN13, y las de GBM (humanas y murina) sin afectar el cultivo primario de astrocitos, es decir, ejerciendo un efecto diferencial entre células tumorales y no malignas. También redujo la tasa migratoria de algunas de las líneas celulares ensayadas. El AM-27 indujo apoptosis en la línea HN12, a través de la vía intrínseca y apoptosis y/o necrosis en la línea GL26. En ensayos *in vivo*, no elevó la calcemia ni produjo toxicidad en dosis elevadas; sin embargo, no redujo la carga tumoral de los modelos de CCECC o de GBM utilizados. Mediante análisis *in silico* se observó que el AM-27 se une al sitio de unión a ligando de VDR y que la energía de interacción que establece es mayor a la del calcitriol. En base a los resultados obtenidos se propone, para futuras investigaciones, administrar el análogo

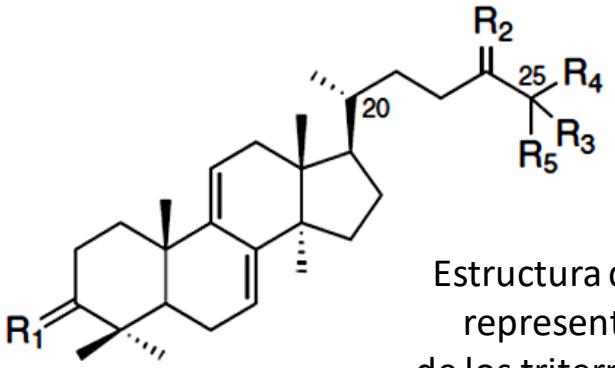
AM-27 a otros modelos animales de GBM y de CCECC y en dosis mayores a las utilizadas en este trabajo de tesis.

Segunda Parte: estudio de estrategias terapéuticas para CCECC y GBM, basadas en el extracto triterpénico de las esporas del hongo *Ganoderma lucidum*

"El límite entre alimento y medicamento se ha hecho tenue"
Bernardo Houssay (Premio nobel de medicina y fundador del CONICET)

"Let food be your medicine and medicine your food"
Hipócrates (460 a. C. - 370 a. C)

"Los árboles son la base de los bosques,
Pero un bosque es mucho más de lo que ven… hay otro mundo.
Un mundo de infinitos caminos biológicos"
Suzanne Simard



Estructura química representativa de los triterpenoides

Generalidades

Los hongos y el hombre guardan una estrecha relación desde el comienzo de los tiempos y han sido partícipes del desarrollo de varias culturas. Ya eran considerados sagrados en la Edad de Piedra (9000 a.C. 7000 a.C.) (Samorini, G., 2001) como lo revelan diferentes artes rupestres del Sahara, región donde proliferó la vida debido a encontrarse llena de agua (Figura 33). El estrecho vínculo se debe a sus efectos sobre el sistema nervioso central ya que poseen propiedades neurotrópicas como lo describe la siguiente narración: "*La persona que ha ingerido hongos se sitúa en el espacio, con una visión fuera del cuerpo, invisible, incorpórea, viendo sin ser observada, su cuerpo yace en la oscuridad, tan pesado como plomo, pero el espíritu parece vagar, con la velocidad del pensamiento para viajar ilimitadamente, en el tiempo y en el espacio*" (Schultes, R.E., 1972).

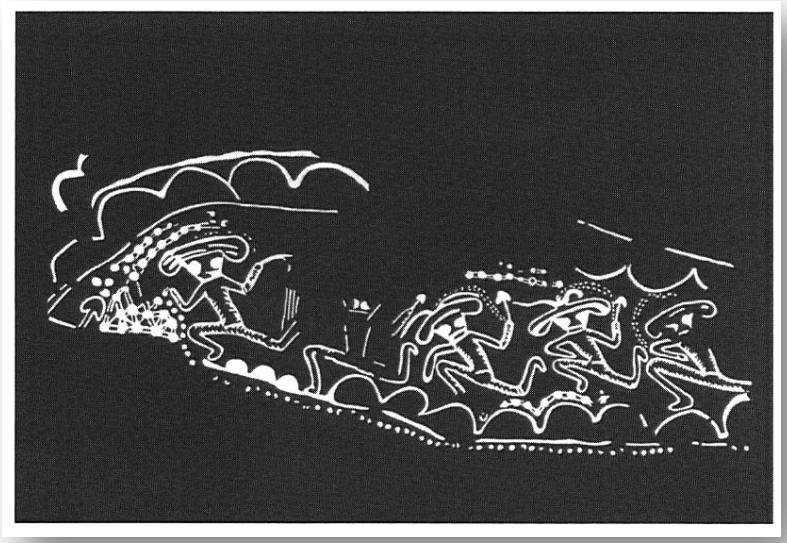


Figura 33. Diseño de una pintura rupestre hallada en Algeria. Se observa a varios individuos danzando. Cada participante sostiene un hongo.

El tiempo ha avanzado, inexorablemente, y con ello la relación entre ambos. Cuenta una leyenda griega que la civilización de Micenas debe su nombre gracias a que Perseo, al momento de fundarla, calma su sed al exprimir una seta –Mykes- y beber el líquido que brotó de él (Habicht, C., 1998).

Por otro lado, Hipócrates y Eurípides describen en sus observaciones las intoxicaciones por hongos. Plantorum Teofrasto se refirió a los hongos en los siguientes términos "A

pesar de no poseer raíces, ni tallos, ni hojas, ni frutos, los hongos, pertenecen al reino vegetal". Y, en el libro Alexifarmaca, Nicander de Colofón, expuso su observación "los hongos se originan del suelo por acción de la lluvia". Tambien los hongos tuvieron la responsabilidad de cambiar el curso normal de la historia humana al ser los protagonistas de un magnicidio que tuvo como consecuencia un reinado de tiranía. En el imperio romano, Nerón toma posesión del imperio con el asesinato de su padrastro Claudio, a través del empleo de oronjas verdes (*Amanita caeserea*). Nerón, tiempo después, ya coronado Emperador, oye decir en un banquete a un comensal "los hongos son manjares de dioses", y el Emperador responde "Sí, ellos son los que han hecho de mi padre un Dios" (López, J.A.S., 2000).

En América, la abundante evidencia arqueológica revela el empleo tradicional de hongos desde tiempos prehispánicos en todo el continente (Guzmán, G., 2012). La relación no difería con aquella del viejo continente. Los indios mesoamericanos veían relación entre los rayos y los truenos con la aparición de *Amanita muscaria*.

En la era del oscurantismo, cuando el cristianismo albergó gran parte del poder, se detuvo la adquisición de conocimientos debido a que la búsqueda de la verdad o el cuestionamiento de los dogmas no estaban permitidos. Sólo Dios preocupaba al hombre. Este evento fue el gran culpable del estancamiento de la ciencia, del arte, de la filosofía, etc. Con el advenimiento del renacimiento, los hongos se convirtieron en objetos de estudio de la ciencia. Se comprendió su manera de reproducirse, incluso antes de la invención del microscopio. Con la nueva concepción del hombre y del Universo aparecieron científicos que de a poco fueron aportando avances en la materia que se convertiría en una ciencia, la micología. Hombres como Charles de l'Écluse, Carolus Clusius, Robert Hooke, Pier Antonio Micheli, Carl von Linné, Elias Magnus Fries y Antón van Leeuwenhoek fueron los primeros referentes de la nueva ciencia (Larreátegui, D., 2011). En la era contemporánea, que atravesamos actualmente, la ciencia y la cultura se han vuelto fecundas, siendo, quizás, dos personajes los más emblemáticos en la materia que estamos tratando: Raymond Sabouraud (1864 – 1938) quien inventó el medio de cultivo diferencial para hongos de bajo pH y elevada concentración de azúcar; Y, Alexander Fleming, quien descubrió la penicilina en 1928, obtenido a partir del hongo *Penicillium notatum*, evento que hizo ingresar a la medicina en la era de los antibióticos. Incluso, quizás los hongos hayan sido partícipes necesarios en mantener al mundo libre de la opresión NAZI. Se discute si la siguiente historia es real o un mito: Un agricultor pobre - apellidado Fleming- de Inglaterra, estaba trabajando la tierra cuando escuchó a

alguien pidiendo ayuda desde un pantano cercano. Un niño aterrorizado, gritaba y luchaba tratando de liberarse del lodo. Fleming salvó al niño de lo que pudo ser una muerte lenta y terrible. Al día siguiente, un carruaje llega hasta las propiedades del agricultor. Un noble inglés se baja del vehículo y se presenta como el padre del niño que Fleming había salvado. El noble quiso recompensar al agricultor, pero Fleming no aceptó. Aparece en escena el hijo del agricultor y el noble le ofrece a Fleming que su hijo tuviera la educación de un noble; El agricultor aceptó, el hijo se graduó en la Escuela de Medicina de St. Mary's Hospital en Londres y se convirtió en miembro de la Royal Society en 1942, recibiendo el título de Sir dos años más tarde y el premio Nobel en 1945 por descubrir la penicilina. La historia cuenta que el apellido del noble era Churchill. Y que la penicilina salvó al hijo – Winston Churchill- de aquel noble, que financió los estudios de Alexander Fleming, cuando enfermó de neumonía.

Se estima que en la Tierra se desarrollan más de 140.000 especies de hongos, de los cuales sólo se conocen un 10%. De éstas 14.000 especies alrededor del 5% poseen propiedades farmacológicas significativas (Lull, C., et al., 2005). Un relevo, realizado en 85 países, muestra que existen 2.300 especies de hongos empelados como alimento o medicina (Boa, E.R., 2004). Los hongos presentan una capacidad de producción de metabolitos biológicamente activos poco investigada. La actividad biológica de estos abarca desde agentes antimicrobianos, anti fúngicos, antivirales y citostáticos hasta enzimas reguladoras de crecimiento y aromas. Estos metabolitos se agrupan según su naturaleza química relacionando ésta con las diferentes actividades biológicas. Los metabolitos secundarios producidos por los hongos constituyen la interface química entre éstos y el resto del mundo. Es así, como el reino Fungi constituye una fuente inagotable para la obtención de metabolitos activos (Brizuela, M.A., et al., 1998) (Chatterjee, S., et al., 2011).

Para la confirmación científica y el reconocimiento de los metabolitos responsables de la aparente actividad medicinal de los recursos naturales, la estrategia más utilizada es la bioprospección. La importancia de dicha técnica radica en la dificultad e/o imposibilidad de emplear la síntesis química para obtener determinadas propiedades en las moléculas de estructura compleja exhibidas por los productos naturales (vegetales, insectos y/o vertebrados) tales como la quiralidad y la asimetría. Estas moléculas naturales con asimetría presentan determinada distribución espacial dando lugar a los enantiómeros (R y S) que, aunque solo difieren en la dirección en que desvían la luz polarizada, poseen diferente actividad biológica siendo, generalmente, uno solo el que ejerce su efecto

farmacológico, y el otro puede ser inocuo, tóxico o teratogénico (Chatterjee, S., et al., 2011).

Por otra parte, entre los métodos más importantes de selección del material vegetal para escoger extractos con potencial actividad biológica se encuentran

• La selección taxonómica, que se basa en elegir plantas de una determinada familia o género que son capaces de producir, dentro de su metabolismo secundario, determinado tipo de compuestos.

• La selección Etno-Médica, basada en la elección de aquellas plantas que son utilizadas tradicionalmente con fines terapéuticos. Este enfoque ha demostrado ser el más efectivo de todos para la detección de nuevos principios activos pudiendo incrementar en 10 veces la probabilidad de éxito en la búsqueda de nuevos medicamentos (Pomilio, B.; & Mongelli, E., 2002). La comunidad científica internacional ha tomado conciencia sobre la importancia de preservar el conocimiento tradicional asociado al uso de los productos naturales.

Hongos tales como *Grifola frondosa* (Maitake), ***Ganoderma lucidum*** (Reishi), *Lentinus edodes* (Shiitake), *Inonotus obliquus* (Chaga) y muchos otros han sido recolectados por miles de años en Japón, Corea, China y este de Rusia (Lull, C., et al., 2005). Sin embargo, en la población occidental se los está aceptando en los últimos años debido a la creencia popular y desacertada de que carecían de valor nutricional y al temor de adquirir alguna enfermedad por su consumo (Konno, S., 2009). En la actualidad, el Instituto Nacional del Cáncer (NCI) de USA está abocado fuertemente a la búsqueda de metabolitos provenientes de la naturaleza para el descubrimiento de nuevas drogas debido a la variedad de compuestos y estructuras que poseen sus moléculas (Ajith, T.A., & Janardhanan, K.K., 2007).

Ganoderma lucidum

Un importante número de principios activos empleados en la clínica son derivados de plantas mayores (por ejemplo: vincristina, vinblastina, ácido acetil-salicílico, etc). Los hongos no son la excepción siendo los basidiomicetes una importante fuente de agentes biológicamente activos. (Ajith, T.A., & Janardhanan, K.K., 2007).

Ganoderma lucidum (vulgarmente llamado Lingzhi en China, aunque es más reconocido por su otro nombre vulgar otorgado en Japón, Reishi) es un reconocido hongo comestible y medicinal, perteneciente a la División Basidiomycota, Clase Agaricomycetes, Orden

Polyporales y Familia Ganodermataceae. Su color varía entre tonalidades que van del blanco al negro y crecen en latitudes cálidas en el tronco de árboles muertos. Ha sido empleado por más de dos mil años por la medicina tradicional China, y en otros países asiáticos como India y Japón debido a creencia popular de su capacidad de incrementar la expectativa de vida. Su gran empleo tradicional se debe a su excelente propaganda como agente promotor de la salud, aunque todavía no están del todo esclarecidos los mecanismos moleculares por los cuales tendría efectividad en la prevención y tratamiento de varias enfermedades (Zhao, J.D., & Zhang, X.Q., 1994) (Liu, G.T., 1999).

Las preparaciones no se encuentran aprobadas como formulaciones farmacéuticas, aunque sí lo están como suplementos dietéticos o nutracéuticos (Ajith, T.A., & Janardhanan, K.K., 2007). Por ejemplo, un popular suplemento dietario se consume en forma de infusión o polvo (Jiang, J., et al., 2011) (Thyagarajan, A., et al., 2006). Dentro de los efectos farmacológicos significativos reportados se documentaron sus propiedades anti-tumorales, anti-inflamatorias anti-oxidantes, anti-diabéticas, antibacterianas y hepatoprotectoras (Li, B., et al., 2013) (Kuo, H.P., et al., 2013) (Chen, C., et al., 2016) (Gill, B.S., et al., 2016), además de ser efectivo en la prevención de enfermedades crónicas como hepatitis, hipertensión y cáncer (Jiang, J., et al., 2011) (Wu, G.S., et al., 2012).

Ganoderma lucidum contiene más de 400 compuestos bioactivos representados por las especies moleculares clasificadas dentro de los triterpenoides, polisacáridos, nucleótidos, y esteroides (Li, B., et al., 2013) (Yuen, J.W.M., et al., 2012). La actividad antitumoral se le atribuye, principalmente, a los triterpenoides (Jiang, J., et al., 2011) (Wu, G.S., et al., 2012) y a los polisacáridos (Liang, Z.E., et al., 2015) (Krasnopolskaya, L.M., et al., 2014) (Ferreira, I.C., et al., 2015) (Sun, Z., et al., 2014) (Liang, Z., et al., 2013) (Liang, Z., 2014) (Popovic, V., et al., 2013) (Boh, B., 2013) (Lin, Z.B., & Zhang, H.N., 2004). La actividad de los triterpenoides es dependiente de su estructura y, como ocurre con todo extracto, es difícil reconocer el elemento biológicamente activo que es el mayor responsable de los efectos farmacológicos observados (Tang, W., et al., 2006). Los efectos citotóxicos varían entre los diferentes sub tipos de triterpenos (Kao, C., et al., 2013). Las esporas de Reishi son medicinalmente esenciales ya que los triterpenoides aislados de ellas mostraron poseer potente actividad terapéutica y farmacológica en múltiples enfermedades.

Triterpenoides

Como hemos visto, periódicamente se acrecienta el interés por los metabolitos secundarios de plantas superiores y hongos por presentarse con potencial como agentes terapéuticos y como una alternativa a las drogas sintéticas que frecuentemente cuentan con efectos adversos y pobre biodisponibilidad. Como se describió, las propiedades antioxidantes, antitumorales y antimetastásicas de *Ganoderma lucidum* (Reishi) le son adjudicadas a los triterpenoides (Zhong, J.J., & Xiao, J.H., 2009) (Jedinak, A., et al., 2011).

Los triterpenoides son moléculas orgánicas de estructuras variadas, con un núcleo común y con diversidad de sustituyentes que son los que permiten que se puedan encontrar en la naturaleza más de 20.000 compuestos diferentes. En términos generales, aunque se debería analizar individualmente cada uno, la actividad antitumoral se le atribuye a su capacidad de bloquear la activación de NF-Kβ, de inducir la apoptosis e inhibir la angiogénesis (Petronelli, A., et al., 2009). Son más de 140 los triterpenoides identificados en *Ganoderma lucidum*. Una cuestión interesante, que tiene importancia relevante, es que la cantidad de activos a extraerse de un extracto de *Ganoderma lucidum* va a variar dependiendo de la cepa empleada, del lugar de producción del hongo, del origen geográfico, de las condiciones de cultivo (humedad, temperatura, sustrato, etc) y del método de extracción. Estas cuestiones, ser una mezcla compleja y dificultad o ausencia de estandarización de los metabolitos activos, son las que limitan la aceptación e integración de este tipo de activos en la medicina occidental (Moreno, P, H., et al., 2011) (Thyagarajan, A., et al., 2006).

Acción antitumoral del *Ganoderma lucidum*

Es abundante la documentación científica, basados en ensayos *in vitro* e *in vivo* (tanto en animales como en humanos) donde se demuestra la acción antitumoral de *Ganoderma* en tumores de diferentes orígenes con diferentes grados de malignidad (Yuen, J.W.M., et al., 2012) (Chen, C., et al., 2016). Además, *Ganoderma lucidum* se ha combinado con agentes antitumorales mejorando la eficacia antitumoral y disminuyendo los efectos adversos generados por las terapias convencionales (Kao, C., et al., 2013) (Ajith, T.A., & Janardhanan, K.K., 2007).

Mecanismos de acción conocidos

A continuación se resume lo descripto en la bibliografía acerca de los mecanismos de acción de los extractos de *Ganoderma lucidum* o de sus principios activos aislados.

Arresto del ciclo celular

Se ha reportado que el extracto de triterpenoides de *Ganoderma lucidum* produce arresto del ciclo celular en fase G_1 a través de una disminución de los niveles de la ciclina D_1 por modulación de la β-catenina (Wu, G.S., et al., 2012) (Jedinak, A., et al., 2011) (Shtutman, M., et al. 1999). Además, un extracto etanólico del hongo inhibió la transición G2/M mediante la supresión de la actividad de la protein-quinasa C (PKC) y redujo los niveles de ciclina B (Lin, S.B., et al. 2003). También se reportó que el extracto suprimió la fosforilación y activación de ERK1/2, en células de cáncer de mama MCF-7 sometidas a estrés oxidativo, a través de la disminución de los niveles de c-Fos, una sub unidad de AP-1, impidiendo asi la unión de AP-1 al ADN (Thyagarajan, A., et al., 2006) (Martínez-Montemayor, M.M., et al., 2011). En otra línea de carcinoma mamario, la MDA-MB-231, G. lucidum inhibió la proliferación (arresto del ciclo celular en G_0/G_1) mediante la inhibición de la via de Akt (Jiang, J., et al., 2004). Por otra parte, el ácido ganodérico X produjo inhibición de la síntesis de ADN mediante la inhibición de la topoisomerasa (Li, C.H., et al., 2005) (Dudhgaonkar, S., et al., 2009).

Citotóxico

Se ha documentado que triterpenos, aislados de *Ganoderma lucidum*, indujeron apoptosis a través de la vía apoptótica intrínseca, seguida por la activación de la cascada de caspasas (Liu, R.M., & Zhong, J.J., 2011) (Liu, R.M., et al., 2012). Además, incrementaron la relación Bax/Bcl-2 por aumento de la expresión de Bax y descenso de la expresión de Bcl-2 (Liu, R.M., & Zhong, J.J., 2011). Por otra parte, los ácidos ganodéricos, aislados de *Ganoderma lucidum*, se unieron a la proteína 14-3-3, involucrada en la progresión del ciclo celular y de la apoptosis, inhibiendo su actividad (Yue, Q. X., et al., 2008) (Liu, R.M., et al., 2012).

Antiangiogénico

La angiogénesis es el proceso de formación de vasos sanguíneos por capilares que brotan de vasos preexistentes. Este evento es una respuesta fisiológica normal, pero es un proceso que también se produce en el estado patológico de la enfermedad tumoral. Esta formación de nuevos vasos consta de una serie de pasos que incluye a células endoteliales, matriz extracelular y factores angiogénicos como factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y factor de crecimiento transformante-β1 (TGF-β1) cuya expresión es controlada por los factores de transcripción AP-1 y NF-kβ que se encuentran constitutivamente activos en ciertos tumores. Por lo tanto, inhibir estos factores sería una potencial estrategia terapéutica. Se ha reportado qu la administración de un extracto de *G. lucidum* produjo inhibición de eventos tempranos de la angiogénesis a través de la inhibición de AP-1, y la concomitante disminución de la secreción de VEGF y TGF-β1 (Stanley, G., et al, 2005).

Antimetastásico

Se ha reportado que el ácido ganodérico de *G. lucidum* produjo inhibición de la invasión de células de tumores metastásicos a través de la inhibición de la expresión de MMP-9 (Chen, N.H., et al., 2008) (Chen, N.H., et al., 2010). También, que un extracto de *G. lucidum* redujo la expresión de IL-8 (molécula que se asocia con un fenotipo metastásico porque induce angiogénesis) (Thyagarajan, A., et al., 2006).

Antioxidante

Existen abundantes trabajos que sugieren que los productos de origen natural pueden proteger contra algunos cánceres (Greenwald, P., et al., 2001), especialmente aquellos que poseen moléculas antioxidantes (Thyagarajan, A., et al., 2006). El oxígeno es una molécula esencial para el desarrollo de la vida. Participa en el transporte de electrones que producen ATP y colabora en la utilización de los nutrientes; sin embargo, su desbalance puede producir daño oxidativo (Ajith, T.A., & Janardhanan, K.K., 2007) (Wei, Y.S., et al., 2009). Este último es un factor importante y de gran influencia en la iniciación, desarrollo y progresión del cáncer ya que induce injuria celular y tisular. Los radicales

libres y las especies reactivas de oxígeno, generados en los procesos metabólicos, tienen la capacidad de dañar el ADN, proteínas estructurales y enzimas generando reacciones en cadena descontroladas (peroxidación lipídica u autooxidación) conduciendo a la célula al llamado estado de estrés oxidativo que puede ser contrarrestado por enzimas antioxidantes y por mecanismos de reparación. Sin embargo, cuando el estrés oxidativo supera la capacidad fisiológica de la célula de controlarlo se pueden producir trastornos con potencial de desarrollar cáncer (Kao, C., et al., 2013) (Ajith, T.A., & Janardhanan, K.K., 2007) (Thyagarajan, A., et al., 2006).

En relación a esto, se ha reportado que un extracto de *G. lucidum* eliminó radicales libres, redujo la peroxidación lipídica e incrementó la actividad de enzimas antioxidantes *in vitro* (Smina, T.P., et al., 2011)[b].

Antiinflamatorio

Se reportó la capacidad de un extracto de triterpenoides de *Ganoderma lucidum* de suprimir la expresión de citoquinas inflamatorias TNF-α e IL-6 y de los mediadores inflamatorios NO y PGE-2. El efecto se consiguió mediante la inhibición del factor de transcripción NF-ƙB (Dudhgaonkar, S., et al., 2009). Los factores de transcripción NF-Kβ y AP-1 son regulados por MAPK (proteinquinasas activadas por mitógenos) como ERK1/2, p38 MAPK y JNK; y por IKKs (quinasa inhibitoria Kappa Beta), que regula la translocación a núcleo de NF-Kβ. En relación a esto se demostró también que el extracto del hongo redujo la fosforilación y activación de ERK1/2 y JNK, pero no de p38 (Dudhgaonkar, S., et al., 2009) (Thyagarajan, A., et al., 2006).

Inmunoestimulador

Uno de los *hallmark* del cáncer es la evasión del sistema inmune, y aunque se le adjudica el fortalecimiento del sistema inmune al extracto polisacárido de *Ganoderma lucidum*, también el ácido ganodérico Me (GA-Me) ha demostrado incrementar la actividad de las células *Natural Killer* y la producción de IL-2 e IFN-γ al producir sobreexpresión de NF-kβ, conduciendo esto a inhibir el crecimiento tumoral y las metástasis del carcinoma de pulmón de Lewis en ratones (Radwan, F. F., et al., 2011).

La Figura 34 muestra los principales efectos antitumorales de *Ganoderma lucidum* atribuidos a los triterpenoides y/o a los polisacáridos extraídos de este hongo.

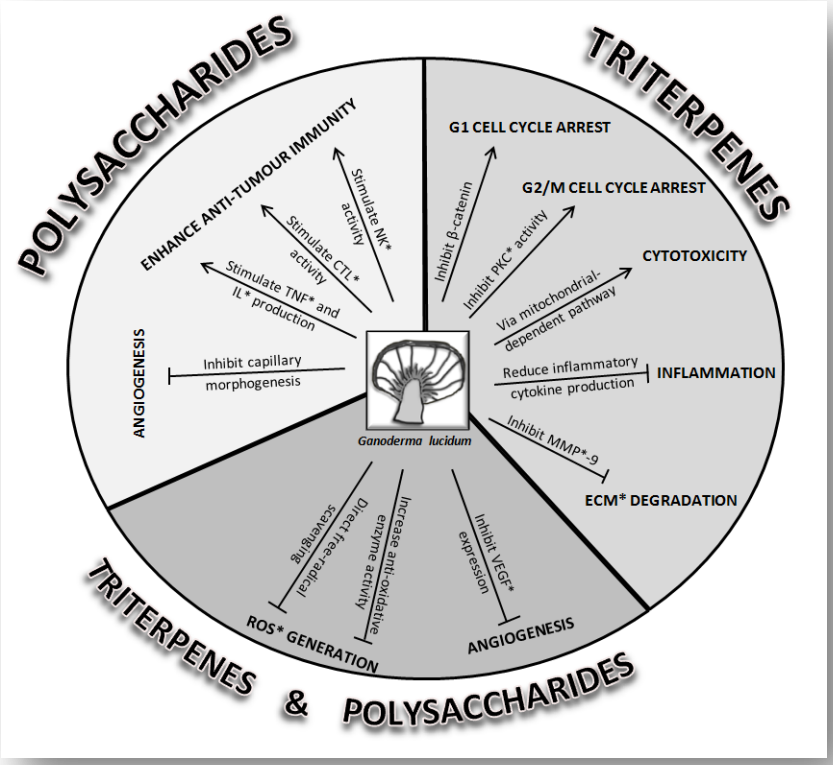


Figura 34. Mecanismos mediante los cuales *Ganoderma lucidum* ejerce sus efectos antitumorales. Tomado de Kao, C., et al., (2013).

Todas estas funciones atribuidas a los triterpenoides, sumadas a su escasa o nula toxicidad, los vuelven candidatos ideales para su potencial empleo en quimio e inmunoterapias complementarias.

Hipótesis y Objetivos

"Nunca tenga certeza de nada, porque
La sabiduría comienza con la duda"- S. Freud.

Hipótesis y objetivos

Tal como describiéramos en la Introducción, en la actualidad se está incrementando la búsqueda de principios activos provenientes de la naturaleza (bioprospección) debido a la heterogeneidad y complejidad de las moléculas encontradas en estas fuentes naturales y, además, por ser dificultosa o imposible la síntesis de dichos compuestos biológicamente activos (Chatterjee, S., et al., 2011). Dentro de los hongos, los basidiomicetes son fuente de compuestos con diversos efectos, entre ellos anti-inflamatorios, anti-oxidantes y anti-tumorales. *Ganoderma lucidum* (Reishi) es un basidiomicete comestible y medicinal que presenta más de 400 compuestos bioactivos, entre ellos triterpenoides, polisacáridos, nucleótidos y esteroides. La actividad antitumoral se le atribuye principalmente a los triterpenoides.

Por otro lado, ya hemos descripto en la Introducción general de esta tesis las características de los CCECC y de los GBM, mostrando que son tipos de cáncer que, aunque no muy frecuentes, poseen un pronóstico pobre, debido en parte a las características de estos tumores y a la ausencia de terapias exitosas. Por ello nos propusimos investigar la potencialidad terapéutica de un extracto triterpénico obtenido de esporas de *Ganoderma lucidum* en CCECC y GBM, que hasta donde alcanza nuestro conocimiento todavía no se encuentra documentada.

La hipótesis de trabajo es que el extracto, producido y provisto por el Laboratorio de Hongos Medicinales y Comestibles, pertenecientes al CERZOS-CCT-Bahía Blanca, posee actividad antitumoral en CCECC y GBM. Para comenzar a testear la hipótesis realizamos ensayos preclínicos tendientes a estudiar la actividad antitumoral del extracto en líneas celulares y a evaluar la toxicidad del mismo en ratones.

Objetivos

Para comenzar a desarrollar los ensayos preclínicos del nuevo extracto alcohólico de las esporas de *Ganoderma lucidum*, nos propusimos:

1. Investigar los efectos del extracto sobre la viabilidad celular y la capacidad migratoria de células tumorales de CCECC y GBM.

2. Comenzar a investigar los mecanismos implicados en la actividad antitumoral del extracto, evaluando si tiene efectos sobre el ciclo celular o sobre la muerte celular.

3. Estudiar la toxicidad del extracto en ratones CF-1.

Materiales y Métodos

"La naturaleza es el gran médico
Y el hombre posee a éste en sí mismo"–Paracelso

"Nunca se buscó dotor
Pues se curaban con yuyos
O escuchando los murmullos
De un estilo de mi flor"
Atahualpa Yupanki – el payador perseguido

Materiales

Reactivos y drogas

Se emplearon los siguientes reactivos: cloruro de hemina equina (Sigma Aldrich, USA), 4-3-4-iodofenil-2-4-nitrofenil-2H-5-tetrazolio-1,3-benzeno disulfonato (Cell Proliferation Reagent WST-1 Roche), cloruro de sodio (Cicarelli), cloruro de potasio (Biopack), sodio fosfato dibásico anhidro (Biopack), potasio fosfato monobásico (Mallinckrodt), Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare), acrilamida 99,9 % reactivo de pureza para electroforesis (BIO-RAD), glicina reactivo de pureza para electroforesis (BIO-RAD), N,N`-metileno-bis-acrilamida reactivo de pureza para electroforesis (BIO-RAD), N,N,N`, N`-tetra-metil-etilendiamina (TEMED) (BIO-RAD), persulfato de amonio (BIO-RAD), Tritón X-100 para electroforesis (SIGMA), Tween 20 para electroforesis (SIGMA), buffer muestra (Amersham), Bio-Rad Protein Assay (BIO-RAD), hidróxido de sodio calidad analítica (Anedra), LB Agar Ampicilina, MBI Fermentas, extracto de levadura (Britania), glicerol (SIGMA), ribonucleasa A de páncreas bovino (SIGMA), solución de ioduro de propidio (Roche), alcohol etílico medicinal (Porta), alcohol etílico absoluto (Dorwil), xilol (Dorwil), metanol (Cicarelli), peróxido de hidrógeno 30 % (v/v) (Cicarelli), portaobjetos Superfrost Plus (Thermo Scientific), cubreobjetos Patho Glass, albumina sérica bovina Amersham (GE Healthcare) y kit de revelado de inmunohistoquímica de Vector (Vectastain).Medios de cultivo para células: RPMI Medium 1640 y DMEM Gibco Life technologies, suero fetal bovino Natocor, tripsina 0,25 % Gibco y antibiótico/antimicótico 100X Gibco.

Preparación de la solución stock de Hemina

Hemina: 36 mg de cloruro de hemina se disolvieron en 0,4 ml de NaOH 0,5 N y se agregaron 0,5 ml de tris-HCl 1 M pH 8. Se filtraron utilizando filtros de 0,2 µm y se conservó alicuotado a -70 ºC y al resguardo de la luz. Inmediatamente, antes de su uso, se diluyó en PBS 1:100 (Muppala, V., et al., 2000).

Anticuerpos

Actina (C-11) policlonal goat (Santa Cruz Biotechnology). Anticuerpo policlonal primario de conejo anti-HO-1 (SPA-896, Stressgen Bioreagents, Canadá).

Preparación del extracto isopropanólico de las esporas de *Ganoderma lucidum*

Extracción alcohólica de las esporas de *Ganoderma lucidum*

El extracto de esporas de *Ganoderma lucidum* se obtuvo por maceración con 20 volúmenes de etanol 96% (10 gramos de esporas en 200 mL de etanol), durante 7 días. Luego de filtrar el extracto se llevó a sequedad en estufa a 55 ºC. Se obtuvo un residuo seco, de consistencia fluida y color marrón-anaranjado. El rendimiento de la extracción fue 4.5%. El residuo seco se redisolvió en isopropanol. Parte del residuo (aproximadamente el 44%) es insoluble y se eliminó por centrifugación.

Determinación del contenido total de triterpenoides

Se determinó la concentración de triterpenoides según el protocolo detallado por Bidegain y colaboradores (Bidegain, M.A., et al., 2015). Brevemente, el contenido total de este grupo químico se cuantificó mediante un método colorimétrico utilizando una curva de estándar de ácido ursólico. La solución estándar de ácido ursólico se preparó disolviendo 10 mg (U6753; Sigma) en 100 ml de etanol absoluto. Triplicados de diferentes alícuotas (0; 0,4; 0,8; 1,0 y 1,2 ml) de esta solución se transfirieron a tubos de ensayo de 10 ml. Se evaporó el disolvente en un horno a 60 °C para añadírseles 0,15 ml de una solución al 5 % de vainillina (W310700; Sigma) en ácido acético glacial (Anedra, Argentina) y 0,5 ml de ácido perclórico al 70 % (Cicarelli, Argentina). Esta mezcla se calentó a 60 °C por 45 minutos, se dejó enfriar a T° ambiente y se diluyó con 2,5 ml de ácido acético. Se determinó la absorbancia de cada mezcla en espectrofotómetro a 548 nm (Genesys 20; Thermo Scientific). Se observó una buena relación lineal dentro del intervalo que va desde 0,004 hasta 0,12 mg ($y = 11.47x - 0,3606$; $R2 = 0,96$).

Empleando este protocolo, el contenido total de triterpenoides en el extracto isopropanólico de las esporas del hongo fue de 8,4 mg/ml ± 0,3 mg/ml.

Líneas celulares empleadas

Línea celular GL26, derivada de un glioblastoma murino aparecido en la cepa C57BL/6, cedida gentilmente por la Dra. Marianela Candolfi.
Línea celular HN12, de carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello derivada de una metástasis nodal humana, facilitada gentilmente por el Dr. Silvio Gutkind.
Línea celular HN13, derivada de carcinoma celular escamoso de lengua humana, facilitada gentilmente por el Dr. Silvio Gutkind.

Cepas de ratón utilizadas

El trabajo con los animales se desarrolló en conformidad con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio y todos los estudios contaron con protocolos aprobados por el CICUAE de la Universidad Nacional del Sur.Los ratonesmacho CF1 fueron gentilmente cedidos por el Bioterio del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur.Los ratones machos N:NIH(S)-Fox1^{nu} SPF (Specific Pathogen Free) fueron obtenidos de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de la Plata cuyos progenitores proceden del National Institute of Health (USA).

Cultivo Celular

Mantenimiento de los cultivos celulares

La evaluación biológica del extracto isopropanólico de *Ganoderma lucidum* se llevó a cabo utilizando las líneas de CCECC HN12 y HN13 y la línea de GBM GL26. HN12, HN13 se mantuvieron a 37 °C, 5% CO_2 en DMEM supplementado con 100 U/ml penicilina, 100 U/ml estreptomicina, 4 mM glutamina y 10% de suero fetal bovino (FBS).GL26 se mantuvo en medio RPMI (Sigma) suplementado con 10% (v/v) de FBS (Gibco), L-glutamina (5 mM, Gibco), penicilina (100 U/ml, Gibco) y estreptomicina (100 µg/ml, Gibco). Esta línea también se mantuvo en incubador a 37 °C y 5% de CO_2. Las células de todas las líneas fueron plaqueadas cada 3−4 días.

Ensayos Celulares

Análisis de la viabilidad celular: conteo manual de células en cámara de Neubauer y ensayo WST-1

En primera instancia, se estudió el efecto del extracto sobre la viabilidad celular de las líneas mencionadas mediante conteo celular manual en cámara de Neubauer y posteriormente se analizaron los efectos empleando el ensayo WST-1. El ensayo se llevó a cabo tal como se detalló en la primera sección de la tesis con las siguientes modificaciones: se desarrolló por el término de 12 h y el tratamiento se efectuó con diferentes diluciones del extracto de G. lucidum o vehículo (isopropanol).

Análisis de la migración celular

Se realizó el ensayo de "*wound healing*" de la misma manera que se describió en la primera sección de la tesis, con la siguiente modificación: luego de generarse la sección descubierta en la monocapa celular con el tip de una micropipeta se retira el medio de cultivo y se añade nuevo medio de cultivo con la concentración inhibitoria media del extracto de G. lucidum (IC_{50}) o del vehículo (isopropanol).

Análisis del estrés oxidativo celular

El estrés oxidativo se determina empleando la sonda 5 o 6 carboxi 2´7´diacetato de dicloro fluoresceína (DCDCDHF) que tiene la habilidad de atravesar la membrana y oxidarse en un compuesto fluorescente. Se sembraron 25000 células por placa de 35 mm y a las 24 h se comenzó el tratamiento por 12 h con el vehículo o con el extracto de *Ganoderma lucidum*. Una vez cumplido el plazo de tratamiento, se lavaron las placas con PBS y se incubaron por 30 minutos en oscuridad y a 37 °C con medio que contiene 10 μM de DCDCDHF (Molecular Probes, Eugene, Oreg., USA). Se lavó cada placa tres veces con PBS y las células se lisaron con buffer de lisis. Se las sometió a dos rondas, de 30 segundos cada una, de sonicación. Luego, se midió la fluorescencia de los lisados utilizando un fluorímetro SLM modelo 4800 (SLM instruments, Urbana, IL) a λem = 590 y λex = 538 (Uranga, R.M., et al., 2007). Luego, se cuantificaron las proteínas del lisado y

se normalizó la señal obtenida de la fluorescencia con respecto a la cantidad de proteína del lisado correspondiente. Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias.

Análisis de proteínas. SDS – PAGE y Western Blot

Preparación de lisados celulares

Por cada cultivo celular crecido en monocapa se adicionaron 75-150 µl de solución de lisis (2 % TRIS 1M, 1 % Triton-X 100, 0.5M EDTA 0.5M, 2 % NaCl 1M) a la cual se le agregó previamente 1 µL de *cocktail* de inhibidores de proteasas en el momento de uso. Luego se lisaron las células con espátula, sobre hielo, y se las colocó en tubos Eppendorf. La mezcla se dejó reposar durante 30 min.

Medición de la concentración de proteínas

Para la determinación de la concentración proteica se confeccionó una curva de calibrado constituida por cantidades crecientes (2 µl, 4 µl, 5 µl, 7,5 µl, 10 µl, 15 µl y 20 µl) de un estándar de BSA 1 mg/ml en un volumen final de 1 ml de RB (reactivo Bradford, BioRad) 1/4. Los viales se mezclaron vigorosamente y se leyeron las absorbancias de los estándares a 595 nm. Paralelamente se prepararon y trataron las muestras incógnitas de igual manera por duplicado.

Preparación de las muestras

Se realizaron los cálculos necesarios para llevar el volumen del lisado a la concentración de proteínas deseada con solución de lisis y buffer muestra 4X (2,4 ml de Tris 1M pH 6.8, 0,8 g de SDS, 4 ml de glicerol, 0,01 g Azul de Bromofenol, 1 ml BME, H_2O destilada 2,8 ml). Finalmente, se calentó la mezcla por 5 min a 90 ºC. Los lisados se conservaron a -20 °C hasta su utilización.

Electroforesis

Para la separación de proteínas por peso molecular se hicieron electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (al 5%,12% o 15% según la proteína de

interés). Para ello se prepararon geles de *stacking* y separación a partir de las proporciones detalladas en los cuadros que se muestran a continuación. Se sembraron en una calle 10 µl de estándar de peso molecular (See Blue Plus, Invitrogen) y en las restantes 100 µg de proteínas. Se realizó la separación en buffer de electroforesis a 0,04 A para proteínas migrando sobre el gel de *stacking* y a 0,06 A cuando penetran al gel de separación, hasta terminar la corrida.

Buffer Electroforesis 1X
Tris Base 3g
Glicina 14,4g
SDS 10 % 10mL
H2O Milli Q hasta completar 1L

Gel Stacking 5 % (10 ml)	Gel Separación 12 % (25ml)	Gel Separación 15 % (25ml)
H20 6.8 ml	H2O 8.2 ml	H2O 5,7 ml
Tris 1M pH 6.8 1,25 ml	Tris 1,5M pH 8.8 6,3 ml	Tris 1,5M pH 8.8 6,3 ml
Acrilamida/bis-acrilamida 30 % 1.7 ml	Acrilamida/bis-acrilamida 30 % 10 ml	Acrilamida/bis-acrilamida 30 % 12,5 ml
SDS 10 % 0,1 ml	SDS 10 % 0,25 ml	SDS 10 % 0,25 ml
TEMED 0,01 ml	TEMED 0,01 ml	TEMED 0,01 ml
APS 10 % 0,1 ml	APS 10 % 0,25 ml	APS 10 % 0,25 µl

Transferencia a membrana de PVDF

Una vez concluida la separación electroforética, las proteínas fueron transferidas a un soporte sólido. Una de las caras del gel fue apoyada sobre una membrana de PDVF (Millipore), previamente activada con metanol por 1 min, y ambos fueron colocados entre papeles de filtro (BioRad) previamente humedecidos en buffer de transferencia y éstos a su vez colocados entre dos esponjas de poro grande y dentro de un soporte plástico. Toda la construcción fue sumergida en el tanque electroforético, con buffer de transferencia 1X, con la membrana de PVDF del lado anódico. La transferencia se llevó a

cabo a 0,3 A, durante 1,30 dependiendo de la proteína de interés. Las membranas fueron lavadas con PBS 1X, secadas y guardadas a 4 °C hasta su utilización.

Buffer Transferencia 1X
Tris Base 3,03g
Glicina 14,4g
Metanol 200mL
H2O Milli Q hasta completar 1L

Inmunodetección de proteínas

Las membranas fueron activadas en metanol por 1 min y colocadas en PBS 1X, luego fueron bloqueadas con leche descremada al 5% en PBS, en agitación continua, durante 30 min. Posteriormente, se realizaron 3 lavados y se procedió a incubarlas con una dilución adecuada de anticuerpo primario preparada en una solución de BSA 0,4% disuelta en PBS toda la noche en cámara fría. Luego, se realizaron 3 lavados con PBS conteniendo 0,01% de Tween-20 e inmediatamente se incubó la membrana con una dilución 1/1000 del anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante específico, preparado en leche descremada al 5% disuelta en PBS, a Tº ambiente y durante 1 h. Finalmente se realizaron 3 lavados y se procedió a revelar las membranas. Se empleó para ello el reactivo de quimioluminiscencia ECL Plus (GE Healthcare), según las especificaciones indicadas por el proveedor. Para su uso posterior, las membranas fueron lavadas 3 veces con PBS, secadas y guardadas a 4 ºC. El anticuerpo policlonal de cabra anti-β-actina (C-11) (Santa Cruz Biotechnologies, sc-1615) fue usado como control de carga.

Análisis del ciclo celular por citometría de flujo

Se llevó a cabo tal como se detalló en la primera parte de la tesis, pero esta vez realizando los tratamientos de las células con la IC_{50} del extracto de *G. lucidum* o del vehículo por el término de 12 h.

Análisis de la inducción de apoptosis, TUNEL

Se llevó a cabo tal como se detalló en la primera parte de la tesis, pero con la siguiente modificación: los cultivos celulares fueron tratados con *G. lucidum* (IC_{50}) o vehículo por 12 h.

Análisis del potencial de membrana mitocondrial

Se llevó a cabo tal como se detalló en la primera parte de la tesis, pero con la siguiente modificación: los cultivos celulares fueron tratados con *G. lucidum* (IC_{50}) o vehículo por 6 h.

Análisis de la liberación de lactato-deshidrogenasa

Se llevó a cabo tal como se detalló en la primera parte de la tesis, pero con la siguiente modificación: los cultivos celulares fueron tratados con *G. lucidum* (IC_{50}) o vehículo por 12 h.

Ensayos *in vivo*

Evaluación de toxicidad sub-aguda en la cepa de ratón CF-1

El ensayo se realizó con ratones machos de la cepa CF-1, gentilmente cedidos por el bioterio de la Universidad Nacional del Sur, luego de aprobarse el protocolo experimental por la comisión del CICUAE del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia perteneciente a la misma Universidad. Los animales se mantuvieron en el bioterio del INIBIBB-CCT-Bahía Blanca, bajo ciclos de luz/oscuridad de 12 h cada uno y con acceso al alimento y al agua *ad libitum*. Empleamos 14 ratones que se dividieron, al azar, en dos grupos de 7. A cada grupo, también al azar, se les asignó un tratamiento, vehículo (isopropanol) o extracto triterpénico isopropanólico de *Ganoderma lucidum*. El extracto y el vehículo se diluyeron en solución fisiológica estéril y se les administró, de manera intraperitoneal, 9 dosis de 10 mg de triterpenoide/kg de peso, día por medio. Todos los días se controlaba el peso y las condiciones generales de cada animal, con la finalidad de

detectar cualquier signo de dolor y/o intoxicación. Luego de las 9 aplicaciones los animales fueron sacrificados bajo una atmósfera de CO_2 según recomendaciones de la Guía de Buenas Prácticas con Animales de Experimentación (http://www.upei.ca/humanres/files/humanres/ExperimentalAnimals_GDL.pdf). Los órganos disecados se midieron y se pesaron, se fijaron con formol al 10% para su posterior procesamiento por técnicas histológicas para evaluar posibles efectos adversos del análogo sobre los mismos. Se recolectó sangre, al comienzo de la experiencia y al momento del sacrificio, para determinar sí el vehículo o el extracto modificaban el hematocrito.Para ello, los animales fueron anestesiados con una combinación de Ketamina y Acedan ® (Holliday Scott, Argentina) en una dosis de 50/1 mg/kg de peso corporal respectivamente y posteriormente se colectó sangre del seno retro orbital utilizando capilares heparinizados. Las muestras fueron procesadas, protegidas de la luz y se mantuvieron en hielo. Se separó el plasma por centrifugación a 5000 rpm durante 5 min y se midió el parámetro en cuestión.

Análisis estadístico

La evaluación estadística de los datos se realizó en base a los valores promedios y desvío estándar (SD) de “n” experimentos independientes. Para los ensayos de viabilidad celular y migración celular, citometría de flujo, LDH y medición del peso en función del tiempo se realizó un ANOVA (de dos vías) con posterior test de Bonferroni para la comparación de los grupos. Se aplicó test de student al esayo de TUNEL, de potencial de membrana mitocondrial, de hematocrito y de los pesos relativos de órganos Se realizó ANOVA de una vía al ensayo de estrés oxidativo celular. Todos los análisis fueron realizados utilizando el software GraphPad Prism 5 (San Diego California USA).

Resultados

“Si ayudo a una sola persona a tener esperanza, no habré vivido en vano”
Martin Luther King.

Una vez que se obtuvo el extracto y que se determinó la concentración de triterpenoides totales en el mismo, por parte del Laboratorio de Hongos Comestibles y Medicinales del CERZOS, se procedió con el desarrollo del primer objetivo de esta parte de la tesis que proponía realizar ensayos *in cultivo* para investigar si el extracto presentaba propiedades antitumorales (reducir la viabilidad y/o la migración) en las líneas celulares bajo estudio. A continuación se describen los resultados obtenidos para este primer objetivo.

IX- Efecto del extracto triterpénico de G. *lucidum* sobre la viabilidad celular

Comenzamos realizando ensayos de dosis-respuesta que consistieron en el conteo manual en cámara de Neubauer de las células HN12, HN13 y GL26 luego de su exposición a diferentes concentraciones del extracto isopropanólico de *G. lucidum*. Debido a que era la primera vez que trabajábamos en nuestro laboratorio con un extracto triterpénico de esporas de Reishi, comenzamos ensayando diferentes tiempos de tratamiento y, al observar que el efecto sobre la viabilidad se producía tempranamente, es que decidimos no extender los ensayos dosis-respuesta más allá de las 12 h de tratamiento. En la figura 35, se puede observar que hay un importante descenso en el conteo celular de las líneas humanas de carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello HN12 (A), HN13 (B) y de la línea murina de glioblastoma multiforme GL26 (C) luego del tratamiento con diferentes concentaciones del extracto. En la tabla 13 se detallan las concentraciones inhibitorias medias (IC_{50}) para el extracto en todas las líneas ensayadas.

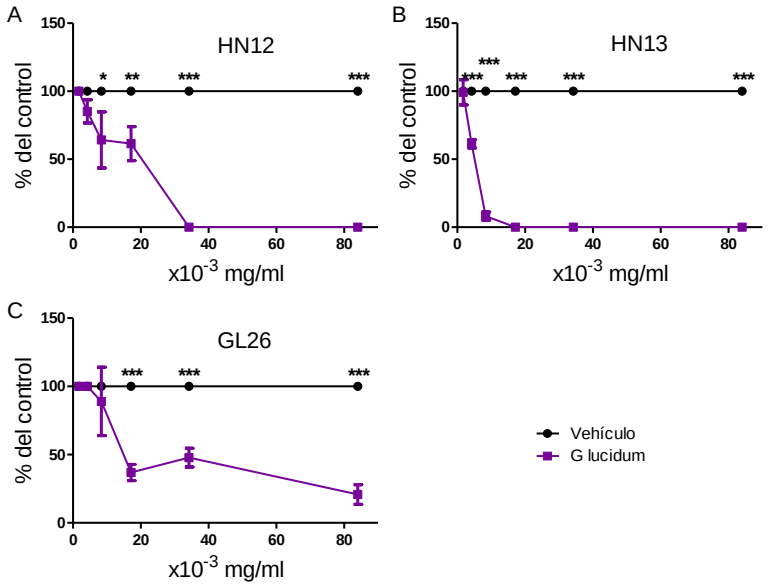


Figura 35. Ensayos dosis - respuesta del extracto isopropanólico de *G. lucidum* (violeta) sobre la viabilidad celular de líneas celulares de CCECC y GBM. A. HN12, B. HN13, C. GL26. Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones del extracto de *G. lucidum* o vehículo (isopropanol), por 12 h. Cada punto representa el promedio de cuatro repeticiones ± SD. El ensayo fue repetido 3 veces para cada línea. Se realizó ANOVA (de dos vías) con posterior test de Bonferroni, *** $p<0,001$; ** $p<0,01$; * $p<0,05$.

Línea Celular	IC_{50} (mg/ml)
HN12	7.691×10^{-3}
HN13	5.944×10^{-3}
GL26	5.428×10^{-3}

Tabla 13. Valores IC_{50} (mg/ml) del extracto de G. lucidum obtenidos para cada línea.

X- Efecto del extracto triterpénico de G. *lucidum* sobre la migración celular

Como mencionáramos con anterioridad, dentro de las "capacidades" que adquiere una célula durante su transformación maligna se encuentra la invasividad, para lo cual debe, en principio, aumentar su tasa migratoria. Procuramos entonces evaluar a través del ensayo de la herida el efecto del extracto triterpénico de las esporas de G. *lucidum* sobre la migración celular. Se procedió de la manera descripta en la sección "materiales y métodos" empleando para el tratamiento la IC_{50} correspondiente para cada línea. Los tiempos de determinación de la migración nunca fueron superiores al tiempo de duplicación correspondiente para cada línea celular. Como se muestra en la figura 36, se observó que, para las dosis ensayadas, el extracto retardó la migración celular de las líneas HN12 (A), HN13 (B) y GL26 (C).

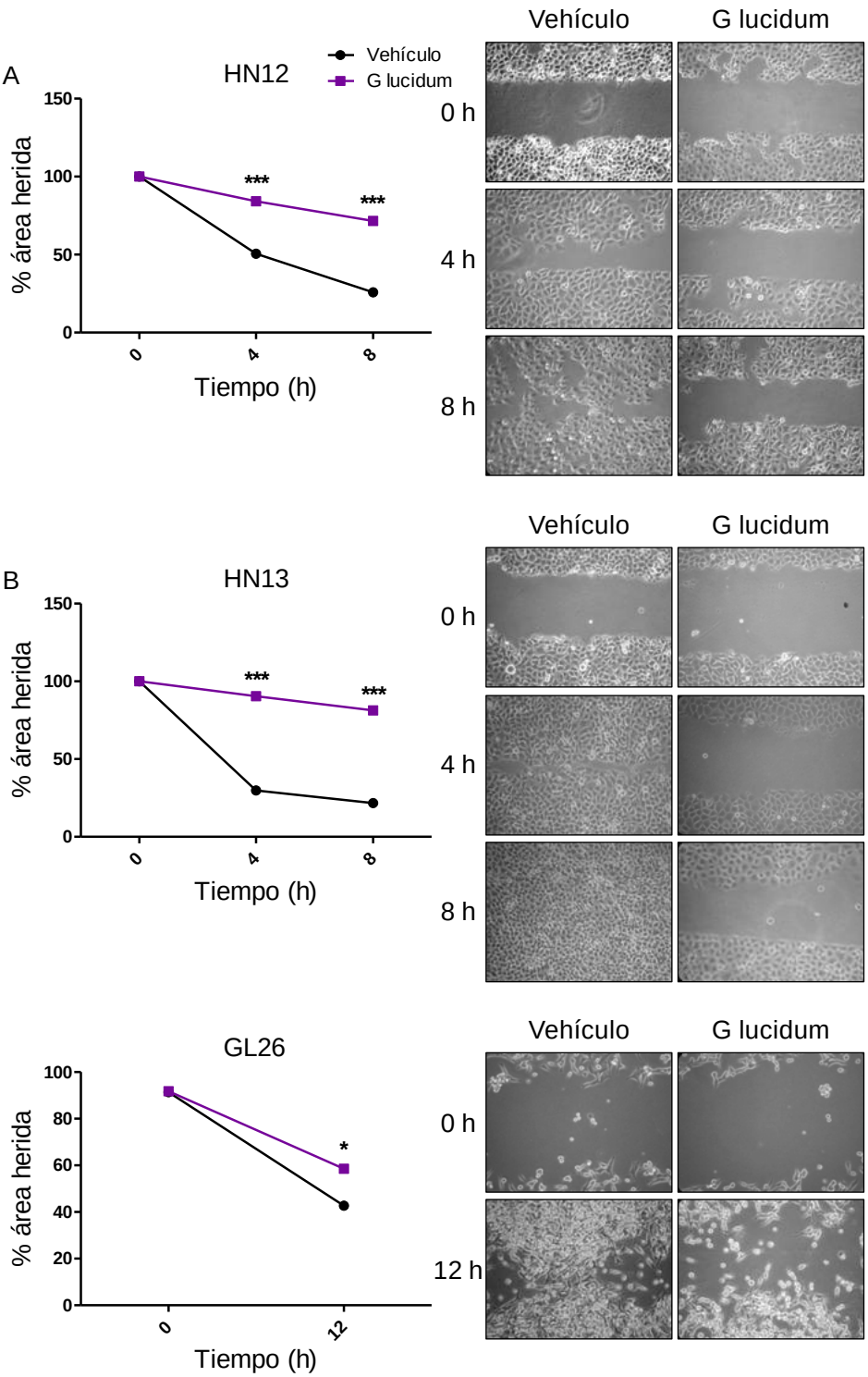


Figura 36. Estudio de la migración celular luego de la exposición de líneas celulares de CCECC y GBM a *G. lucidum* (violeta). A. HN12, B. HN13, C. GL26. Las células fueron expuestas a la IC_{50} por un tiempo no mayor al tiempo de duplicación de la línea correspondiente. Se representa el promedio de cuatro heridas ± SD. El ensayo fue repetido 3 veces para cada línea.Se realizó ANOVA (de dos vías) con posterior test de Bonferroni, *** p< 0,001; ** p< 0,01; * p<0,05.

Habiendo observado que el extracto de *G. lucidum* producía *in cultivo* reducción de la viabilidad y migración celular de las líneas de CCECC y de GBM, proseguimos los ensayos preclínicos con la evaluación de los mecanismos por los cuales el extracto podría estar ejerciendo estos efectos (segundo objetivo).

XI- Estudio de los mecanismos implicados en los efectos antitumorales del extracto triterpénico de G. *lucidum*: análisis del ciclo celular y muerte celular.

El extracto demostró ser eficaz en disminuir la viabilidad celular de las líneas HN12, HN13 y GL26. Para comenzar a avanzar en la determinación de los mecanismos que subyacen al efecto mencionado, se estudió a continuación si el extracto producía arresto o muerte celular. Para el caso de CCECC, se eligió seguir trabajando con la línea HN12, dado que el laboratorio ha desarrollado un modelo animal de implante subcutáneo de dichas células con el cual se pretende seguir trabajando en investigaciones futuras con el extracto. Para el caso de GBM, se llevaron a cabo algunos de los ensayos en la línea GL26.

Las células HN12 fueron pre-tratadas con el extracto y se sometieron al análisis de la distribución de la población celular por citometría de flujo usando la tinción con ioduro de propidio. En la figura 37 se observa que el tratamiento de la línea celular HN12 por 12 h, empleando la IC_{50}, produjo una elevación muy significativa de la población celular en fase $subG_0/G_1$ con respecto al vehículo (67,41% ± 1,35% vs 36,67% ± 10,16% $p < 0.001$). El poderoso incremento de la población celular en dicha fase se asoció con reducción del resto de las fases del ciclo, siendo muy significativo el descenso en G_0/G_1, con respecto al vehículo, (9,52% ± 3,96% vs 36.75% ± 5,98%) (Tabla 14).

Estos resultados sugieren que la disminución en la viabilidad celular originalmente observada en HN12 se debe a un aumento de la muerte celular.

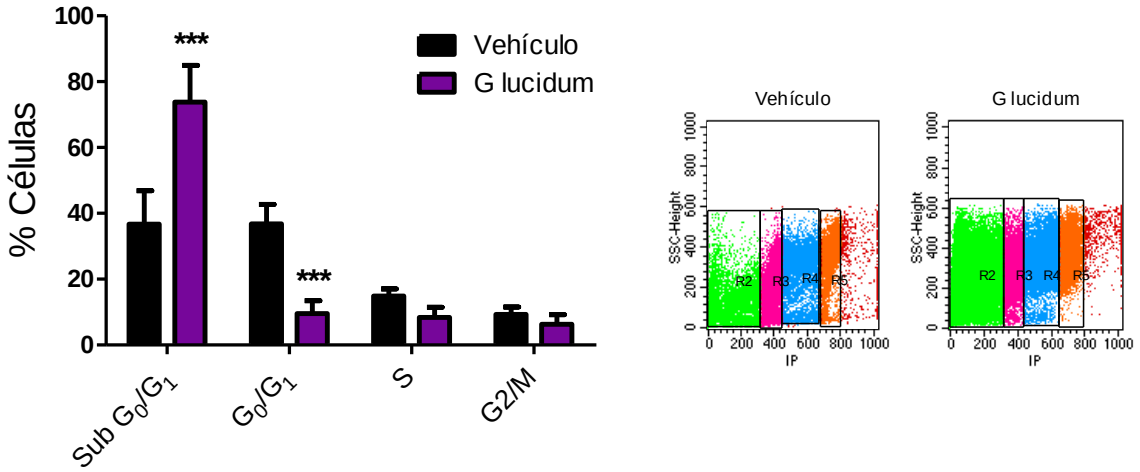


Figura 37. Análisis de ciclo celular luego de la exposición de HN12 al extracto. El histograma muestra las diferentes fases del ciclo celular. Los resultados detallan la distribución de las poblaciones de la línea celular HN12 en las distintas etapas del ciclo, luego del tratamiento con la IC_{50} del extracto de G. lucidum o vehículo durante 12 h. El ensayo se realizó por triplicado. Los resultados se analizaron mediante ANOVA (de dos vías) con posterior test de Bonferroni *** p <0.001.

Población celular	% ± SD de células adquiridas	
	Vehículo	*G. lucidum*
Sub G_0/G_1	36,67 ± 10,16	67,41 ± 1,35
G_0/G_1	36,75 ± 5,98	9,52 ± 3,96
S	14,85 ± 2,16	8,36 ± 3,12
G_2/M	9,28 ± 2,27	6,29 ± 2,92

Tabla 14. Porcentaje (± SD) de células de la línea HN12 en cada fase del ciclo celular luego del tratamiento con la IC_{50} del extracto de G. lucidum o vehículo.

Para comprobar si el incremento de la población celular en subG_0/G_1 se debía a la inducción de apoptosis, se desarrolló el ensayo de TUNEL luego del tratamiento de la línea HN12 con el extracto o el vehículo (12 h, IC_{50}). Como puede observarse en la figura 38, el tratamiento con el extracto produjo un incremento de las células TUNEL positivas con respecto al control (17,45% ± 0,93% vs 7,562% ± 1,89%; p = 0,0005).

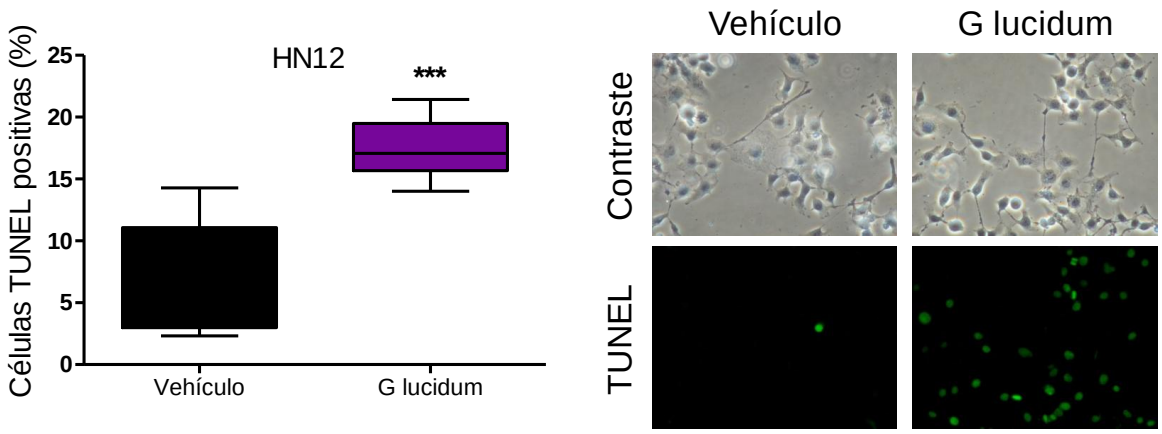


Figura 38. Análisis de apoptosis mediante ensayo de TUNEL luego de la exposición de HN12 al extracto. El gráfico muestra el porcentaje de células TUNEL positivas. Las imágenes son microfotografías representativas de células de la línea HN12 tratadas con la IC_{50} del extracto de G. lucidum o vehículo durante 12 h. Se aplicó el test de student. ***p= 0.0005.

XII- Profundización de los mecanismos de acción subyacentes al efecto del extracto triterpénico de *G. lucidum* sobre la muerte celular: análisis del potencial de membrana mitocondrial y liberación al medio de LDH

Continuamos procurando conocer más acerca del proceso de muerte que produce el extracto triterpénico del hongo. Para ello evaluamos si luego del tratamiento de la línea HN12 con el mismo se conserva o pierde el potencial de membrana mitocondrial, que nos da información acerca de la permeabilidad (y por ende la integridad) mitocondrial. Tal como señaláramos en la primera parte de la tesis, la alteración de la permeabilidad mitocondrial es uno de los dos mecanismos de activación de la via intrínseca de la apoptosis (Sola, S., et al., 2007).

Para este análisis, se realizó el tratamiento de la línea HN12 con el extracto o el vehículo (6 h, IC_{50}) y previo a la fijación, se incubó durante 30 minutos con la sonda fluorescente Mitotracker Red. Como se describió anteriormente, las mitocondrias que conservan el potencial de membrana fluorecen de color rojo brillante. Con solo 6 h de incubación con la IC_{50} del extracto alcohólico de *G. Lucidum* el potencial de membrana mitocondrial disminuyó de manera muy significativa con respecto al control (9,365 UAF ± 0,549 UAF vs 30,07 UAF ± 2,379 UAF; p = 0,0001) (figura 39).

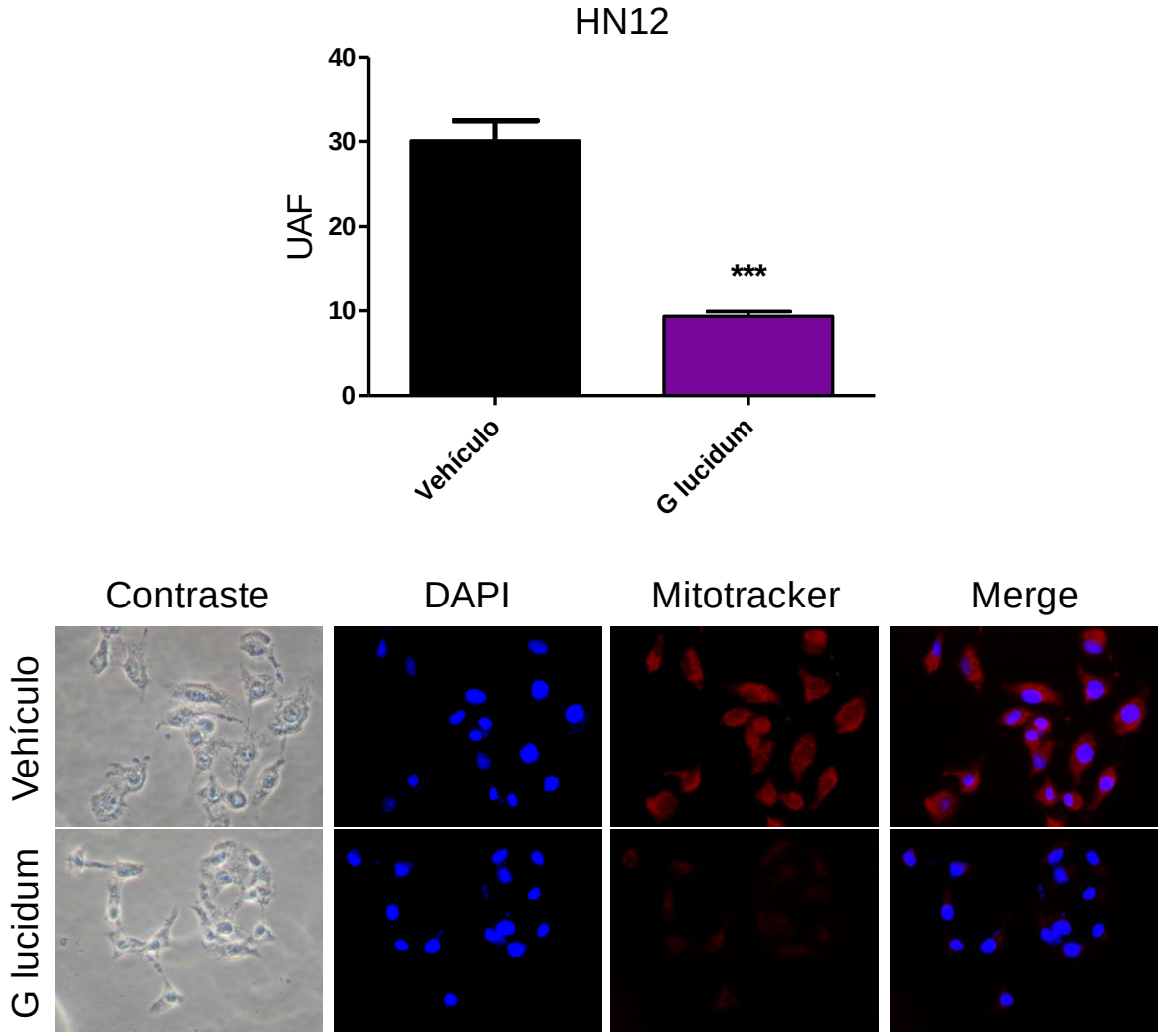


Figura 39. Evaluación del potencial de membrana mitocondrial luego del tratamiento de HN12 con el extracto. El gráfico muestra el descenso de las unidades arbitrarias de fluorescencia (medida con ImageJ) de la línea HN12 luego del tratamiento con la IC_{50} del extracto de *G. lucidum* o vehículo durante 6 h.Las imágenes son microfotografías representativas. Se aplicó el test de student. ***p < 0.0001.

Este ensayo, que nos da información acerca de si el extracto induce alteración de la permeabilidad mitocondrial, se llevó a cabo también en GBM. Utilizando la línea GL26, se observó un comportamiento similar al observado para la línea HN12. Solo 6 h de incubación con la IC_{50} del extracto alcohólico de *G. Lucidum* fueron suficientes para que el potencial de membrana mitocondrial disminuyera de manera muy significativa con respecto al control (5,00 UAF ± 0,88 UAF vs 30,58 UAF ± 1,82 UAF; p = 0,0001) (figura 40). Estos resultados nos permitirían concluir, también para esta línea, que el tratamiento con el extracto ocasiona pérdida del potencial de membrana mitocondrial.

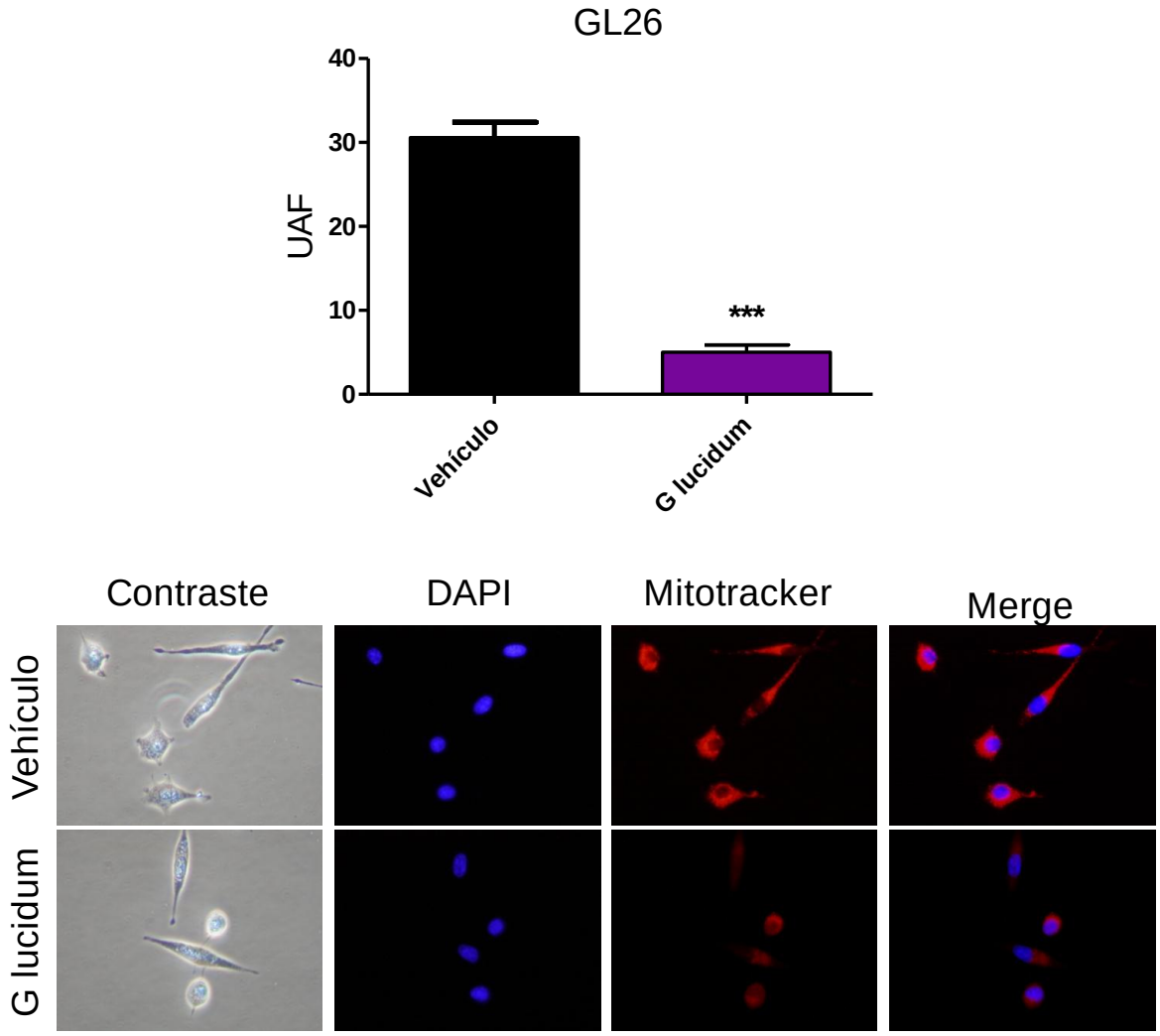


Figura 40. Evaluación del potencial de membrana mitocondrial luego del tratamiento de GL26 con el extracto. El gráfico muestra el descenso de las unidades arbitrarias de fluorescencia (medida con ImageJ) de la línea GL26 luego del tratamiento con la IC_{50} del extracto de *G. lucidum* o vehículo durante 6 h. Las imágenes son microfotografías representativas. Se aplicó el test de student. ***p < 0,0001.

A continuación, evaluamos si se producía alteración de la permeabilidad de la membrana plasmática midiendo la liberación de la enzima LDH al medio de cultivo. El aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática puede ser indicativo de activación del proceso de necrosis. En la figura 41, se observa que el extracto no indujo permeabilidad de la membrana plasmática en la línea HN12 (117,90 U/l ± 7,49 U/l vs 140,79 U/l ± 35,37 U/l; p = 0,2894). Sin embargo, sí se produjo alteración de la permeabilidad en la línea GL26 (120,92 U/l ± 12,22 U/l vs 161,07 U/l ± 9,22 U/l; p = 0,0107).

Estos resultados en su conjunto sugieren que el extracto de esporas de *Ganoderma lucidum* induce apoptosis en HN12, presumiblemente a través de la via intrínseca, y que podría inducir apoptosis y/o necrosis en GL26.

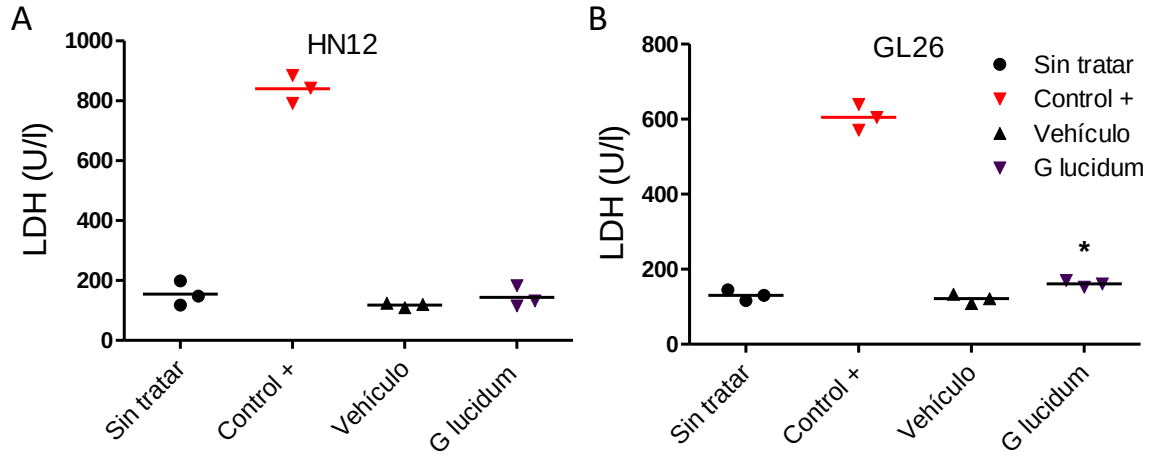


Figura 41. Permeabilidad de la membrana plasmáticaluego del tratamiento de HN12 y GL26 con el extracto. Evaluación de la liberación de LDH al medio de cultivo de la línea HN12 (A) y GL26 (B) luego del tratamiento con la IC_{50} del extracto por 12 h. El ensayo se realizó por triplicado. Se aplicó ANOVA (de dos vías) con posterior test de Bonferroni.

XIII- Análisis de la toxicidad del extracto de *Ganoderma lucidum* en la cepa CF1

Como parte de los ensayos preclínicos tendientes a investigar la potencialidad terapéutica de una droga o compuesto natural es necesario evaluar la toxicidad *in vivo* en animales. Por ello, nuestro siguiente objetivo fue evaluar la toxicidad del extracto en un ensayo piloto con ratones atímicos nude (N: NIH(S)-Fox1nu) (n = 4; dos por grupo experimental). Los ratones fueron tratados intraperitonealmente con 3 mg de triterpenoides/kg de peso corporal, día por medio, por un período total de 34 días. Se decidió comenzar el ensayo de toxicidad con la concentración de 3 mg de triterpenoides/kg de peso basados en un reporte previo, hallado en la bibliografía, que estudió los efectos tóxicos y adversos de la administración intraperitoneal de un triterpenoide aislado de *Ganoderma lucidum* (Gao, J.J., et al. 2006). Los ratones fueron observados cotidianamente para observar posibles alteraciones en el comportamiento y/o manifestaciones de dolor.

Durante el ensayo no se observaron modificaciones en el corportamiento de los animales ni se evidenciaron muestras de dolor. Tampoco se encontraron alteraciones

histopatológicas en riñón, hígado y bazo. El peso corporal de los ratones tratados con el extracto se incrementó significativamente hacia el final de la experiencia (90,18 ± 1,78 vs 101,68 ± 0,82; *p = 0,0194) (figura 42).

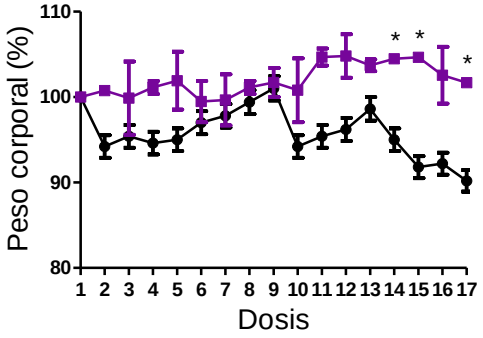


Figura 42 .Estudio piloto de toxicidad del extracto de esporas de *G. lucidum*. Evolución del peso corporal de los ratones durante el tratamiento. Se aplicó ANOVA (de dos vías) con posterior test de Bonferroni. * $p < 0,05$.

Este estudio nos indicó que el extracto no producía toxicidad a nivel histológico en los órganos estudiados y que no producía alteración en el comportamiento de los animales por lo que continuamos analizando la toxicidad del extracto en ratones machos de la cepa CF-1 a dosis mayores (10 mg triterpenoides/kg de peso) y administrado de manera intraperitoneal, día por medio, en un total de 9 dosis. Los ratones fueron observados cotidianamente para observar posibles alteraciones en el comportamiento y/o manifestaciones faciales de dolor (contracción de los músculos orbitales, aplanamiento de la parte superior de la nariz y aplanamiento de las almohadillas de los bigotes, cambios en la posición, orientación y forma de las orejas y, por último, cambios en la disposición de los bigotes) (Sotocinal, S.G., et al., 2011).

Durante todo el período de estudio (17 días), no se observaron ni alteraciones en el comportamiento ni presencia de los signos de dolor mencionados. El peso de los animales se mantuvo constante a lo largo de todo el tratamiento (figura 43 B) y los valores del hematocrito se mantuvieron dentro de los parámetros normales (figura 43 A). El peso relativo de los órganos extraídos tampoco mostró diferencias significativas entre los tratamientos. Tampoco se encontraron anormalidades en riñón, hígado y bazo a nivel histológico. En los cortes histológicos renales (figura 43 C) se observó que el parénquima conservaba la histoarquitectura y la relación córtico/medular y que los glomérulos se encontraban sin fibrosis. El intersticio no presentó alteraciones histológicas evidentes. En los cortes histológicos hepáticos (figura 43 D) se observó que el parénquima conservaba

la histoestructura, constituido por hepatocitos regulares, con nucléolos redondos y citoplasma eosinófilo pálido. Los espacios porta y la vena centro lobulillar no presentaron alteraciones histológicas evidentes. Los sinusoides no se hallaron dilatados. En los cortes histológicos esplénicos (figura 43 E) se observó el tejido con presencia de pulpa roja y pulpa blanca y megacariocitos. No se apreciaron alteraciones histológicas evidentes. Todos estos estudios indican que el extracto no produce toxicidad a nivel histológico en los órganos estudiados, ni en el peso o comportamiento de los animales.

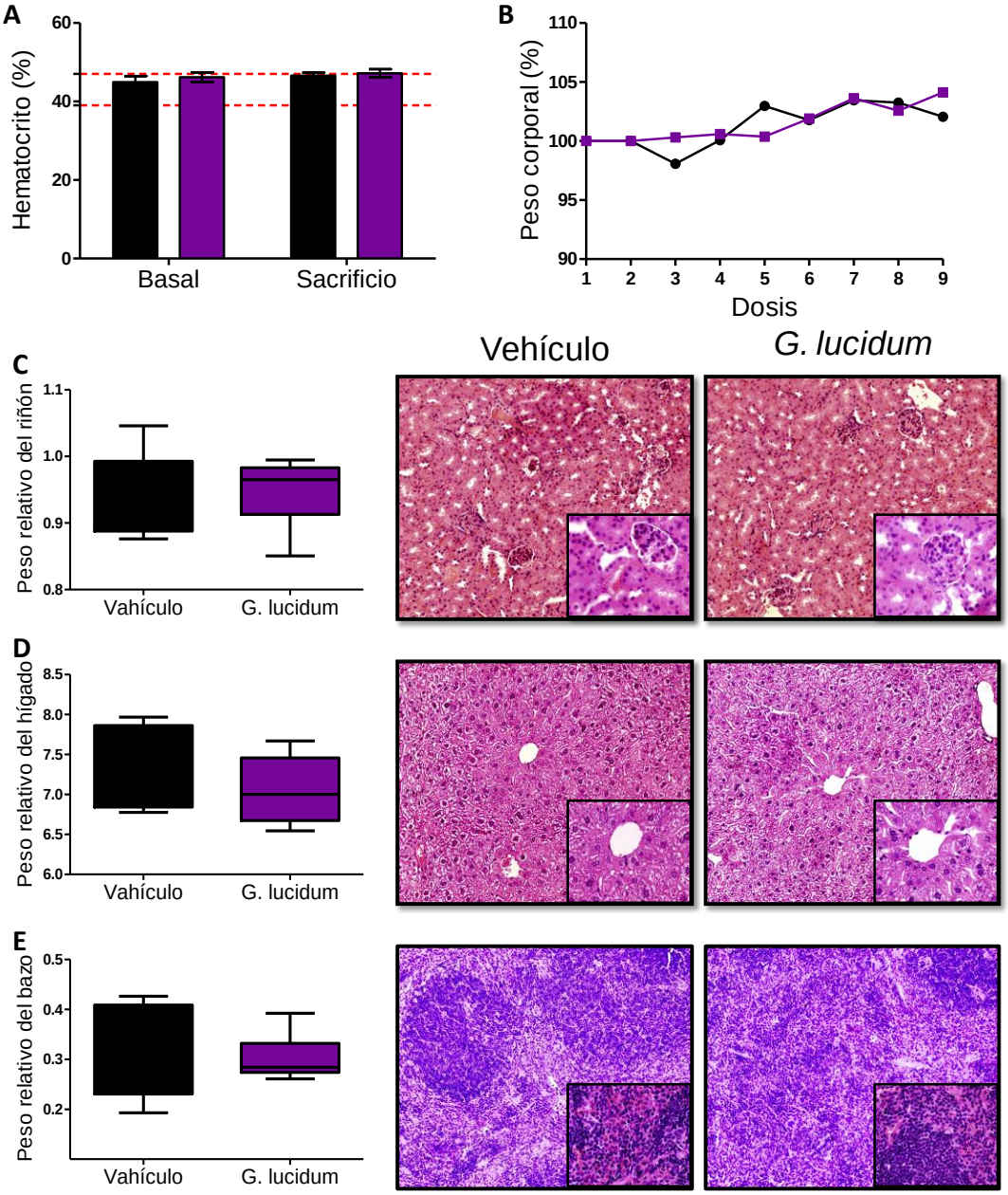


Figura 43. Estudios de toxicidad del extracto de esporas de *G. lucidum*. (A) Peso de los ratones durante el tratamiento. (B) Valores del hematocrito al comienzo y al final de la experiencia. Pesos relativos e histología del riñón (C), hígado (D) y bazo (E) de los ratones luego del tratamiento (H&E, amplificación: 100X). Los animales fueron tratados con 9 dosis de 10 mg triterpenoides/kg o de vehículo (isopropanol). En los gráficos se representa el promedio del peso, niveles hematocrito de cada grupo ± SD. Se realizó un test de Student para el análisis del hematocrito y de los pesos relativos de los órganos. Se aplicó ANOVA de dos vías para el análisis del peso corporal a lo largo del tiempo.

XIV- ¿Es el extracto de esporas de *Ganoderma lucidum* antioxidante en CCECC y GBM?

Como mencionáramos en la sección "Generalidades", Reishi ha sido empleado por milenios por los efectos medicinales que se le han adjudicado (Zhou, X., et al., 2007), entre ellos su gran capacidad antioxidante (Lee, J. M., et al., 2001) (Lin, J.M., et al., 1995) (Wang, J.F. et al., 1985), es decir de poseer la capacidad de eliminar o suprimir las especies reactivas de oxígeno (ROS). Las ROS inducen cáncer al actuar como agentes iniciadores o promotores (Cerutti, P.A. 1985) (Klaunig, J.E., et al., 1998) (Kozumbo, W.J., et al., 1985). Por lo tanto, inactivar las ROS es una estrategia interesante en la prevención y/o reducción del cáncer. Por esto nos propusimos evaluar si el extracto de *G. lucidum* era capaz de disminuir el nivel de ROS de las líneas tumorales. Para ello, tratamos a cada línea con el extracto o vehículo durante 12 h y, finalizado el tratamiento, se hizo la incubación con la sonda DCDCDHF. Luego se lisaron las células, se sonicaron y se midió la fluorescencia que se normalizó con la cantidad de proteína de cada lisado. Se utilizó el pretratamiento con N-acetil-cisteína que es un precursor de L-cisteína y de glutatión reducido y que disminuye los niveles de ROS, como control. Para nuestra sorpresa, lejos de reducir los niveles de ROS, el extracto los incrementó de manera significativa a los tiempos de tratamiento analizados (figura 44) en HN12 (127,62 señal/ug proteína ± 58,13 señal/ug proteína vs 9,50 señal/ug proteína ± 2,12 señal/ug proteína; $*p < 0,05$), HN13 (37,44 señal/ug proteína ± 1,55 señal/ug proteína vs 10,79 señal/ug proteína ± 3,28 señal/ug proteína; $*p < 0.05$) y GL26 (487,90 señal/ug proteína ± 5 señal/ug proteína vs 287,08 señal/ug proteína ± 5 señal/ug proteína; $***p< 0,001$) . Este aumento de ROS se previno cuando se realizó el pretratamiento con N-acetil-cisteína, corroborando que la fluorescencia observada era debido a ROS.

Cuando las ROS se producen en cantidades que desbalancean el potencial redox de la célula, deben ser rápidamente eliminadas de las células, lo cual se lleva a cabo por una

variedad de mecanismos antioxidantes de defensa, entre ellos la inducción de la enzima hemoxigenasa-1. Por ello evaluamos si el extracto inducía los niveles de esta potente molécula antioxidante en las líneas celulares estudiadas. Se trató a cada línea con su correspondiente IC_{50} de *Ganoderma lucidum* o vehículo por 6, 9 y 12 h y se determinaron los niveles de expresión de la proteína. Como se observa en la figura 44, las líneas de CCECC aumentaron los niveles de HO-1 ante el tratamiento con el extracto mientras que la línea de GBM no lo hizo.

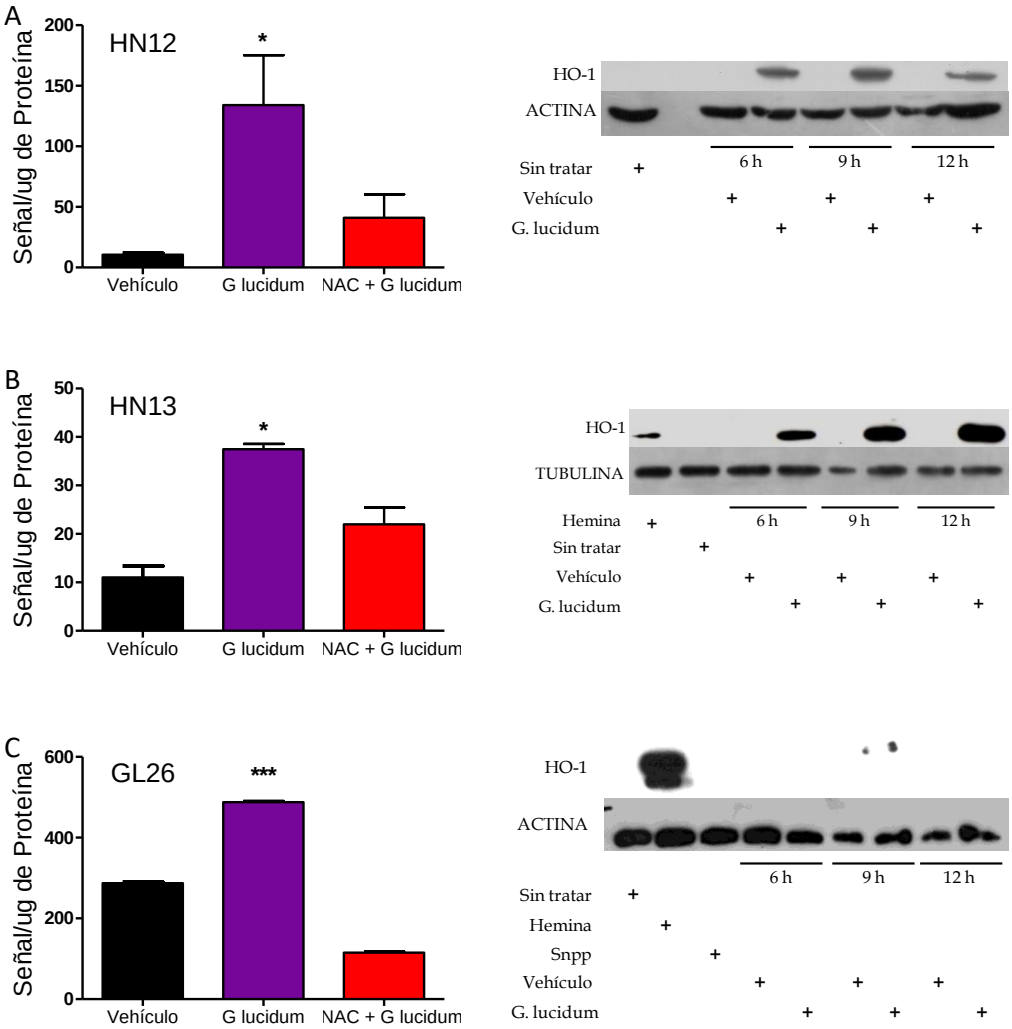


Figura 44. Determinación de las especies reactivas de oxígeno empleando la sonda DCDCDHF por espectro fluorofotometría y determinación de la expresión de HO-1 por western blot en células (A) HN12, (B) HN13 y (C) GL26. El ensayo se realizó por duplicado en dos experimentos independientes para cada línea. Se aplicó ANOVA (de una vía) con posterior test de bonferroni para la determinación estadística de las ROS, ***p< 0,001; *p < 0,05.

Dado que el aumento de ROS intracelular puede llevar a la celula a sufrir estrés oxidativo y este último puede desencadenar muerte celular (Cramer, S. L., et al., 2016) (dependiendo de las condiciones de la célula y de su entorno), estudiamos si el aumento de las ROS, producido por el tratamiento con el extracto, podía ser el causante de la disminución en la viabilidad celular observada. Para ello, realizamos el ensayo de viabilidad celular incluyendo una preincubación con el antioxidante N-acetil-cisteína. El tratamiento con el extracto produjo una disminución de la viabilidad de HN12 y GL26, tal como se esperaba por los resultados previos. Sin embargo, el pretratamiento con N-acetil-cisteína no previno la reducción de la viabilidad celular inducida por el extracto en ninguna de las dos líneas celulares (figura 45). Estos resultados sugieren que el extracto de esporas de *Ganoderma lucidum* induce un aumento de las ROS, pero que estas no son responsables de la reducción de la viabilidad celular observada.

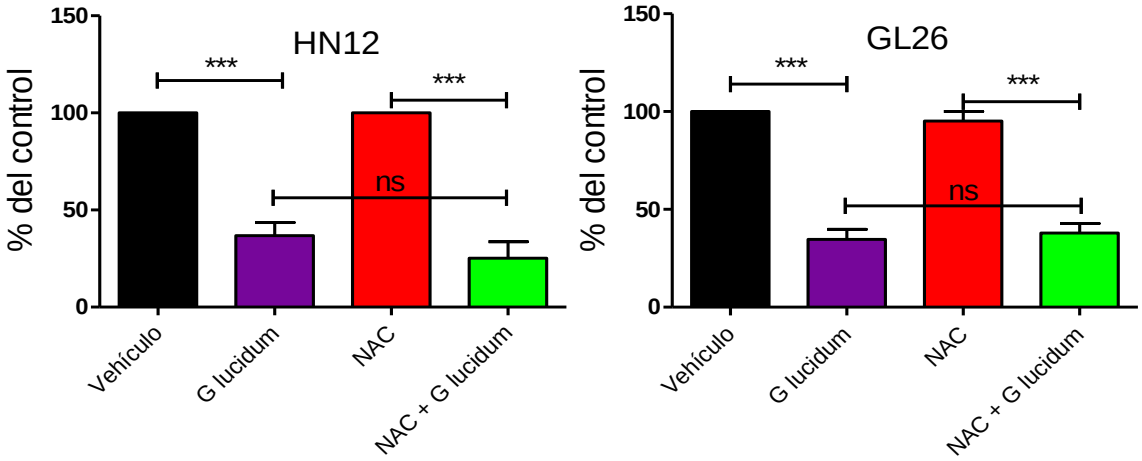


Figura 45. Participación de las ROS en los efectos del extracto sobre la viabilidad celular: pretratamiento con NAC. Las células fueron tratadas con la IC_{50} de *G. lucidum* o vehículo (isopropanol), por 12 h con y sin pretratamiento por 24 h con 10 mM de N-Acetil-cisteína (NAC). Cada punto representa el promedio de cuatro repeticiones ± SD. El ensayo fue repetido 3 veces para cada línea. Se realizó ANOVA (de una vía) con posterior test de Bonferroni, *** p<0,001. ns = no significativo.

Discusión y Conclusiones

“Hemos perdido tanto como hemos ganado al ser inquisitivos con todo”
Mark Twain

“La ausencia de prueba no es prueba de ausencia”
Carl Sagan

Tal como se describió anteriormente, los CCECC y los GBM, aunque de baja incidencia, tienen un pronóstico pobre y una alta recurrencia, de manera que es esencial encontrar nuevos agentes quimioterapéuticos que pueden ser tanto sintéticos como provenientes de la naturaleza. En relación a estos últimos, nuestro laboratorio en conjunto con el Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles y Medicinales (CERZOS-CONICET) radicado en Bahía Blanca, obtuvo un extracto isopropanólico de triterpenoides desde las esporas de *Ganoderma lucidum* con el fin de analizar su utilidad terapéutica en CCECC y GBM. El contenido de triterpenoides varía entre los diferentes lotes y esto se debe a muchas razones como el empleo de diferentes cepas de hongos y diferencias en el método de producción. En nuestro caso, se cultivó la cepa E47 de la University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada. El cultivo del hongo se efectuó sobre la base de cáscara de girasol suplementado con aceite de oliva, para mejorar el rendimiento del cultivo que tuvo una eficiencia biológica [(kg de hongo fresco / kg de sustrato seco) x 100%] del 22%.

El estudio de los potenciales efectos antitumorales de este extracto triterpénico de Reishi, comenzó con el análisis sobre la viabilidad celular, observando que poseía potentes efectos sobre la reducción de la viabilidad de las líneas HN12, HN13 y GL26. El posterior análisis de los posibles mecanismos antiproliferativos mostró que la reducción en el conteo celular de la línea HN12 se podía explicar a través de un incremento en la muerte celular (aumento de la población sub G_0/G_1). Para comenzar a investigar cuáles podían ser los mecanismos de muerte celular inducidos por el extracto, estudiamos la permeabilidad mitocondrial mediante el uso de la sonda Mitotracker y la integridad de la membrana plasmática mediante la liberación de la enzima LDH al medio de cultivo. Encontramos que el extracto produce una fuerte disminución del potencial de membrana mitocondrial en HN12 y que la integridad de la membrana plasmática no estaba comprometida. Estos resultados sugieren entonces que la muerte celular inducida por el extracto sería a través de activación de la apoptosis que involucraría a la vía mitocondrial o vía intrínseca.

De los basidiomicetes, *G. lucidum* ha mostrado ser de los más efectivos al momento de inducir arresto del ciclo celular y conducir a la apoptosis (Yuen, J., et al., 2011). Así, ha sido documentado que un extracto de *G. lucidum*, rico en triterpenoides, indujo apoptosis en la línea celular pre maligna HUP-PC (Yuen, J.W., et al., 2007). También se demostró que los triterpenos pueden inducir apoptosis en líneas celulares de cáncer humano mediante la vía dependiente de la mitocondria, seguida por la activación de la cascada de

caspasas (Liu, R.M., & Zhong, J.J. 2011) (Liu, R.M., et al., 2012). En un trabajo de revisión se ha descripto que varios subtipos de triterpenos de extractos de *G. lucidum* inducen apoptosis en líneas celulares de cáncer humano y que el efecto citotóxico puede variar en función de los diferentes triterpenos (Yuen, J.W., & Gohel, M.D.I., 2005). En un trabajo se demostró que el tratamiento con triterpenos de *G. lucidum* incrementó la relación Bax/Bcl-2 en células de cáncer humano mediante el aumento de la expresión de Bax y la disminución de Bcl-2 (Liu, R.M., & Zhong, J.J., 2011). Sin embargo, otro trabajo reportó que el ácido ganodérico T sobreexpresó a Bax, pero sin modificar la expresión de Bcl-2 (Tang, W., et al., 2006). De manera que es posible que el extracto obtenido por nuestro grupo de trabajo modifique los niveles de estas proteínas por lo que los próximos estudios preclínicos incluirán la medición de los niveles de expresión y actividad de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 y de proteínas pro apoptóticas como Bax.

Por su parte, los ensayos realizados en GL26 muestran que el extracto produce una fuerte disminución del potencial de membrana mitocondrial y que además, y a diferencia de la línea HN12, también altera la integridad de la membrana plasmática. Estos resultados sugieren que el extracto podría inducir muerte celular en la línea de GBM GL26 a través de una activación del proceso de necrosis. La necrosis ha sido originalmente considerada un proceso pasivo de la célula desencadenado por stress celular tal como calor, shock osmótico, mecánico y alta concentración de peróxido de hidrogeno; sin embargo, últimamente se ha descripto que varios estímulos celulares pueden inducir necrosis siguiendo pasos y vías de señalización determinados. Dentro de las vías de señalización que pueden ser activadas se encuentran aquellas iniciadas a través de la activación de los receptores de muerte CD95, TNFR y TRAIL (Vandenabeele, P., et al., 2010) (Vanlangenakker, N., et al., 2012). Por otro lado, ya se ha demostrado que *Ganoderma* induce necrosis en líneas celulares tumorales (Chien, R.C., et al., 2015) así como también se demostró que modula la via de TNFR (Wang, S.Y., et al., 1997). La necrosis es una característica histológica de los GBM que se utiliza para el diagnóstico de los mismos (Louis, D.N., 2006). Sin embargo, la inducción de áreas necróticas en los GBM se asocia con mal pronóstico, de manera que habría que analizar el efecto del extracto *in vivo* ya que puede inducir muerte celular en las células en cultivo, pero ser contraproducente en los tumores creciendo *in vivo*. Estos estudios del efecto del extracto en modelos animales se proponen como continuación de las investigaciones de esta tesis.

Es necesario mencionar también que la alteración de la permeabilidad de la membrana plasmática puede ser por apoptosis tardía. Sin embargo, es dificultoso discernir entre esta

última y la necrosis y sería necesario realizar adicionales ensayos para discriminar entre estas dos posibilidades (Kroemer, G., et al., 2009) (Henriquez, M., et al., 2008) (Degterev, A., & Yuan, J. 2008).

Como mencionamos anteriormente, las muertes por cáncer, en un 90%, se deben a la capacidad del tumor primario de metastatizar. La migración (junto con la adhesión celular y la invasión) son claves en esta capacidad; por lo tanto, controlar la motilidad es un mecanismo eficaz para evitar el desarrollo de metástasis del tumor primario. Los GBM no desarrollan metástasis en otros órganos pero sí son altamente infiltrativos del parénquima cerebral no maligno. Por otra parte, los CCECC sí pueden metastatizar a ganglios linfáticos regionales y a sitios distantes. Por ello analizamos si el extracto triterpénico derivado de las esporas del hongo altera la capacidad migratoria de las células bajo estudio. Pudimos observar que el extracto retardó la migración de las tres líneas ensayadas. En relación a estos resultados, se reportó que un extracto acuoso y alcohólico del hongo moduló la relación de actina F/G, lo que redujo las fibras de estrés y los complejos de adhesión focal en células de cáncer de vejiga (Lu, Q.Y., et al., 2004). Otro estudio demostró que un extracto de esporas de *Ganoderma lucidum* suprimió los cambios morfológicos inducidos por TGF-β1, los cambios en la expresión de E-cadherina y también la formación de las fibras de estrés (Li, L., et al., 2016).

Para seguir estudiando la potencial efectividad del extracto triterpénico de las esporas de *Ganoderma lucidum*, analizamos si podía existir algún efecto adverso o toxicidad que pueda limitar la aplicabilidad. De manera coincidente con la bibliografía (Smina, T.P., et al., 2011), los animales tratados con el hongo durante 17 días (ensayo de toxicidad sub-agudo) no manifestaron ni signos de dolor, ni reducción del peso ni alteraciones microscópicas en los órganos estudiados. Estos ensayos deben ser ampliados con estudios de toxicidad crónica, lo que se propone para las futuras investigaciones relacionadas con este proyecto.

Los resultados obtenidos en esta tesis sobre la viabilidad celular, migración celular y los mecanismos de muerte, en general, no nos sorprendieron ya que se encuentran dentro de lo esperado. Lo que nos sorprendió fueron los resultados obtenidos en cuanto a la generación de ROS por parte del extracto de *G. lucidum* ya que lo que mayormente se ha reportado es que el hongo reduce la producción de las mismas y que por ello posee potentes efectos antioxidantes (Li, B., et al., 2013) (Gerhäuser, C., et al., 2000) (Choi, S., et al.,2014) (Hsieh, T.C., & Wu, J.M., 2011) (Oluba, O.M., et al., 2014) (Li, C., et al., 2015). Así, por ejemplo, se ha demostrado que los triterpenos reducen la formación de ROS

intracelular y fortalecen la actividad de enzimas antioxidantes endógenas en linfocitos esplénicos irradiados protegiendo a las células del daño (Smina, T.P., et al., 2011)[b] así como también reducen la peroxidación lipídica *in vitro* (Smina, T.P., et al., 2011). El hecho de que el extracto de esporas de Ganoderrma lucidum provoque un significativo aumento de las ROS podría deberse a que las setas hayan absorbido, y concentrado en sus estructuras metales (por ejemplo, hierro, cobre o zinc), provenientes de la bio-optimización de los sustratos. Por otro lado, una exhaustiva búsqueda bibliográfica mostró la existencia de algunos trabajos en los cuales se observó un aumento de ROS por el tratamiento con hongos. Por ejemplo, Chen y col (Chen, S. Y., et al., 2016) demostraron que *Ganoderma colossum* produjo apoptosis en una línea de cáncer de pulmón a través de un aumento de ROS. En cáncer de mama, Kim y col presentaron evidencia de que un extracto de *Ganoderma lucidum* y *Polyporus umbellatus* produce apoptosis a través de un aumento de calcio intracelular y de ROS (Kim, T.H., et al., 2016) y Liu y col (Liu, R.M., et al., 2015) demostraron en la línea de cancer cervical HeLa que los ácidos ganodéricos extraidos de *Ganoderma lucidum* inducen apoptosis a través de un fuerte y rápido incremento de ROS. El aumento de ROS observado en las líneas celulares HN12 y HN13 estudiadas por nosotros se acompañó de un incremento de los niveles de HO-1, molécula inducible por diversas causas de estrés celular. Se ha reportado que la producción de altos niveles de ROS pueden inducir apoptosis o necrosis, esta última en los casos en que ocurre inhibición de la apoptosis ocasionada por diversas causas tales como virus, cáncer o ciertas características del contexto celular (Redza-Dutordoir, M., & Averill-Bates, D.A., 2016). Sin embargo, las ROS inducidas por nuestro extracto no parecen ser responsables del incremento de la muerte celular observada (ver figura 45). Es posible que los triterpenos del extracto modulen a proteínas pro-apoptóticas (Bax) y antiapoptóticas (Bcl-2) y que esto sea responsable de los efectos observados.

En conclusión, los resultados obtenidos luego del tratamiento de las células de CCECC y de GBM con el extracto triterpénico de esporas de *Ganoderma* sugieren que el mismo ejerce efectos antitumorales *in cultivo* y no posee efectos tóxicos *in vivo,* en ratones. Los efectos antineoplásicos involucran, al menos, la reducción de la capacidad migratoria y la disminución de la viabilidad celular. Este último efecto se daría a través de un aumento de muerte celular que involucra la apoptosis en el caso de los CCECC y potencialmente la necrosis en el caso del GBM. Esta inducción de muerte celular no sería secundaria al fuerte aumento de ROS que produce el extracto en las líneas celulares estudiadas. Estas investigaciones, aunque bastante preliminares dado el tiempo con el que se contaba para

el desarrollo de esta segunda parte de la tesis, deben ser continuadas con ensayos *in vivo* en modelos animales de cáncer, ya que sugieren que el extracto triterpénico aislado por nuestro grupo de trabajo tiene el potencial de ser efectivo en estos dos tipos de cáncer.

Conclusiones finales del trabajo de tesis

James Black (Premio Nobel de medicina en 1988) dijo en el año 2000 que “la mejor manera de descubrir una nueva droga era comenzar estudiando una vieja droga”. Este trabajo de tesis, siguiendo el pensamiento de este farmacólogo británico, se abocó a estudiar la factibilidad terapéutica de dos análogos del calcitriol y del extracto triterpénico de esporas de *Ganoderma lucidum*. Los primeros, aunque nuevos análogos, derivan del calcitriol, el que lleva varios años de ser estudiado en cuanto a su potencialidad antitumoral. El segundo (Ganoderma lucidum) se viene estudiando desde hace aún más tiempo. Sin embargo, los trabajos realizados analizando estos compuestos en CCECC y GBM han sido escasos. Por ello, la relevancia de este trabajo de tesis radicó en comenzar a identificar la potencial utilidad terapéutica del extracto de *Ganoderma lucidum* y de los análogos del calcitriol.

Los resultados obtenidos nos permitieron concluir que tanto el análogo AM-27 como el extracto de *Ganoderma lucidum* podrían tener alguna utilidad para el tratamiento de estos tipos de cáncer. Para poder confirmar esto se propone continuar las investigaciones del análogo AM-27 utilizando adicionales modelos animales de CCECC y GBM o variaciones con los modelos utilizados y continuar los estudios del extracto evaluando su actividad antitumoral en modelos animales (que no se pudieron realizar por falta de tiempo).

Por otra parte, si bien los resultados con el análogo ML-344, aunque carente de efecto calcemiante, no fueron positivos, estos nos permiten continuar realizando el diseño y la síntesis de análogos del calcitriol de una manera más específica ya que observamos que la posición del átomo de nitrógeno, del sustituyente amida, en el carbono 26 carece de actividad antiproliferativa para las líneas ensayadas.

Referencias

“Las únicas traducciones rigurosamente posibles son las de la ciencia, porque sus expresiones son lógicas y sus palabras unívocas. La proposición “el calor dilata los cuerpos” puede ser trasladada a cualquier idioma sin que su espíritu pierda un ápice de sentido.”Dr. E. Sabato

“Y así, del mucho leer y del poco dormir, se le secó el cerebro
de manera que vino a perder el juicio.”Miguel de Cervantes Saavedra

“If you steal from one author it's plagiarism;
if you steal from many it's research.”Wilson Mizner

- Abe, E., Miyaura C., Sakagami H., Takeda M., Konno K., Yamazaki T., Yoshiki S., Suda T. (1981). Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by 1 α, 25-dihydroxyvitamin D3. Proceedings of the National Academy of Sciences. 78:4990–4994.
- Abe, M., Akeno, N., Ohida, S., & Horiuchi, N. (1998). Inhibitory effects of 1, 25-dihydroxyvitamin D3 and 9-cis-retinoic acid on parathyroid hormone-related protein expression by oral cancer cells (HSC-3). Journal of endocrinology,156(2), 349-357.
- Abrahan, C. E., Insua, M. F., Politi, L. E., German, O. L., & Rotstein, N. P. (2009). Oxidative stress promotes proliferation and dedifferentiation of retina glial cells in vitro. Journal of neuroscience research, 87(4), 964-977.
- Adams J.S., & Hewison M. (2008). Unexpected actions of vitamin D: new perspectives on the regulation of innate and adaptive immunity. Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism. 4:80–90.
- Adams, J.S., & Hewison, M. (2012). Extrarenal expression of the 25-hydroxyvitamin D-1-hydroxylase. Archives of biochemistry and biophysics, 523(1), 95-102.
- Adamson, C., Kanu, O. O., Mehta, A. I., Di, C., Lin, N., Mattox, A. K., & Bigner, D. D. (2009). Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. Expert opinion on investigational drugs, 18(8), 1061-1083.
- Agudelo, M. E. R., & López, M. R. (2012). La necrosis, un mecanismo regulado de muerte celular. Iatreia, 23(2), 166-177
- Ahn, S. H., Park, H., Ahn, Y. H., Kim, S., Cho, M. S., Kang, J. L., & Choi, Y. H. (2016). Necrotic cells influence migration and invasion of glioblastoma via NF-κB/AP-1-mediated IL-8 regulation. Scientific reports,6
- Ajith, T. A., & Janardhanan, K. K. (2007). Indian medicinal mushrooms as a source of antioxidant and antitumor agents. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, 40(3), 157-162.
- Akutsu, N., Bastien, Y., Lin, R., Mader, S., & White, J. H. (2001). Amphiregulin is a vitamin D 3 target gene in squamous cell and breast carcinoma.Biochemical and biophysical research communications, 281(4), 1051-1056.
- Akutsu, N., Lin, R., Bastien, Y., Bestawros, A., Enepekides, D. J., Black, M. J., & White, J. H. (2001). Regulation of gene expression by 1α, 25-dihydroxyvitamin D3 and its analog EB1089 under growth-inhibitory conditions in squamous carcinoma cells. Molecular endocrinology, 15(7), 1127-1139.**b**
- Al Mheid, I., Patel, R. S., Tangpricha, V., & Quyyumi, A. A. (2013). Vitamin D and cardiovascular disease: is the evidence solid?. European heart journal, eht166.
- Allavena, P., Garlanda, C., Borrello, M. G., Sica, A., & Mantovani, A. (2008). Pathways connecting inflammation and cancer. Current opinion in genetics & development, 18(1), 3-10.
- American Association of Neuroscience Nurses Care of the adult patient with a brain tumor. 2014 Retrieved from http://www.abta.org/resources/health-care-provider/final-adult-clinical-practice.pdf
- American Cancer Society. Global Cancer Facts & Figures, 3rd Edition.Atlanta: American Cancer Society; 2015).
- Amornphimoltham, P., Patel, V., Sodhi, A., Nikitakis, N. G., Sauk, J. J., Sausville, E. A., Molinolo, A. A. & Gutkind, J. S. (2005). Mammalian target of rapamycin, a molecular target in squamous cell carcinomas of the head and neck. Cancer research, 65(21), 9953-9961.
- Aparna, R., Subhashini, J., Roy, K. R., Reddy, G. S., Robinson, M., Uskokovic, M. R., Reddy, G. V., & Reddanna, P. (2008). Selective inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) by 1α, 25-dihydroxy-16-ene-23-yne-vitamin D3, a less calcemic vitamin D analog. Journal of cellular biochemistry, 104(5), 1832-1842.
- Assi, H., Candolfi, M., Baker, G., Mineharu, Y., Lowenstein, P. R., & Castro, M. G. (2012). Gene therapy for brain tumors: basic developments and clinical implementation. Neuroscience letters, 527(2), 71-77.
- Attia, S., Eickhoff, J., Wilding, G., McNeel, D., Blank, J., Ahuja, H., Jumonville, A., Eastman, M., Shevrin, D., Glode, M., Alberti, D., Staab, M. J., Horvath, D., Straus, J., Marnocha R., & Liu, G. (2008). Randomized, double-blinded phase II evaluation of docetaxel with or without doxercalciferol in patients with metastatic, androgen-independent prostate cancer. Clinical Cancer Research, 14(8), 2437-2443.
- Ausman, J. I., Shapiro, W. R., & Rall, D. P. (1970). Studies on the chemotherapy of experimental brain tumors: development of an experimental model. Cancer research, 30(9), 2394-2400.
- Bak, D. H., Kang, S. H., Choi, D. R., Gil, M. N., Yu, K. S., Jeong, J. H., Lee, N. S., Lee, J. H., Jeong, Y. G., Kim, D. K., Kim, D. K., Kim, J. J., & Han S. Y., (2016). Autophagy enhancement contributes to the synergistic effect of vitamin D in temozolomide based glioblastoma chemotherapy.Experimental and Therapeutic Medicine, 11(6), 2153-2162.

- Bao, B. Y., Yao, J., & Lee, Y. F. (2006). 1α, 25-dihydroxyvitamin D3 suppresses interleukin-8-mediated prostate cancer cell angiogenesis.Carcinogenesis, 27(9), 1883-1893.
- Bao, B. Y., Yeh, S. D., & Lee, Y. F. (2005). 1α, 25-dihydroxyvitamin D3 inhibits prostate cancer cell invasion via modulation of selective proteases.Carcinogenesis, 27(1), 32-42.
- Batchelor, T. T., Duda, D. G., di Tomaso, E., Ancukiewicz, M., Plotkin, S. R., Gerstner, E., Eichler, A. F., Drappatz, J., Hochberg, F. H., Benner, T., Louis, D. N., Cohen, K. S., Chea, H., Exarhopoulos, A., Loeffler, J. S., Moses, M. A., Ivy, P., Sorensen, A. G., Wen, P. Y., & Jain, R. K. (2010). Phase II study of cediranib, an oral pan–vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with recurrent glioblastoma. Journal of Clinical Oncology, 28, 2817–2823.
- Baudet, C., Chevalier, G., Chassevent, A., Canova, C., Filmon, R., Larra, F., Brachet, P., & Wion, D. (1996). 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 induces programmed cell death in a rat glioma cell line. Journal of neuroscience research, 46(5), 540-550. **(b)**
- Baudet, C., Chevalier, G., Naveilhan, P., Binderup, L., Brachet, P., & Wion, D. (1996). Cytotoxic effects of 1α, 25-dihydroxyvitamin D 3 and synthetic vitamin D 3 analogues on a glioma cell line. Cancer letters, 100(1), 3-10.
- Beer T.M., Myrthue A. (2004). Calcitriol in cancer treatment: From the lab to the clinic. Molecular Cancer Therapeutics. 3:373-381.
- Bektas, M., Orfanos, C. E., & Geilen, C. C. (2000). Different vitamin D analogues induce sphingomyelin hydrolysis and apoptosis in the human keratinocyte cell line HaCaT. Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France), 46(1), 111-119.
- Bendik, I., Friedel, A., Roos, F. F., Weber, P., & Eggersdorfer, M. (2014). Vitamin D: a critical and essential micronutrient for human health. Genome-wide view on the physiology of vitamin D, 83.
- Ben-Shoshan, M., Amir, S., Dang, D. T., Dang, L. H., Weisman, Y., & Mabjeesh, N. J. (2007). 1α, 25-dihydroxyvitamin D3 (Calcitriol) inhibits hypoxia-inducible factor-1/vascular endothelial growth factor pathway in human cancer cells. Molecular Cancer Therapeutics, 6(4), 1433-1439.
- Bernardi, R. J., Johnson, C. S., Modzelewski, R. A., & Trump, D. L. (2002). Antiproliferative effects of 1α, 25-dihydroxyvitamin D3 and vitamin D analogs on tumor-derived endothelial cells. Endocrinology, 143(7), 2508-2514.
- Bernardi, R. J., Trump, D. L., Yu, W. D., McGuire, T. F., Hershberger, P. A., & Johnson, C. S. (2001). Combination of 1α, 25-dihydroxyvitamin D3 with dexamethasone enhances cell cycle arrest and apoptosis role of nuclear receptor cross-talk and Erk/Akt signaling. Clinical cancer research, 7(12), 4164-4173.
- Bidegain, M. A., Cubitto, M. A., & Curvetto, N. R. (2015). Optimization of the Yield of Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom, *Ganoderma lucidum* (Higher Basidiomycetes), Cultivated on a Sunflower Seed Hull Substrate Produced in Argentina: Effect of Olive Oil and Copper. International journal of medicinal mushrooms, 17(11)
- Blutt, S. E., McDonnell, T. J., Polek, T. C., & Weigel, N. L. (2000). Calcitriol-Induced Apoptosis in LNCaP Cells Is Blocked By Overexpression of Bcl-2 1.Endocrinology, 141(1), 10-17.
- Boa, E. R. (2004). Wild edible fungi: a global overview of their use and importance to people (No. 17). Food & Agriculture Org..
- Boh, B. (2013). *Ganoderma lucidum*: a potential for biotechnological production of anti-cancer and immunomodulatory drugs. Recent patents on anti-cancer drug discovery, 8(3), 255-287.
- Bothwell, K. D., Shaurova, T., Merzianu, M., Suresh, A., Kuriakose, M. A., Johnson, C. S., Hershberger, P. A., & Seshadri, M. (2015). Impact of Short-term 1, 25-dihydroxyvitamin D3 on the Chemopreventive Efficacy of Erlotinib against Oral Cancer. Cancer Prevention Research, 8(9), 765-776.
- Bouillon R., Eelen G., Verlinden L., Mathieu C., Carmeliet G., Verstuyf A. (2006). Vitamin D and Cancer. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 102:156-162.
- Bouillon, R., Carmeliet, G., Verlinden, L., van Etten, E., Verstuyf, A., Luderer, H. F., Lieben, L., Mathieu, C., & Demay, M. (2008). Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. Endocrine reviews, 29(6), 726-776.
- Bouillon, R., Okamura, W. H., & Norman, A. W. (1995). Structure-Function Relationships in the Vitamin D Endocrine System*. Endocrine reviews, 16(2), 200-257.
- Brandes, A. A., Stupp, R., Hau, P., Lacombe, D., Gorlia, T., Tosoni, A., Mirimanoff, R. O., Kros, J. M., & van den Bent, M. J. (2010). EORTC study 26041-22041: phase I/II study on concomitant and adjuvant temozolomide (TMZ) and radiotherapy (RT) with PTK787/ZK222584 (PTK/ZK) in newly diagnosed glioblastoma. European Journal of Cancer, 46(2), 348-354.
- Bristol, M. L., Di, X., Beckman, M. J., Wilson, E. N., Henderson, S. C., Maiti, A., Fan, Z. & Gewirtz, D. A. (2012). Dual functions of autophagy in the response of breast tumor cells to radiation: Cytoprotective autophagy with radiation alone and cytotoxic autophagy in radiosensitization by vitamin D3. Autophagy, 8(5), 739-753.

- Brizuela, M. A., García, L., Pérez, L., & Mansur, M. (1998). Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. Rev Iberoam Micol, 15, 69-74.
- Brown, A. J., & Coyne, D. W. (2012). Bioavailable vitamin D in chronic kidney disease. Kidney international, 82(1), 5-7.
- Brüggemann L.W., Queiroz K.C., Zamani K., van Straaten A., Spek C.A., Bijlsma M.F. (2010). Assessing the efficacy of the hedgehog pathway inhibitor vitamin D3 in a murine xenograft model for pancreatic cancer. Cancer Biology & Therapy. 10(1):79-88.
- Campbell M.J., Elstner E., Holden S., Uskokovic M., Koeffler H.P. (1997). Inhibition of proliferation of prostate cancer cells by a 19-nor-hexafluoride vitamin D3 analogue involves the induction of p21waf1, p27kip1 and E-cadherin. Journal of Molecular Endocrinology. 19:15-27.
- Campbell, F. C., Xu, H., El-Tanani, M., Crowe, P., & Bingham, V. (2010). The yin and yang of vitamin D receptor (VDR) signaling in neoplastic progression: operational networks and tissue-specific growth control. Biochemical pharmacology, 79(1), 1-9.
- Cardemil, F. (2014). Epidemiología del carcinoma escamoso de cabeza y cuello. Revista chilena de cirugía, 66(6), 614-620.
- Carlberg, C. (2003). Molecular basis of the selective activity of vitamin D analogues. Journal of cellular biochemistry, 88(2), 274-281.
- Carlberg, C., & Mouriño, A. (2003). New vitamin D receptor ligands. Expert opinion on therapeutic patents, 13(6), 761-772.
- Carlberg, C., Molnár, F., & Mouriño, A. (2012). Vitamin D receptor ligands: the impact of crystal structures. Expert opinion on therapeutic patents, 22(4), 417-435.
- Catz, S.D., & Johnson, J.L. (2001). Transcriptional regulation of bcl-2 by nuclear factor κB and its significance in prostate cancer. Oncogene 20:7342–51.
- Cavallaro, U., Schaffhauser, B., & Christofori, G. (2002). Cadherins and the tumour progression: is it all in a switch?. Cancer letters, 176(2), 123-128.
- Cerutti, P. A. (1985). Prooxidant states and tumor promotion. Science,227(4685), 375-381.
- Chaffer, C. L., & Weinberg, R. A. (2015). How does multistep tumorigenesis really proceed?. Cancer discovery, 5(1), 22-24.
- Chakravarti, A., Wang, M., Robins, H. I., Lautenschlaeger, T., Curran, W. J., Brachman, D. G., ... & Gustavson, M. (2013). RTOG 0211: a phase 1/2 study of radiation therapy with concurrent gefitinib for newly diagnosed glioblastoma patients. International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics, 85(5), 1206-1211.
- Chang, S. M., Wen, P., Cloughesy, T., Greenberg, H., Schiff, D., Conrad, C., Fink, K., Robins, H. I., De Angelis, L., Raizer, J., Hess, K., Aldape, K., Lamborn, K. R., Kuhn, J., Dancey, J.,& Prados, M. D. (2005). Phase II study of CCI-779 in patients with recurrent glioblastoma multiforme. Investigational new drugs, 23(4), 357-361.
- Chatterjee, S., Biswas, G., Basu, S. K., & Acharya, K. (2011). Antineoplastic effect of mushrooms: a review. Australian Journal of Crop Science, 5(7), 904.
- Chaudhry, N. S., Shah, A. H., Ferraro, N., Snelling, B. M., Bregy, A., Madhavan, K., & Komotar, R. J. (2013). Predictors of long-term survival in patients with glioblastoma multiforme: advancements from the last quarter century. Cancer investigation, 31(5), 287-308.
- Chen, C., Li, P., Li, Y., Yao, G., & Xu, J. H. (2016). Antitumor effects and mechanisms of *Ganoderma* extracts and spores oil. Oncology Letters, 12(5), 3571-3578
- Chen, N. H., Liu, J. W., & Zhong, J. J. (2008). Ganoderic acid Me inhibits tumor invasion through down-regulating matrix metalloproteinases 2/9 gene expression. Journal of pharmacological sciences, 108(2), 212-216.
- Chen, N. H., Liu, J. W., & Zhong, J. J. (2010). Ganoderic acid T inhibits tumor invasion in vitro and *in vivo* through inhibition of MMP expression. Pharmacological Reports, 62(1), 150-163.
- Chen, S. Y., Chang, C. L., Chen, T. H., Chang, Y. W., & Lin, S. B. (2016). Colossolactone H, a new *Ganoderma* triterpenoid exhibits cytotoxicity and potentiates drug efficacy of gefitinib in lung cancer. Fitoterapia, 114, 81-91
- Chen, T. C., & Holick, M. F. (2003). Vitamin D and prostate cancer prevention and treatment. Trends in Endocrinology & Metabolism, 14(9), 423-430.
- Chen, Y., Liu, W., Sun, T., Huang, Y., Wang, Y., Deb, D. K., Yoon, D., Kong, J., Thadhani, R., & Li, Y. C. (2013). 1, 25-Dihydroxyvitamin D promotes negative feedback regulation of TLR signaling via targeting MicroRNA-155–SOCS1 in macrophages. The Journal of Immunology, 190(7), 3687-3695.
- Chiang, K. C., & C Chen, T. (2013). The anti-cancer actions of vitamin D. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents), 13(1), 126-139.
- Chiang, K. C., Chen, S. C., Yeh, C. N., Pang, J. H. S., Shen, S. C., Hsu, J. T., Liu, Y. Y., Li-Wei Chen, L. W., Kuo, S. F., Takano, M., Kittaka, A., Sun, C. C., Juang, H. H., & Chen, T. C. (2014). MART-10, a

less calcemic vitamin D analog, is more potent than 1α, 25-dihydroxyvitamin D 3 in inhibiting the metastatic potential of MCF-7 breast cancer cells in vitro. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 139, 54-60.

- Chiang, K. C., Yeh, C. N., Hsu, J. T., Chen, L. W., Kuo, S. F., Sun, C. C., Huang, C. .C, Pang, J. H. S., Flanagan, J. N., Takano, M., Kittaka, A., Juang, H. H., Yang, S. W., & Chen, T. C. (2013). MART-10, a novel vitamin D analog, inhibits head and neck squamous carcinoma cells growth through cell cycle arrest at G 0/G 1 with upregulation of p21 and p27 and downregulation of telomerase. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 138, 427-434.
- Chiang, K. C., Yeh, C. N., Hsu, J. T., Jan, Y. Y., Chen, L. W., Kuo, S. F., Takano, M., Kittaka, A., Chen, T. C., Chen, W. T., Pang, J. H. S., Yeh, T. S., & Juang, H. H. (2014). The vitamin D analog, MART-10, represses metastasis potential via downregulation of epithelial–mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. Cancer letters, 354(2), 235-244. **(b)**
- Chien, R. C., Tsai, S. Y., Lai, E. Y. C., & Mau, J. L. (2015). Antiproliferative Activities of Hot Water Extracts from Culinary-Medicinal Mushrooms, *Ganoderma tsugae* and *Agrocybe cylindracea* (Higher Basidiomycetes) on Cancer Cells. International journal of medicinal mushrooms, 17(5
- Choi, S., Nguyen, V. T., Tae, N., Lee, S., Ryoo, S., Min, B. S., & Lee, J. H. (2014). Anti-inflammatory and heme oxygenase-1 inducing activities of lanostane triterpenes isolated from mushroom *Ganoderma lucidum* in RAW264. 7 cells. Toxicology and applied pharmacology, 280(3), 434-442.
- Chowdhury, R., Kunutsor, S., Vitezova, A., Oliver-Williams, C., Chowdhury, S., Kiefte-de-Jong, J. C., Khan, H., Baena, C. P., Prabhakaran, D., Hoshen, M. B., Feldman, B. S., Pan, A., Johnson, L., Crowe, F., Hu, F. B., & Franco, O. H. (2014). Vitamin D and risk of cause specific death: systematic review and meta-analysis of observational cohort and randomised intervention studies.
- Cloughesy, T. F., Wen, P. Y., Robins, H. I., Chang, S. M., Groves, M. D., Fink, K. L., Junck, L., Schiff, D., Abrey, L., Gilbert, M. R., Lieberman, F., Kuhn, J., DeAngelis, L. M., Mehta, M., Raizer, J. J., Yung, W. K. A., Aldape, K., Wright, J., Lamborn, K. R., & Prados, M. D. (2006). Phase II trial of tipifarnib in patients with recurrent malignant glioma either receiving or not receiving enzyme-inducing antiepileptic drugs: a North American Brain Tumor Consortium Study. Journal of Clinical Oncology, 24(22), 3651-3656.
- Cobbina, S. J., Chen, Y., Zhou, Z., Wu, X., Zhao, T., Zhang, Z., Feng, W., Wang, W., Li, Q., Wu, X. & Yang, L. (2015). Toxicity assessment due to sub-chronic exposure to individual and mixtures of four toxic heavy metals. Journal of hazardous materials, 294, 109-120.
- Coffman, F. D., & Studzinski, G. P. (1999). Differentiation-related mechanisms which suppress DNA replication. Experimental cell research, 248(1), 58-73.
- Cohen-Lahav, M., Shany, S., Tobvin, D., Chaimovitz, C., & Douvdevani, A. (2006). Vitamin D decreases NFκB activity by increasing IκBα levels.Nephrology Dialysis Transplantation, 21(4), 889-897.
- Collins, E. D., Bishop, J. E., Bula, C. M., Acevedo, A., Okamura, W. H., & Norman, A. W. (2005). Effect of 25-hydroxyl group orientation on biological activity and binding to the 1α, 25-dihydroxy vitamin D 3 receptor. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 94(4), 279-288.
- Colonese, F., Laganà, A. S., Colonese, E., Sofo, V., Salmeri, F. M., Granese, R., & Triolo, O. (2015). The pleiotropic effects of vitamin D in gynaecological and obstetric diseases: an overview on a hot topic. BioMed research international.
- Colston, K. W.& Hansen, M. (2001). Mechanisms implicated in the growth regulatory effects of vitamin D in breast cancer. Endocrine-Related Cancer. 9:45–59.
- Colston, K., Colston, M.J., Feldman D. (1981). 1α, 25-dihydroxyvitamin D3 and malignant melanoma: the presence of receptors and inhibition of cell growth in culture. Endocrinology. 108(3):1083-1086.
- Corcelle, E. A., Puustinen, P., & Jäättelä, M. (2009). Apoptosis and autophagy: Targeting autophagy signalling in cancer cells–'trick or treats'?. Febs Journal,276(21), 6084-6096.
- Cramer, S. L., Saha, A., Liu, J., Tadi, S., Tiziani, S., Yan, W., ... & Zhang, Y. J. (2016). Systemic depletion of L-cyst (e) ine with cyst (e) inase increases reactive oxygen species and suppresses tumor growth. Nature Medicine.
- Cross, H.S., Kállay E. (2005). Nutritional regulation of extrarenal vitamin D hydroxylase expression - potential application in tumor prevention and therapy. Future Oncology. 1(3):415-424.
- Dalhoff, K., Dancey, J., Astrup, L., Skovsgaard, T., Hamberg, K. J., Lofts, F. J., Rosmorduc, O., Erlinger, S., Hansen, J. B., Steward, W. P., Skov, T., Burcharth F., & Evans, T. R. J. (2003). A phase II study of the vitamin D analogue Seocalcitol in patients with inoperable hepatocellular carcinoma. British journal of cancer,89(2), 252-257.
- De Angelis, L.M. (2001). Brain Tumors. N Engl J Med, Vol. 344, No. 2
- de Boland, A. R., & Boland, R. L. (1993). 1, 25-Dihydroxyvitamin D-3 induces arachidonate mobilization in embryonic chick myoblasts. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 1179(1), 98-104.

- de Groot, J. F., Lamborn, K. R., Chang, S. M., Gilbert, M. R., Cloughesy, T. F., Aldape, K., Yao, J., Jackson, E. F., Lieberman, F., Robins, H. I., Mehta, M. P., Lassman, A. B., DeAngelis, I. M., Yung, W. K. A., Chen, A., Prados, M. D., & Wen, P. Y. (2011). Phase II study of aflibercept in recurrent malignant glioma: a North American Brain Tumor Consortium study. Journal of Clinical Oncology, 29(19), 2689-2695.
- Deeb, K.K., Trump D.L., Johnson C.S. (2007). Vitamin D signaling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. Nature Reviews Cancer. 7:684–700.
- Degterev, A., & Yuan, J. (2008). Expansion and evolution of cell death programmes. Nature reviews Molecular cell biology, 9(5), 378-390.
- Del Valle, H. B., Yaktine, A. L., Taylor, C. L., & Ross, A. C. (Eds.). (2011).Dietary reference intakes for calcium and vitamin D. National Academies Press.
- DeLuca, H. F., & Plum, L. A. (2016). Chapter Seven-Analogs of 1α, 25-Dihydroxyvitamin D 3 in Clinical Use. Vitamins & Hormones, 100, 151-164.
- Demetriou, S. K., Ona-Vu, K., Teichert, A. E., Cleaver, J. E., Bikle, D. D., & Oh, D. H. (2012). Vitamin D receptor mediates DNA repair and is UV-inducible in intact epidermis but not cultured keratinocytes. The Journal of investigative dermatology, 132(8), 2097.
- Demirci, U., Tufan, G., Aktas, B., Balakan, O., Alacacioglu, A., Dane, F., Engin, H., Kaplan, M. A., Gunaydin, Y., Ozdemir, N. Y.,Unek, I. T., Karaca, H., Akman, T., Sonmez, O. U., Coskun, U., Harputluoglu, H., Sevinc, A., Tonyali, O., Buyukberber, S., & Benekli, M. (2013). Bevacizumab plus irinotecan in recurrent or progressive malign glioma: a multicenter study of the Anatolian Society of Medical Oncology (ASMO). Journal of cancer research and clinical oncology, 139(5), 829-835.
- Demuth, T., & Berens, M.E. (2004) Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. Journal of Neurooncology. 70 (2):217–228.
- Desjardins, A., Reardon, D. A., Peters, K. B., Threatt, S., Coan, A. D., Herndon II, J. E., Friedman, A. H., Friedman, H. S., & Vredenburgh, J. J. (2011). A phase I trial of the farnesyl transferase inhibitor, SCH 66336, with temozolomide for patients with malignant glioma. Journal of neuro-oncology, 105(3), 601-606.
- Diaz G.D., Paraskeva C., Thomas M.G., Binderup L., Hague A. 2000. Apoptosis is induced by the active metabolite of vitamin D3 and its analogue EB1089 in colorectal adenoma and carcinoma cells: possible implications for prevention and therapy. Cancer Research. 60:2304–2312.
- Dixon, K. M., Deo, S. S., Wong, G., Slater, M., Norman, A. W., Bishop, J. E., Posner, G.H., Ishizuka, S., Halliday, G.M., Reeve V.E.,& Mason, R. S. (2005). Skin cancer prevention: a possible role of 1, 25dihydroxyvitamin D3 and its analogs. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 97(1), 137-143.
- Doçi, C. L., Mikelis, C. M., Lionakis, M. S., Molinolo, A. A., & Gutkind, J. S. (2015). Genetic identification of SEMA3F as an antilymphangiogenic metastasis suppressor gene in head and neck squamous carcinoma. Cancer research, 75(14), 2937-2948.
- Dudhgaonkar, S., Thyagarajan, A., & Sliva, D. (2009). Suppression of the inflammatory response by triterpenes isolated from the mushroom *Ganoderma lucidum*. International immunopharmacology, 9(11), 1272-1280.
- Eisman J.A., Barkla D.H., Tutton P.J. (1987). Suppression of *in vivo* growth of human cancer solid tumor xenografts by 1,25-dihydroxyvitamin D3. Cancer Research. 47(1):21-25.
- Ellison, D., Love, S., Chimelli, L. (2013) Astrocytic neoplasms: In: Neuropathology of reference text of CNS pathology. 3rd ed. Elsevier 711.
- Evans, T. R. J., Colston, K. W., Lofts, F. J., Cunningham, D., Anthoney, D. A., Gogas, H., de Bono, J. S., Hamberg, K. J., Skov, T., & Mansi, J. L. (2002). A phase II trial of the vitamin D analogue Seocalcitol (EB1089) in patients with inoperable pancreatic cancer. British journal of cancer, 86(5), 680-685.
- Fall, Y., Vitale, C., & Mouriño, A. (2000). An efficient synthesis of the 25-hydroxy Windaus–Grundmann ketone. Tetrahedron Letters, 41(38), 7337-7340.
- Feldman D., Malloy P.J., Krishnan A.V., Balint E. (2008). Vitamin D: biology, action, and clinical implications. In Osteoporosis, ed. R. Marcus, D. Feldman, D.A. Nelson, C.J. Rosen, pp. 317–82. SanDiego: Academic. 3rd ed.
- Feldman, D., Krishnan, A. V., Swami, S., Giovannucci, E., & Feldman, B. J. (2014). The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. Nature reviews cancer, 14(5), 342-357.
- Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., & Parkin, D. M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008.International journal of cancer, 127(12), 2893-2917.
- Ferreira, I. C., Heleno, S. A., Reis, F. S., Stojkovic, D., Queiroz, M. J. R., Vasconcelos, M. H., & Sokovic, M. (2015). Chemical features of *Ganoderma* polysaccharides with antioxidant, antitumor and antimicrobial activities. Phytochemistry, 114, 38-55.

- Ferronato, M. J., Obiol, D. J., Fermento, M. E., Gandini, N. A., Alonso, E. N., Salomón, D. G., Vitale, C., Mascaró, E., Fall, Y., Raimondid, A. R., Curino, A. C., & Facchinetti, M. M. (2015). The alkynylphosphonate analogue of calcitriol EM1 has potent anti-metastatic effects in breast cancer. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 154, 285-293. (a)
- Ferronato, M. J., Salomón, D. G., Fermento, M. E., Gandini, N. A., López Romero, A., Rivadulla, M. L., Pérez-García, X., Gómez, G., Pérez, 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. (b)
- Flanagan, L., Packman, K., Juba, B., O'Neill, S., Tenniswood, M., & Welsh, J. (2003). Efficacy of Vitamin D compounds to modulate estrogen receptor negative breast cancer growth and invasion. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 84(2), 181-192.
- Fleet, J. C., Desmet, M., Johnson, R., & Li, Y. (2012). Vitamin D and cancer: a review of molecular mechanisms. Biochemical Journal, 441(1), 61-76.
- Fleet, J.C. (2008) Molecular actions of vitamin D contributing to cancer prevention. Molecular Aspects of Medicine. 29:388–396.
- Folkman, J.,(1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. Nature Medicine. 1:27–31.
- Fortin Ensign, S.P., Mathews I.T., Symons M.H., Berens M.E., Tran N.L. (2013).Implications of Rho GTPase Signaling in Glioma Cell Invasion and Tumor Progression.Frontiers in Oncology. 3:241.
- Franceschi, E., Cavallo, G., Lonardi, S., Magrini, E., Tosoni, A., Grosso, D., Scopece, L., Blatt, V., Urbini, B., Pession, A., Tallini, G., Crinò L., & Brandes, A. A. (2007). Gefitinib in patients with progressive high-grade gliomas: a multicentre phase II study by Gruppo Italiano Cooperativo di Neuro-Oncologia (GICNO). British Journal of Cancer, 96(7), 1047-1051.
- Franceschi, E., Stupp, R., van den Bent, M. J., van Herpen, C., Donadey, F. L., Gorlia, T., Hegi, M., Lhermitte, B., Strauss, L. C., Allgeier, A., Lacombe, D., & Brandes, A. A. (2012). EORTC 26083 phase I/II trial of dasatinib in combination with CCNU in patients with recurrent glioblastoma. Neuro-oncology, 14(12), 1503-1510.
- Fred.3.0.0, OpenEye Scientific Software SF, NM http://www.eyesopen.com.
- Freedman L.P. (1999). Increasing the complexity of coactivation in nuclear receptor signaling. Cell. 97(1):5-8.
- Friedrichs, K., Ruiz, P., Franke, F., Gille, I., Terpe, H. J., & Imhof, B. A. (1995). High expression level of α6 integrin in human breast carcinoma is correlated with reduced survival. Cancer Research, 55(4), 901-906.
- Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Rob, M. A.; Cheeseman, J. R. et al. 2003, Gaussian 03.
- Furnari, F. B., Fenton, T., Bachoo, R. M., Mukasa, A., Stommel, J. M., Stegh, A., Hahn, W.C., Ligon, K.L., Louis, D.N., Brennan, C. Chin, L., DePinho, R.A., & Cavenee, W.K. (2007). Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. Genes & development, 21(21), 2683-2710.
- Galanis, E., Buckner, J. C., Maurer, M. J., Kreisberg, J. I., Ballman, K., Boni, J., Peralba, J. M., Jenkins, R. B., Dakhil, S. R., Morton, R. F., Jaeckle, K. A., Scheithauer, B. W., Dancey, J., Hidalgo, M., & Walsh, D. J. (2005). Phase II trial of temsirolimus (CCI-779) in recurrent glioblastoma multiforme: a North Central Cancer Treatment Group Study. Journal of Clinical Oncology, 23(23), 5294-5304.
- Gao, J. J., Hirakawa, A., Min, B. S., Nakamura, N., & Hattori, M. (2006). *In vivo* antitumor effects of bitter principles from the antlered form of fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. Journal of natural medicines, 60(1), 42-48.
- García-Quiroz, J., Rivas-Suárez, M., García-Becerra, R., Barrera, D., Martínez-Reza, I., Ordaz-Rosado, D., Santos-Martinez, N., Villanueva, O., Santos-Cuevas, C. L., Avila, E., Gamboa-Domínguez, A., Halhali, A., Larrea, F., & Díaz, L. (2014). Calcitriol reduces thrombospondin-1 and increases vascular endothelial growth factor in breast cancer cells: Implications for tumor angiogenesis. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 144, 215-222.
- Gardezi, S. A., Nguyen, C., Malloy, P. J., Posner, G. H., Feldman, D., & Peleg, S. (2001). A rationale for treatment of hereditary vitamin D-resistant rickets with analogs of 1α, 25-dihydroxyvitamin D3. Journal of Biological Chemistry,276(31), 29148-29156.
- Garland, C. F., & Garland, F. C. (1980). Do sunlight and vitamin D reduce the likelihood of colon cancer?. International journal of epidemiology, 9(3), 227-231.
- Gedlicka, C., Hager, G., Weissenböck, M., Gedlicka, W., Knerer, B., Kornfehl, J., & Formanek, M. (2006). 1, 25 (OH) 2Vitamin D3 induces elevated expression of the cell cycle inhibitor p18 in a squamous cell carcinoma cell line of the head and neck. Journal of oral pathology & medicine, 35(8), 472-478.

- Geran R.I., Greenberg N.H., MacDonald M.M., Schumacher A.M., Abbott B.J. (1972). Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. Cancer Chemotherapy Reports. 3:1-103.
- Gerdes, H. H., Bukoreshtliev, N. V., & Barroso, J. F. (2007). Tunneling nanotubes: a new route for the exchange of components between animal cells.FEBS letters, 581(11), 2194-2201.
- Gerhäuser, C., Zhang, W. D., Ho-Chong-Line, N., & Fourasté, I. (2000). New Lanostanoids from Ganoderma lucidum that Induce NAD (P) H: Qui-none Oxidoreductase in Cultured Hepalclc7 Murine Hepatoma Cells. Planta medica,66(07), 681-684.
- Gervásio, O. L. A. S., Dutra, R. A., Tartaglia, S. M., Vasconcellos, W. A., Barbosa, A. A., & Aguiar, M. C. (2001). Oral squamous cell carcinoma: a retrospective study of 740 cases in a Brazilian population. Braz Dent J, 12(1), 57-61.
- Giglio, P., Dhamne, M., Hess, K. R., Gilbert, M. R., Groves, M. D., Levin, V. A., Kang, S. L., Ictech S. E., Liu V., Colman, H., Conrad, C. A., Loghin, M., de Groot, J., Yung, W. K. A., & Puduvalli, V. K. (2012). Phase 2 trial of irinotecan and thalidomide in adults with recurrent anaplastic glioma. Cancer, 118(14), 3599-3606.
- Gill, B. S., Sharma, P., Kumar, R., & Kumar, S. (2016). Misconstrued versatility of *Ganoderma lucidum*: a key player in multi-targeted cellular signaling. Tumor Biology, 37(3), 2789-2804
- Giovannucci E. The epidemiology of vitamin D and cancer risk. In: Feldman D., Wesley Pike J., Adams J.S., editors. Vitamin D. 3rd ed. Academic Press; Amsterdam, The Netherlands: 2011. pp. 1570–1591.
- Gocek, E., & Studzinski, G. P. (2009). Vitamin D and differentiation in cancer.Critical reviews in clinical laboratory sciences, 46(4), 190-209.
- Godard, S., Getz G., Delorenzi M., Farmer P., Kobayashi H., Desbaillets I., Nozaki M., Diserens A.C., Hamou M.F., Dietrich P.Y., Regli L., Janzer R.C., Bucher P., Stupp R., de Tribolet N., Domany E., Hegi M.E. (2003). Classification of human astrocytic gliomas on the basis of gene expression: a correlated group of genes with angiogenic activity emerges as a strong predictor of subtypes. Cancer Research. 63(20):6613-6625.
- Gombart A.F., Luong Q.T., Koeffler H.P. (2006). Vitamin D compounds: activity against microbes and cancer. Anticancer Research. 26:2531–2542.
- Greenwald, P., Clifford, C. K., & Milner, J. A. (2001). Diet and cancer prevention. European Journal of Cancer, 37(8), 948-965.
- Guessous, I. (2015). Role of vitamin D deficiency in extraskeletal complications: predictor of health outcome or marker of health status?. BioMed research international.
- Guha, A., Feldkamp MM, Lau N, Boss G, Pawson A. (1997). Proliferation of human malignant astrocytomas is dependent on Ras activation. Oncogene.15(23):2755-2765.
- Gulliford, T., English, J., Colston, K. W., Menday, P., Moller, S., & Coombes, R. C. (1998). A phase I study of the vitamin D analogue EB 1089 in patients with advanced breast and colorectal cancer. British journal of cancer, 78(1), 6.
- Guntinas-Lichius, O., Wendt, T., Buentzel, J., Esser, D., Lochner, P., Mueller, A., Schultze-Mosgau , S., & Altendorf-Hofmann, A. (2010). Head and neck cancer in Germany: a site-specific analysis of survival of the Thuringian cancer registration database. Journal of cancer research and clinical oncology, 136(1), 55-63.
- Gupta, R., Dixon, K. M., Deo, S. S., Holliday, C. J., Slater, M., Halliday, G. M., Reeve, V. E., & Mason, R. S. (2007). Photoprotection by 1, 25 dihydroxyvitamin D3 is associated with an increase in p53 and a decrease in nitric oxide products.Journal of investigative dermatology, 127(3), 707-715.
- Guzey, M., Kitada, S., & Reed, J. C. (2002). Apoptosis Induction by 1α, 25-Dihydroxyvitamin D3 in Prostate Cancer 1 Supported by the International Union Against Cancer [International Cancer Technology Transfer (ICRETT) and American Cancer Society Beginning Investigator (ACSBI) awards], the Department of Defense, and Cap-CURE. 1. Molecular cancer therapeutics,1(9), 667-677.
- Guzmán, G. (2012). New taxonomical and ethnomycological observations on Psilocybe ss (Fungi, Basidiomycota, Agaricomycetidae, Agaricales, Strophariaceae) from Mexico, Africa and Spain. Acta Botánica Mexicana,100(1), 79-106.
- Habicht, C. (1998). Pausanias' Guide to Ancient Greece (Vol. 50). Univ of California Press.
- Hager, G., Formanek, M., Gedlicka, C., Thurnher, D., Knerer, B., & Kornfehl, J. (2001). 1, 25 (OH) 2 vitamin D3 induces elevated expression of the cell cycle-regulating genes P21 and P27 in squamous carcinoma cell lines of the head and neck. Acta oto-laryngologica, 121(1), 103-109.
- Hager, G., Kornfehl, J., Knerer, B., Weigel, G., & Formanek, M. (2004). Molecular analysis of p21 promoter activity isolated from squamous carcinoma cell lines of the head and neck under the influence of 1, 25 (OH) 2 vitamin D3 and its analogs. Acta oto-laryngologica, 124(1), 90-96.

- Halicka, H. D., Zhao, H., Li, J., Traganos, F., Studzinski, G. P., & Darzynkiewicz, Z. (2012). Attenuation of constitutive DNA damage signaling by 1, 25-dihydroxyvitamin D3. Aging (Albany NY), 4(4), 270-278.
- Hambardzumyan, D., & Bergers, G. (2015). Glioblastoma: Defining Tumor Niches. Trends in Cancer, 1(4), 252-265.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. cell, 100(1), 57-70.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. cell, 144(5), 646-674.
- Hanchette, C. L., & Schwartz, G. G. (1992). Geographic patterns of prostate cancer mortality. Evidence for a protective effect of ultraviolet radiation.Cancer, 70(12), 2861-2869.
- Hansen, C. M., Hamberg, K. J., Binderup, E., & Binderup, L. (2000). Seocalcitol (EB 1089) A vitamin D analogue of anti-cancer potential. Background, design, synthesis, pre-clinical and clinical evaluation. Current pharmaceutical design, 6(7), 803-828.
- Harrison, L. E., Wang, Q. M., & Studzinski, G. P. (1999) a. Butyrate-induced G2/M block in Caco-2 colon cancer cells is associated with decreased p34cdc2 activity. Experimental Biology and Medicine, 222(2), 150-156.
- Harrison, W. T., Hulette, C. M., Guy, C., Sporn, T., & Cummings, T. (2016). Metastatic Glioblastoma: A Case Report and Review of the Literature. J Med Surg Pathol, 1(115), 2.
- Hart, P. H., Gorman, S., & Finlay-Jones, J. J. (2011). Modulation of the immune system by UV radiation: more than just the effects of vitamin D?.Nature Reviews Immunology, 11(9), 584-596.
- Hathcock, J.N., Shao A., Vieth R., Heaney R. (2007). Risk assessment for vitamin D. American Journal of Clinical Nutrition. 85(1):6-18.
- Haussler, M. R., Jurutka, P. W., Mizwicki, M., & Norman, A. W. (2011). Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1α, 25 (OH) 2 vitamin D 3: genomic and non-genomic mechanisms. Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism, 25(4), 543-559.
- Hawkins, P. C., & Nicholls, A. (2012). Conformer generation with OMEGA: learning from the data set and the analysis of failures. Journal of chemical information and modeling, 52(11), 2919-2936.
- Henriquez, M., Armisén, R., Stutzin, A., & Quest, A. F. (2008). Cell death by necrosis, a regulated way to go. Current molecular medicine, 8(3), 187-206.
- Hershberger, P. A., Modzelewski, R. A., Shurin, Z. R., Rueger, R. M., Trump, D. L., & Johnson, C. S. (1999). 1, 25-Dihydroxycholecalciferol (1, 25-D3) inhibits the growth of squamous cell carcinoma and down-modulates p21Waf1/Cip1 in vitro and *in vivo*. Cancer research, 59(11), 2644-2649.
- Hershberger, P. A., Yu, W. D., Modzelewski, R. A., Rueger, R. M., Johnson, C. S., & Trump, D. L. (2001). Calcitriol (1, 25-dihydroxycholecalciferol) enhances paclitaxel antitumor activity in vitro and *in vivo* and accelerates paclitaxel-induced apoptosis. Clinical Cancer Research, 7(4), 1043-1051.
- Hilger, J., Friedel, A., Herr, R., Rausch, T., Roos, F., Wahl, D. A., Pierroz, D. D., Weber, P., & Hoffmann, K. (2014). A systematic review of vitamin D status in populations worldwide. British Journal of Nutrition, 111(01), 23-45.
- Holick, M. F. (2007). Vitamin D deficiency. New England Journal of Medicine,357(3), 266-281.
- Holick, M. F., & Chen, T. C. (2008). Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. The American journal of clinical nutrition, 87(4), 1080S-1086S.
- Hornak, V., Abel, R., Okur, A., Strockbine, B., Roitberg, A., & Simmerling, C. (2006). Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 65(3), 712-725.
- Høyer-Hansen, M., Bastholm, L., Mathiasen, I. S., Elling, F., & Jäättelä, M. (2005). Vitamin D analog EB1089 triggers dramatic lysosomal changes and Beclin 1-mediated autophagic cell death. Cell Death & Differentiation, 12(10), 1297-1309.
- Høyer-Hansen, M., Bastholm, L., Szyniarowski, P., Campanella, M., Szabadkai, G., Farkas, T., ...& Mathiasen, I. S. (2007). Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-β, and Bcl-2.Molecular cell, 25(2), 193-205. **(b)**
- Høyer-Hansen, M., Nordbrandt, S. P. S., & Jäättelä, M. (2010). Autophagy as a basis for the health-promoting effects of vitamin D. Trends in molecular medicine, 16(7), 295-302.
- Hsieh, T. C., & Wu, J. M. (2011). Suppression of proliferation and oxidative stress by extracts of Ganoderma lucidum in the ovarian cancer cell line OVCAR-3. International journal of molecular medicine, 28(6), 1065.
- Hsu, C. L., Yu, Y. S., & Yen, G. C. (2008). Lucidenic acid B induces apoptosis in human leukemia cells via a mitochondria-mediated pathway. Journal of agricultural and food chemistry, 56(11), 3973-3980.
- Hsu, P. P., & Sabatini, D. M. (2008). Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. Cell, 134(5), 703-707.

- Huerta, S., Irwin R.W., Heber D., Go V.L.W., Koeffler H.P.,Uskokovic M.R., Harris D.M. (2002). 1α,25-(OH)2-D3 and its synthetic analogue decrease tumor load in the Apcmin mouse. Cancer Res. 62:741–746
- Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. Journal of molecular graphics, 14(1), 33-38.
- Huse, J.T. & Holland E.C. (2010). Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. Nature Reviews Cancer. 10(5):319-31.
- Iseki K., Tatsuta M., Uehara H., Iishi H., Yano H., Sakai N., Ishiguro S. (1999). Inhibition of angiogenesis as a mechanism for inhibition by 1alpha-hydroxyvitamin D3 and 1,25-dihydroxyvitamin D3 of colon carcinogenesis induced by azoxymethane in Wistar rats. International Journal of Cancer. 81(5):730-733.
- Issa, L. L., Leong, G. M., Sutherland, R. L., & Eisman, J. A. (2002). Vitamin D Analogue-Specific Recruitment of Vitamin D Receptor Coactivators. Journal of Bone and Mineral Research, 17(5), 879-890.
- Iwamoto, F. M., Lamborn, K. R., Robins, H. I., Mehta, M. P., Chang, S. M., Butowski, N. A., DeAngelis, L. M., Abrey, L. E., Zhang, W. T., Prados, M.D., & Fine, H. A. (2010). Phase II trial of pazopanib (GW786034), an oral multi-targeted angiogenesis inhibitor, for adults with recurrent glioblastoma (North American Brain Tumor Consortium Study 06-02). Neuro-oncology, 12(8), 855-861.
- Jansen M., Yip S., Louis D.N. (2010). Molecular pathology in adult gliomas: diagnostic, prognostic and predictive markers.Lancet Neurology. 9:717-726.
- Jedinak, A., Thyagarajan-Sahu, A., Jiang, J., & Sliva, D. (2011). Ganodermanontriol, a lanostanoid triterpene from *Ganoderma lucidum*, suppresses growth of colon cancer cells through ss-catenin signaling.International journal of oncology, 38(3), 761-767.
- Ji, Y., Wang, X., Donnelly, R. J., Uskokovic, M. R., & Studzinski, G. P. (2002). Signaling of monocytic differentiation by a non-hypercalcemic analog of vitamin D3, 1, 25 (OH) 2-5, 6 trans-16-ene-vitamin D3, involves nuclear vitamin D receptor (nVDR) and non-nVDR–mediated pathways. Journal of cellular physiology, 191(2), 198-207.
- Jiang, J., Jedinak, A., & Sliva, D. (2011). Ganodermanontriol (GDNT) exerts its effect on growth and invasiveness of breast cancer cells through the down-regulation of CDC20 and uPA. Biochemical and biophysical research communications, 415(2), 325-329.
- Jiang, J., Slivova, V., Harvey, K., Valachovicova, T., & Sliva, D. (2004). *Ganoderma lucidum* suppresses growth of breast cancer cells through the inhibition of Akt/NF-κB signaling. Nutrition and cancer, 49(2), 209-216.
- Jones, G. (2008). Pharmacokinetics of vitamin D toxicity. The American journal of clinical nutrition, 88(2), 582S-586S.
- Jones, G., Prosser, D. E., & Kaufmann, M. (2014). Cytochrome P450-mediated metabolism of vitamin D. Journal of lipid research, 55(1), 13-31.
- Jones, R. G., & Thompson, C. B. (2009). Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. Genes & development, 23(5), 537-548.
- Jung, S. J., Lee, Y. Y., Pakkala, S., de Vos, S., Elstner, E., Norman, A. W., Green, J., Uskokovic, M., & Koeffler, H. P. (1994). 1, 25 (OH) 2-16ene-vitamin D 3 is a potent antileukemic agent with low potential to cause hypercalcemia. Leukemia research, 18(6), 453-463.
- Kalousova, M., Dusilova-Sulkova, S., Zakiyanov, O., Kostirova, M., Safranek, R., Tesar, V., & Zima, T. (2015). Vitamin D Binding Protein Is Not Involved in Vitamin D Deficiency in Patients with Chronic Kidney Disease. BioMed research international.
- Kao, C., Jesuthasan, A. C., Bishop, K. S., Glucina, M. P., & Ferguson, L. R. (2013). Anti-cancer activities of *Ganoderma lucidum*: active ingredients and pathways. Functional Foods in Health and Disease, 3(2), 48-65.
- Karin, M., & Lin, A. (2002). NF-κB at the crossroads of life and death. Nature immunology, 3(3), 221-227.
- Kato, A., Itoh, T., Anami, Y., Egawa, D., & Yamamoto, K. (2016). Helix12-stabilization antagonist of vitamin D receptor. Bioconjugate chemistry, 27(7), 1750-1761.
- Kawakami K, Kawakami M, Puri RK. (2004). Nitric oxide accelerates interleukin-13 cytotoxin-mediated regression in head and neck cancer animal model. Clinical Cancer Research. 10(15):5264-5270.
- Kesavabhotla, K., Schlaff, C.D., Shin, B., Mubita, L., Kaplan, R., Tsiouris, A.J., Pannullo, S.C., Christos, P., Lavi, E., and Scheff, R., et al., (2012). Phase I/II study of oral erlotinib for treatment of relapsed/refractory glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. J Exp Ther Oncol 10, 71–81.

- Kim, T. H., Kim, J. S., Kim, Z. H., Huang, R. B., Chae, Y. L., & Wang, R. S. (2016). Induction of apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells by Khz (fusion of *Ganoderma lucidum* and *Polyporus umbellatus mycelium*). Molecular medicine reports, 13(2), 1243-1249
- Klaunig, J. E., Xu, Y., Isenberg, J. S., Bachowski, S., Kolaja, K. L., Jiang, J., Stevenson, D. E., & Walborg Jr, E. F. (1998). The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. Environmental Health Perspectives, 106(Suppl 1), 289.
- Koli, K., & Keski-Oja, J. (2000). 1a, 25-dihydroxyvitamin D3 and its analogues down-regulate cell invasion-associated proteases in cultured malignant cells.Cell Growth Differ, 11(4), 221-229.
- Konno, S. (2009). Synergistic potentiation of D-fraction with vitamin C as possible alternative approach for cancer therapy. International journal of general medicine, 2, 91.
- Kornfehl, J., Formanek, M., Temmel, A., Knerer, B., & Willheim, M. (1996). Antiproliferative effects of the biologically active metabolite of vitamin D3 (1, 25 [OH] 2 D3) on head and neck squamous cell carcinoma cell lines. European archives of oto-rhino-laryngology, 253(6), 341-344.
- Kotliarova, S., & Fine, H. A. (2012). SnapShot: glioblastoma multiforme.Cancer Cell, 21(5), 710.
- Koyanagi, M., Brandes, R. P., Haendeler, J., Zeiher, A. M., & Dimmeler, S. (2005). Cell-to-Cell Connection of Endothelial Progenitor Cells With Cardiac Myocytes by Nanotubes A Novel Mechanism for Cell Fate Changes?.Circulation research, 96(10), 1039-1041.
- Kozumbo, W. J., Trush, M. A., & Kensler, T. W. (1985). Are free radicals involved in tumor promotion?. Chemico-biological interactions, 54, 199-207.
- Krasnopolskaya, L. M., Yarina, M. S., Avtonomova, A. V., Usov, A. I., Isakova, E. B., & Bukchman, V. M. (2014). [Antitumor Activity of Polysaccharides from *Ganoderma lucidum* Mycelium: *in vivo* Comparative Study]. Antibiotiki i khimioterapiia= Antibiotics and chemoterapy [sic]/Ministerstvo meditsinskoi i mikrobiologicheskoi promyshlennosti SSSR, 60(11-12), 29-34.
- Krishnan A.V., Moreno J., Nonn L., Swami S., Peehl D.M., Feldman D. (2007). Calcitriol as a chemopreventive and therapeutic agent in prostate cancer: role of anti-inflammatory activity. Journal of Bone Mineralization Research. 22(Suppl.2):V74–80.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Green, D. R., Hengartner, M., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Malorni, W., Nuñez, G., Peter, M. E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky B., & Melino, G. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Cell death & differentiation, 16(1), 3-11.
- Kubicek, G. J., Werner-Wasik, M., Machtay, M., Mallon, G., Myers, T., Ramirez, M., Andrews, D., Curran Jr., W. J., & Dicker, A. P. (2009). Phase I trial using proteasome inhibitor bortezomib and concurrent temozolomide and radiotherapy for central nervous system malignancies. International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics, 74(2), 433-439.
- Kulbersh J.S., Day T.A., Gillespie M.B., Young M.R. (2009). 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D(3) to skew intratumoral levels of immune inhibitory CD34(+) progenitor cells into dendritic cells. Otolaryngology Head and Neck Surgery. 140(2):235-240.
- Kumagai, T., O'Kelly J., Said J.W., Koeffler H.P. (2003). Vitamin D2 analog 19-nor-1,25-dihydroxyvitamin D2: antitumor activity against leukemia, myeloma, and colon cancer cells. Journal of the National Cancer Institute. 95(12):896-905.
- Kumar, V., Abbas, A., Fausto, N., & Aster, J. (2010). Robbins y Cotran: Patología Estructural y funcional. España. Editorial Elsevier, 259-330.
- Kumar, V.; Abbas, A.; Fausto, N.; Mitchell, R. (2008). Patología Humana. Ed. Elsevier, 8ª ed. 972 págs.ISBN-10: 8480863323
- Kunadian, V., Ford, G. A., Bawamia, B., Qiu, W., & Manson, J. E. (2014). Vitamin D deficiency and coronary artery disease: a review of the evidence.American heart journal, 167(3), 283-291.
- Lai, A., Tran, A., Nghiemphu, P. L., Pope, W. B., Solis, O. E., Selch, M., Filka, E., Yong, W. H., Mischel, P. S., Liau, L. M., Phuphanich, S., Black, K., Peak, S., Green, R. M., Spier, C. E., Kolevska, T., Polikoff, J., Fehrenbacher, L., Elashoff, R., & Cloughesy, T. (2011). Phase II study of bevacizumab plus temozolomide during and after radiation therapy for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. Journal of Clinical Oncology, 29(2), 142-148.
- Larreátegui, D., (2011). Historia de la Micología. Post Grado de Medicina Interna, Universidad Internacional del Ecuador, Hospital Metropolitano de Quito, Hospital Carlos Andrade Marín.
- Laskowski, R. A., & Swindells, M. B. (2011). LigPlot+: multiple ligand–protein interaction diagrams for drug discovery. Journal of chemical information and modeling, 51(10), 2778-2786.
- Lee, J. E., Li, H., Chan, A. T., Hollis, B. W., Lee, I. M., Stampfer, M. J., Wu, K., Giovannucci, E., & Ma, J. (2011). Circulating levels of vitamin D and colon and rectal cancer: the Physicians' Health Study and a meta-analysis of prospective studies. Cancer prevention research, 4(5), 735-743.

- Lee, J. H., Gadi, R., Spertus, J. A., Tang, F., & O'Keefe, J. H. (2011). Prevalence of vitamin D deficiency in patients with acute myocardial infarction.The American journal of cardiology, 107(11), 1636-1638.
- Lee, J. H., O'Keefe, J. H., Bell, D., Hensrud, D. D., & Holick, M. F. (2008). Vitamin D deficiency: an important, common, and easily treatable cardiovascular risk factor?. Journal of the American College of Cardiology,52(24), 1949-1956.
- Lee, J. M., Kwon, H., Jeong, H., Lee, J. W., Lee, S. Y., Baek, S. J., & Surh, Y. J. (2001). Inhibition of lipid peroxidation and oxidative DNA damage by *Ganoderma lucidum*. Phytotherapy Research, 15(3), 245-249.
- Lee, K. Y., Choi, H. S., Choi, H. S., Chung, K. Y., Lee, B. J., Maeng, H. J., & Seo, M. D. (2016). Quercetin Directly Interacts with Vitamin D Receptor (VDR): Structural Implication of VDR Activation by Quercetin. Bimolecules & therapeutics, 24(2), 1.
- Lefranc, F., Brotchi J., Kiss R. (2005). Possible future issues in the treatment of glioblastomas: special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis. Journal of Clinical Oncology 23(10):2411-2422.
- Lehmann, B., Querings, K., & Reichrath, J. (2004). Vitamin D and skin: new aspects for dermatology. Experimental dermatology, 13(s4), 11-15.
- Levchenko, A., Mehta, B. M., Niu, X., Kang, G., Villafania, L., Way, D., Dolores Polycarpe, D., Sadelain, M. & Larson, S. M. (2005). Intercellular transfer of P-glycoprotein mediates acquired multidrug resistance in tumor cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102(6), 1933-1938.
- Li, A., Bozdag S., Kotliarov Y., Fine H.A. (2010). GliomaPredict: a clinically useful tool for assigning glioma patients to specific molecular subtypes. BMC Medical Informed Decision Making. 10:38. doi:10.1186/1472-6947-10-38.
- Li, B., Lee, D. S., Kang, Y., Yao, N. Q., An, R. B., & Kim, Y. C. (2013). Protective effect of ganodermanondiol isolated from the Lingzhi mushroom against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatotoxicity through Nrf2-mediated antioxidant enzymes. Food and chemical toxicology, 53, 317-324.
- Li, C. H., Chen, P. Y., Chang, U. M., Kan, L. S., Fang, W. H., Tsai, K. S., & Lin, S. B. (2005). Ganoderic acid X, a lanostanoid triterpene, inhibits topoisomerases and induces apoptosis of cancer cells. Life sciences, 77(3), 252-265.
- Li, C., Shi, L., Chen, D., Ren, A., Gao, T., & Zhao, M. (2015). Functional analysis of the role of glutathione peroxidase (GPx) in the ROS signaling pathway, hyphal branching and the regulation of ganoderic acid biosynthesis in *Ganoderma lucidum*. Fungal Genetics and Biology, 82, 168-180.
- Li, L., Guo, H. J., Zhu, L. Y., Zheng, L., & Liu, X. (2016). A supercritical-CO2 extract of *Ganoderma lucidum* spores inhibits cholangiocarcinoma cell migration by reversing the epithelial–mesenchymal transition. Phytomedicine, 23(5), 491-497.
- Liang, Z. E., Yi, Y. J., Guo, Y. T., Wang, R. C., Hu, Q. L., & Xiong, X. Y. (2015). Inhibition of migration and induction of apoptosis in LoVo human colon cancer cells by polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. Molecular medicine reports, 12(5), 7629-7636.
- Liang, Z., Guo, Y. T., Yi, Y. J., Wang, R. C., Hu, Q. L., & Xiong, X. Y. (2013). *Ganoderma lucidum* polysaccharides target a Fas/caspase dependent pathway to induce apoptosis in human colon cancer cells. Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP, 15(9), 3981-3986.
- Liang, Z., Yi, Y., Guo, Y., Wang, R., Hu, Q., & Xiong, X. (2014). Chemical characterization and antitumor activities of polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum*. International journal of molecular sciences, 15(5), 9103-9116.
- Liebertz, D. J., Lechner, M. G., Masood, R., Sinha, U. K., Han, J., Puri, R. K., Correa, A.J. & Epstein, A. L. (2010). Establishment and characterization of a novel head and neck squamous cell carcinoma cell line USC-HN1. Head & neck oncology,2(1), 1.
- Light, B.W., Yu W.D., McElwain M.C., Russell D.M., Trump D.L., Johnson C.S. (1997). Potentiation of cisplatin antitumor activity using a vitamin D analogue in a murine squamous cell carcinoma model system. Cancer Research. 57(17):3759-3764.
- Lin, C. J., Grandis, J. R., Carey, T. E., Gollin, S. M., Whiteside, T. L., Koch, W. M., Ferris, L.R. & Lai, S. Y. (2007). Head and neck squamous cell carcinoma cell lines: established models and rationale for selection. Head & neck, 29(2), 163-188.
- Lin, J. M., Lin, C. C., Chen, M. F., Ujiie, T., & Takada, A. (1995). Radical scavenger and antihepatotoxic activity of *Ganoderma formosanum*, *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma neo-japonicum*. Journal of Ethnopharmacology, 47(1), 33-41.

- Lin, R., Nagai, Y., Sladek, R., Bastien, Y., Ho, J., Petrecca, K., Sotiropoulou, G., Diamandis, E. P., Hudson, T. J. & White, J. H. (2002). Expression profiling in squamous carcinoma cells reveals pleiotropic effects of vitamin D3 analog EB1089 signaling on cell proliferation, differentiation, and immune system regulation. Molecular Endocrinology, 16(6), 1243-1256.
- Lin, R., Wang, T. T., Miller Jr, W. H., & White, J. H. (2003). Inhibition of F-Box protein p45SKP2 expression and stabilization of cyclin-dependent kinase inhibitor p27KIP1 in vitamin D analog-treated cancer cells. Endocrinology,144(3), 749-753.
- Lin, S. B., Li, C. H., Lee, S. S., & Kan, L. S. (2003). Triterpene-enriched extracts from *Ganoderma lucidum* inhibit growth of hepatoma cells via suppressing protein kinase C, activating mitogen-activated protein kinases and G2-phase cell cycle arrest. Life sciences, 72(21), 2381-2390.
- Lin, Z. B., & Zhang, H. N. (2004). Anti-tumor and immunoregulatory activities of *Ganoderma lucidum* and its possible mechanisms. Acta Pharmacologica Sinica, 25, 1387-1395.
- Liu, G. T. (1999). Recent advances in research of pharmacology and clinical applications of *Ganoderma* P. Karst. species (Aphyllophoromycetideae) in China. International Journal of Medicinal Mushrooms, 1(1).
- Liu, G., Oettel, K., Ripple, G., Staab, M. J., Horvath, D., Alberti, D., Arzoomanian, R., Marnocha, R., Bruskewitz, R., Mazess, R., Bishop, C., Bhattacharya, A., Bailey, H., & Wilding, G. (2002). Phase I trial of 1α-hydroxyvitamin D2 in patients with hormone refractory prostate cancer. Clinical cancer research, 8(9), 2820-2827.
- Liu, G., Wilding, G., Staab, M. J., Horvath, D., Miller, K., Dresen, A., Alberti, D., Arzoomanian, R., Chappell, R. & Bailey, H. H. (2003). Phase II study of 1α-hydroxyvitamin D2 in the treatment of advanced androgen-independent prostate cancer. Clinical Cancer Research,9(11), 4077-4083.
- Liu, M., Lee M.H., Cohen M., Bommakanti M., Freedman L.P. (1996).Transcriptional activation of the Cdk inhibitor p21 by vitamin D3 leads to theinduced differentiation of the myelomonocytic cell line U937.Genes and Development. 10(2):142-53.
- Liu, R. M., & Zhong, J. J. (2011). Ganoderic acid Mf and S induce mitochondria mediated apoptosis in human cervical carcinoma HeLa cells. Phytomedicine,18(5), 349-355.
- Liu, R. M., Li, Y. B., & Zhong, J. J. (2012). Cytotoxic and pro-apoptotic effects of novel ganoderic acid derivatives on human cervical cancer cells in vitro.European journal of pharmacology, 681(1), 23-33.
- Liu, R. M., Li, Y. B., Liang, X. F., Liu, H. Z., Xiao, J. H., & Zhong, J. J. (2015). Structurally related ganoderic acids induce apoptosis in human cervical cancer HeLa cells: Involvement of oxidative stress and antioxidant protective system. Chemico-biological interactions, 240, 134-144
- López, J. A. S., (2000) Botánica Mágica y Misterios; Ed. Mundi-Prensa, Madrid-Barcelona-México, pp. 272.
- Louis, D. N. (2006). Molecular pathology of malignant gliomas. Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis., 1, 97-117
- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvet, A., Scheithauer, B.W. & Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. Acta neuropathologica, 114(2), 97-109.
- Lu, L., Qiu, J., Liu, S., & Luo, W. (2008). Vitamin D3 analogue EB1089 inhibits the proliferation of human laryngeal squamous carcinoma cells via p57.Molecular cancer therapeutics, 7(5), 1268-1274.
- Lu, Q. Y., Jin, Y. S., Zhang, Q., Zhang, Z., Heber, D., Go, V. L. W., Li, F. P., & Rao, J. Y. (2004). *Ganoderma lucidum* extracts inhibit growth and induce actin polymerization in bladder cancer cells in vitro. Cancer letters, 216(1), 9-20.
- Lucia, M. S., & Torkko, K. C. (2004). Inflammation as a target for prostate cancer chemoprevention: pathological and laboratory rationale. The Journal of urology, 171(2), S30-S35.
- Lucisano, S., Buemi, M., Passantino, A., Aloisi, C., Cernaro, V., & Santoro, D. (2013). New insights on the role of vitamin D in the progression of renal damage. Kidney and Blood Pressure Research, 37(6), 667-678.
- Lull, C., Wichers, H. J., & Savelkoul, H. F. (2005). Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites. Mediators of inflammation,2005(2), 63-80.
- Lustig, R., Mikkelsen, T., Lesser, G., Grossman, S., Ye, X., Desideri, S., Fisher, J., Wright, J. & New Approaches to Brain Tumor Therapy CNS Consortium. (2008). Phase II preradiation R115777 (tipifarnib) in newly diagnosed GBM with residual enhancing disease. Neuro-oncology, 10(6), 1004-1009.
- Lv, S., Teugels, E., Sadones, J., De Brakeleer, S., Duerinck, J., Du Four, S., Michotte, A., De Grève, J. & Neyns, B. (2012). Correlation of EGFR, IDH1 and PTEN status with the outcome of patients with recurrent glioblastoma treated in a phase II clinical trial with the EGFR-blocking monoclonal antibody cetuximab. International journal of oncology, 41(3), 1029-1035.

- Ma, Y., Yu, W. D., Hershberger, P. A., Flynn, G., Kong, R. X., Trump, D. L., & Johnson, C. S. (2008). 1α, 25-Dihydroxyvitamin D3 potentiates cisplatin antitumor activity by p73 induction in a squamous cell carcinoma model.Molecular cancer therapeutics, 7(9), 3047-3055.
- Ma, Y., Yu, W. D., Su, B., Seshadri, M., Luo, W., Trump, D. L., & Johnson, C. S. (2013). Regulation of motility, invasion, and metastatic potential of squamous cell carcinoma by 1α, 25-dihydroxycholecalciferol. Cancer, 119(3), 563-574.
- Magrassi, L., Adorni, L., Montorfano, G., Rapelli, S., Butti, G., Berra, B., & Milanesi, G. (1998). Vitamin D metabolites activate the sphingomyelin pathway and induce death of glioblastoma cells. Acta neurochirurgica, 140(7), 707-714.
- Magrassi, L., Butti, G., Pezzotta, S., Infuso, L., & Milanesi, G. (1995). Effects of vitamin D and retinoic acid on human glioblastoma cell lines. Acta neurochirurgica, 133(3-4), 184-190.
- Malemud, C. J., Wang, J., Haque, A., & Louis, N. A. (2013). Immune Response and Apoptosis? Introduction. Journal of Clinical & Cellular Immunology, 2012.
- Mantell D.J., Owens P.E., Bundred N.J., Mawer E.B., Canfield A.E. (2000). 1a,25-Dihydroxyvitamin D3 Inhibits Angiogenesis In Vitro and *In Vivo*. Circulation Research. 87:214-220.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., & Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. Nature, 454(7203), 436-444.
- Marinissen M.J., Tanos T., Bolós M., de Sagarra M.R., Coso O.A., Cuadrado A. (2006). Inhibition of heme oxygenase-1 interferes with the transforming activity of the Kaposi sarcoma herpesvirus-encoded G protein-coupled receptor. Journal of Biological Chemistry. 281(16):11332-11346.
- Martín M.J., Tanos T., García A.B., Martin D., Gutkind J.S., Coso O.A., Marinissen M.J. (2007). The Galpha12/13 family of heterotrimeric G proteins and the small GTPase RhoA link the Kaposi sarcoma-associated herpes virus G protein-coupled receptor to heme oxygenase-1 expression and tumorigenesis. Journal of Biological Chemistry. 282(47):34510-34524.
- Martínez, A., Gándara, Z., González, M., Gómez, G., & Fall, Y. (2013). Synthesis of new calcitriol analogues with an oxolane moiety in their side chains. Tetrahedron Letters, 54(27), 3514-3517.
- Martínez-Montemayor, M. M., Acevedo, R. R., Otero-Franqui, E., Cubano, L. A., & Dharmawardhane, S. F. (2011). *Ganoderma lucidum* (Reishi) inhibits cancer cell growth and expression of key molecules in inflammatory breast cancer. Nutrition and cancer, 63(7), 1085-1094.
- Marur, S., & Forastiere, A. A. (2008). Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment. In Mayo Clinic Proceedings (Vol. 83, No. 4, pp. 489-501). Elsevier.
- MarvinSketch v.6.31., ChemAxon Ltd., http://www.chemaxon.com
- McGann, M. (2011). FRED pose prediction and virtual screening accuracy.Journal of chemical information and modeling, 51(3), 578-596.
- McGuire, T.F., Trump D.L., Johnson C.S. (2001). Vitamin D3 induced apoptosis of murine squamous cell carcinoma cells. Selective induction of caspasedependent MEK cleavage and up-regulation of MEKK-1. Journal of Biological Chemistry. 276:26365–26373.
- Medioni, J., Deplanque, G., Maurina, T., Ferrero, J. M., Rodier, J. M., Raymond, E., Allyon, J., Kalla, S., Dufour-Lamartinie, J. F. & Oudard, S. (2009). 7030 Dose finding and safety analysis of inecalcitol in combination with docetaxel-prednisone regimen in hormone-refractory prostate cancer (HRPC) patients (pts). European Journal of Cancer Supplements, 7(2), 415.
- Meier, J. D., Enepekides, D. J., Poirier, B., Bradley, C. A., Albala, J. S., & Farwell, D. G. (2007). Treatment with 1-alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 (vitamin D3) to inhibit carcinogenesis in the hamster buccal pouch model. Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery, 133(11), 1149-1152.
- Mellinghoff, I. K., Wang, M. Y., Vivanco, I., Haas-Kogan, D. A., Zhu, S., Dia, E. Q., Lu, K. V., Yoshimoto, K., Huang, J. H. Y., Chute, D. J., Riggs, B. L., Horvath, S., Liau, L. M., Cavenee, W. K., Rao, P. N., Beroukhim, R., Peck, T. C., Lee, J. C., Sellers, W. R., Stokoe, D., Prados, M., Cloughesy, T. F., Sawyers, C. L., & Mischel, P. S. (2005). Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. New England Journal of Medicine,353(19), 2012-2024.
- Miller III, B. R., McGee Jr, T. D., Swails, J. M., Homeyer, N., Gohlke, H., & Roitberg, A. E. (2012). MMPBSA. py: an efficient program for end-state free energy calculations. Journal of Chemical Theory and Computation, 8(9), 3314-3321.
- Miranda, G. E., Abrahan, C. E., Agnolazza, D. L., Politi, L. E., & Rotstein, N. P. (2011). Ceramide-1-phosphate, a new mediator of development and survival in retina photoreceptors. Investigative ophthalmology & visual science, 52(9), 6580-6588.
- Mizwicki, M. T., Menegaz, D., Yaghmaei, S., Henry, H. L. and Norman, A. W. (2010) A molecular description of ligand binding to the two overlapping binding pockets of the nuclear vitamin D receptor (VDR): structure-function implications. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 121, 98-105.
- Moll, P. R., Sander, V., Frischauf, A. M., & Richter, K. (2007). Expression profiling of vitamin D treated primary human keratinocytes. Journal of cellular biochemistry, 100(3), 574-592.

- Moreno Ayal, M. A. & Candolfi, M. (2014). Terapia génica citotóxica para el tratamiento del cáncer cerebral. Neurología Argentina, 6(4), 217-224.
- Moreno P, H., Martínez M, A., & Fujimoto, Y. (2011). Aislamiento e identificación de dos esteroles y un triterpenoide del cuerpo fructífero de *Ganoderma lucidum* cultivado en Colombia. Vitae, 18(1), 11-15.
- Moreno, J., Krishnan, A. V., Swami, S., Nonn, L., Peehl, D. M., & Feldman, D. (2005). Regulation of prostaglandin metabolism by calcitriol attenuates growth stimulation in prostate cancer cells. Cancer research, 65(17), 7917-7925.
- Mouriño, A., Torneiro, M., Vitale, C., Fernández, S., Pérez-Sestelo, J., Anné, S., & Gregorio, C. (1997). Efficient and versatile synthesis of a-ring precursors of 1α, 25-dihydroxy-vitamin D 3 and analogues. Application to the synthesis of Lythgoe-Roche phosphine oxide. Tetrahedron letters, 38(26), 4713-4716.
- Mozos, I., & Marginean, O. (2015). Links between vitamin D deficiency and cardiovascular diseases. BioMed research international.
- Muindi J.R., Modzelewski R.A., Peng Y., Trump D.L., Johnson C.S. (2004). Pharmacokinetics of 1α,25-dihydroxyvitamin D3 in normal mice after systemic exposure to effective and safe antitumor doses. Oncology. 66(1):62-66.
- Muindi J.R., Yu W., Ma Y., Engler K.L., Kong R., Trump D.L., Johnson C.S. (2010). CYP24A1 Inhibition Enhances the Antitumor Activity of Calcitriol. General Endocrinology. 151(9):4301-4312.
- Mukhopadhyay, R., Theriault, R. L., & Price, J. E. (1999). Increased levels of α6 integrins are associated with the metastatic phenotype of human breast cancer cells. Clinical & experimental metastasis, 17(4), 323-330.
- Mulpur, B. H., Nabors, L. B., Thompson, R. C., Olson, J. J., LaRocca, R. V., Thompson, Z., & Egan, K. M. (2015). Complementary therapy and survival in glioblastoma. Neuro-oncology practice, npv008.
- Muppala, V., Lin, C. S., & Lee, Y. H. (2000). The role of HNF-1α in controlling hepatic catalase activity. Molecular pharmacology, 57(1), 93-100.
- Myung, S. J., Rerko, R. M., Yan, M., Platzer, P., Guda, K., Dotson, A., Lawrence, E., Dannenberg, A. J., Lovgren, A. K., Luo, G., Pretlow, T. P., Newman, R. A., Willis, J., Dawson, D., & Markowitz, S. D. (2006). 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase is an *in vivo* suppressor of colon tumorigenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences, 103(32), 12098-12102.
- Nabors, L. B., Mikkelsen, T., Hegi, M. E., Ye, X., Batchelor, T., Lesser, G., Peereboom, D., Rosenfeld M. R., Olsen, J., Brem, S., Fisher, J. D., & Grossman, S. A. (2012). A safety run- in and randomized phase 2 study of cilengitide combined with chemoradiation for newly diagnosed glioblastoma (NABTT 0306). Cancer, 118(22), 5601-5607.
- Nagpal, S., Na, S., & Rathnachalam, R. (2005). Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. Endocrine reviews, 26(5), 662-687.
- Narayanan, B. A., Narayanan, N. K., Davis, L., & Nargi, D. (2006). RNA interference–mediated cyclooxygenase-2 inhibition prevents prostate cancer cell growth and induces differentiation: modulation of neuronal protein synaptophysin, cyclin D1, and androgen receptor. Molecular cancer therapeutics, 5(5), 1117-1125.
- Nigwekar, S. U., Bhan, I., & Thadhani, R. (2012). Ergocalciferol and cholecalciferol in CKD. American Journal of Kidney Diseases, 60(1), 139-156.
- Nobes, C.D. & Hall, A. (1995). Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. Biochemical Society Transactions. 23(3):456–459.
- Norman, P. E., & Powell, J. T. (2014). Vitamin D and cardiovascular disease.Circulation research, 114(2), 379-393.
- Nykjaer, A., Dragun, D., Walther, D., Vorum, H., Jacobsen, C., Herz, J., Melsen, F., Christensen, E. I. & Willnow, T. E. (1999). An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D 3. Cell, 96(4), 507-515.
- OECD. Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents, guideline 407, the OECD guideline for testing of chemical. 1995.
- Oh, S. Y., Kang, H. J., Kim, Y. S., Kim, H., & Lim, Y. C. (2013). CD44-negative cells in head and neck squamous carcinoma also have stem-cell like traits.European journal of cancer, 49(1), 272-280.
- Ohgaki, H., Dessen P., Jourde B., Horstmann S., Nishikawa T., Di Patre P.L., Burkhard C., Schüler D., Probst-Hensch N.M., Maiorka P.C., Baeza N., Pisani P., Yonekawa Y., Yasargil M.G., Lütolf U.M., Kleihues P. (2004). Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. Cancer Research. 64(19):6892-6899.
- Oluba, O. M., Adebisi, K. E., Eidangbe, G. O., Odutuga, A. A., & Onyeneke, E. C. (2014). Modulatory Effect of Crude Aqueous Extract of Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom, *Ganoderma lucidum* (Higher Basidiomycetes), on Hematological and Antioxidant Indices in Plasmodium berghei− infected Mice.International journal of medicinal mushrooms, 16(5).

- Omega.2.4.3, OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM http://www.eyesopen.com.
- Ordóñez-Morán, P., Larriba, M. J., Pálmer, H. G., Valero, R. A., Barbáchano, A., Duñach, M., García de Herreros, A., Villalobos, C., Berciano, M. T., Lafarga, M., & Muñoz, A. (2008). RhoA–ROCK and p38MAPK-MSK1 mediate vitamin D effects on gene expression, phenotype, and Wnt pathway in colon cancer cells. The Journal of cell biology, 183(4), 697-710.
- Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Fulop, J., Liu, M., Blanda, R., Kromer, C., Wolinsky, Y., Kruchko, C. & Barnholtz-Sloan, J. S. (2015). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012.Neuro-oncology, 17(suppl 4), iv1-iv62.
- Pálmer, H. G., González-Sancho, J. M., Espada, J., Berciano, M. T., Puig, I., Baulida, J., Quintanilla, M., Cano, A., García de Herreros, A., Lafarga, M., & Muñoz, A. (2001). Vitamin D3 promotes the differentiation of colon carcinoma cells by the induction of E-cadherin and the inhibition of β-catenin signaling. The Journal of cell biology, 154(2), 369-388.
- Patel V., Senderowicz A.M., Pinto D. Jr., Igishi T., Raffeld M., Quintanilla-Martinez L., Ensley J.F., Sausville E.A., Gutkind J.S. (1998). Flavopiridol, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, suppresses the growth of head and neck squamous cell carcinomas by inducing apoptosis. Journal of Clinical Investigation. 102(9):1674-1681.
- Patel, R., & Rizvi, A. A. (2011). Vitamin D deficiency in patients with congestive heart failure: mechanisms, manifestations, and management.Southern medical journal, 104(5), 325-330.
- Peehl, D. M., Shinghal, R., Nonn, L., Seto, E., Krishnan, A. V., Brooks, J. D., & Feldman, D. (2004). Molecular activity of 1, 25-dihydroxyvitamin D 3 in primary cultures of human prostatic epithelial cells revealed by cDNA microarray analysis. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology,92(3), 131-141.
- Peereboom, D. M., Shepard, D. R., Ahluwalia, M. S., Brewer, C. J., Agarwal, N., Stevens, G. H., Suh J. H., Toms, S. A., Vogelbaum, M. A., Weil R. J., Elson P., & Barnett, G. H. (2010). Phase II trial of erlotinib with temozolomide and radiation in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. Journal of neuro-oncology, 98(1), 93-99.
- Pendás-Franco, N., González-Sancho, J. M., Suárez, Y., Aguilera, O., Steinmeyer, A., Gamallo, C., Berciano, M. T., Lafarga, M. & Muñoz, A. (2007). Vitamin D regulates the phenotype of human breast cancer cells. Differentiation, 75(3), 193-207.
- Petit V., Boyer B., Lentz D., Turner C.E., Thiery J.P., Valles A.M. (2000). Phosphorylation of tyrosine residues 31 and 118 on paxillin regulates cell migration through an association with CRK in NBT-II cells. Journal of Cell Biology. 148(5):957–970.
- Petronelli, A., Pannitteri, G., & Testa, U. (2009). Triterpenoids as new promising anticancer drugs. Anti-cancer drugs, 20(10), 880-892.
- Phuphanich, S., Supko, J. G., Carson, K. A., Grossman, S. A., Nabors, L. B., Mikkelsen, T., Lesser, G., Rosenfeld, S., Desideri, S. & Olson, J. J. (2010). Phase 1 clinical trial of bortezomib in adults with recurrent malignant glioma. Journal of neuro-oncology, 100(1), 95-103.
- Picotto, G., Liaudat, A. C., Bohl, L., & Talamoni, N. T. D. (2012). Molecular aspects of vitamin D anticancer activity. Cancer investigation, 30(8), 604-614.
- Pillai, S., Bikle, D. D., & Elias, P. M. (1988). 1, 25-Dihydroxyvitamin D production and receptor binding in human keratinocytes varies with differentiation. Journal of Biological Chemistry, 263(11), 5390-5395.
- Pomilio, B.; & Mongelli, E. (2002). Etapas de Screening. Ciencia Hoy Vol. 12, N°68 abril/mayo.
- Popovic, V., Zivkovic, J., Davidovic, S., Stevanovic, M., & Stojkovic, D. (2013). Mycotherapy of cancer: an update on cytotoxic and antitumor activities of mushrooms, bioactive principles and molecular mechanisms of their action. Current topics in medicinal chemistry, 13(21), 2791-2806.
- Prados, M., Chang, S., Burton, E., Parney, I., Kapadia, A., Rabbitt, J., Page, M., Federoff, A., Kelley, S. & Fyfe, G. (2003). 33 Phase I study of OSI-774 alone or with temozolomide in patients with malignant glioma. European Journal of Cancer Supplements, 1(5), S14.
- Radwan, F. F., Perez, J. M., & Haque, A. (2011). Apoptotic and immune restoration effects of ganoderic acids define a new prospective for complementary treatment of cancer. Journal of clinical & cellular immunology, 004
- Raza, S.M., Lang F.F., Aggarwal B.B., Fuller G.N., Wildrick D.M., Sawaya R. (2002). Necrosis and glioblastoma: a friend or a foe? A review and a hypothesis. Neurosurgery. 51(1):2-12; discussion 12-13.
- Reardon, D. A., Dresemann, G., Taillibert, S., Campone, M., van den Bent, M., Clement, P., Blomquist, E., Gordower, L., Schultz, H., Raizer, J., Hau, P., Easaw, J., Gil, M., Tonn, J., Gijtenbeek, A., Schlegel, U., Bergstrom, P., Green, S., Weir A., & Nikolova, Z. (2009). Multicentre phase II studies evaluating imatinib plus hydroxyurea in patients with progressive glioblastoma. British journal of cancer, 101(12), 1995-2004.

- Redza-Dutordoir, M., & Averill-Bates, D. A. (2016). Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research
- Reichrath, S., Müller, C. S., Gleissner, B., Pfreundschuh, M., Vogt, T., & Reichrath, J. (2010). Notch- and vitamin D signaling in 1, 25 (OH) 2 D 3-resistant glioblastoma multiforme (GBM) cell lines. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 121(1), 420-424.
- Rich, J. N., Reardon, D. A., Peery, T., Dowell, J. M., Quinn, J. A., Penne, K. L., Wikstrand, C. J., Van Duyn, L. B., Dancey, J. E., McLendon, R. E., Kao, J. C., Stenzel, T. T., Rasheed, B. K. A., Tourt-Uhlig, S. E., Herndon, J. E., Vredenburgh, J. J., Sampson, J. H., Friedman, A. H., Bigner, D. D., & Friedman, H. S. (2004). Phase II trial of gefitinib in recurrent glioblastoma.Journal of Clinical Oncology, 22(1), 133-142.
- Rivadulla, M. L., Pérez-García, X., Pérez, M., Gómez, G., & Fall, Y. (2013). Pd-allylic substitution mediated synthesis of 25-amino vitamin D 3 derivatives. Tetrahedron Letters, 54(24), 3164-3166
- Rochel, N., Wurtz, J. M., Mitschler, A., Klaholz, B., & Moras, D. (2000). The crystal structure of the nuclear receptor for vitamin D bound to its natural ligand. Molecular cell, 5(1), 173-179.
- Rocker, D., Ravid, A., Liberman, U. A., Garach-Jehoshua, O., & Koren, R. (1994). 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 potentiates the cytotoxic effect of TNF on human breast cancer cells. Molecular and cellular endocrinology, 106(1-2), 157-162.
- Rotstein, N. P., Politi, L. E., German, O. L., & Girotti, R. (2003). Protective effect of docosahexaenoic acid on oxidative stress-induced apoptosis of retina photoreceptors. Investigative ophthalmology & visual science, 44(5), 2252-2259.
- Ruiz, J., Case, D., Enevold, G., Rosdhal, R., Tatter, S. B., Ellis, T. L., McQuellon, R. P., McMullen, K. P., Stieber, V. W., Shaw, E. G., & Lesser, G. J. (2012). A phase II trial of thalidomide and procarbazine in adult patients with recurrent or progressive malignant gliomas. Journal of neuro-oncology, 106(3), 611-617.
- Rustom, A., Saffrich, R., Markovic, I., Walther, P., and Gerdes, H.-H. (2004). Nanotubular highways for intercellular organelle transport. Science 303, 1007–1010.
- Salomón, D. G., Grioli, S. M., Buschiazzo, M., Mascaró, E., Vitale, C., Radivoy, G., Perez, M., Fall, Y., Mesri, E. A., Curino, A. C. &Facchinetti, M. M. (2011). Novel alkynylphosphonate analogue of calcitriol with potent antiproliferative effects in cancer cells and lack of calcemic activity. ACS medicinal chemistry letters, 2(7), 503-508.
- Salomon, D. G., Mascaro, E., Grioli, S. M., Ferronato, M. J., Vitale, C. A., Radivoy, G. E., Curino, A C., &Facchinetti, M. M. (2014). Phosphonate Analogues of 1α, 25 Dihydroxyvitamin D3 are Promising Candidates for Antitumoural Therapies.Current topics in medicinal chemistry, 14(21), 2408-2423.
- Salomon-Ferrer, R., Case, D. A., & Walker, R. C. (2013). An overview of the Amber biomolecular simulation package. Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science, 3(2), 198-210.
- Samorini, G. (2001). New data on the ethnomycology of psychoactive mushrooms. International Journal of Medicinal Mushrooms, 3(2-3), 257-278.
- Sánchez-González R.A., Canseco-Ávila, L.M., Domínguez-Arrevillaga, S., Moreno-Barillas, I. S., Lugo-Trampe, A., Molina-Cruz, A. M., López-López, C.A., Cordero-Chaclan, C., Trujillo-Murillo, K del C. (2013). Cáncer de cabeza y cuello. Evid Med Invest Salud, 6 (S1): S12-S15.
- Sarkaria, J. N., Galanis, E., Wu, W., Dietz, A. B., Kaufmann, T. J., Gustafson, M. P., Brown, P. D., Uhm, J. H., Rao, R. D., Doyle, L., Giannini, C., Jaeckle, K. A., & Buckner, J. C. (2010). Combination of temsirolimus (CCI-779) with chemoradiation in newly diagnosed glioblastoma multiforme (GBM)(NCCTG trial N027D) is associated with increased infectious risks. Clinical Cancer Research, 16(22), 5573-5580.
- Satake, K., Takagi, E., Ishii, A., Kato, Y., Imagawa, Y., Kimura, Y., & Tsukuda, M. (2003). Anti-tumor effect of vitamin A and D on head and neck squamous cell carcinoma. Auris Nasus Larynx, 30(4), 403-412.
- Schultes, R. E. (1972). An overview of hallucinogens in the western hemisphere. Flesh of the Gods: the ritual use of hallucinogens. Londres, Allen and Unwin: xvii-xvi.
- Schuster, I. (2011). Cytochromes P450 are essential players in the vitamin D signaling system. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 1814(1), 186-199.
- Schwartz G. G., Wang M.H., Zang M., Singh R.K., Siegal G.P. (1997). 1 α, 25-Dihydroxyvitamin D (calcitriol) inhibits the invasiveness of human prostate cancer cells. Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention. 6(9):727-732.
- Schwartz, G. G., & Hulka, S. (1990). Is vitamin D deficiency a risk factor for prostate cancer?(Hypothesis). Anticancer Research, 10, 807-1312.
- Schwartz, G. G., Hall, M. C., Stindt, D., Patton, S., Lovato, J., & Torti, F. M. (2005). Phase I/II study of 19-nor-1α-25-dihydroxyvitamin D2 (paricalcitol) in advanced, androgen-insensitive prostate cancer. Clinical Cancer Research,11(24), 8680-8685.

- Shah S., Islam M.N., Dakshanamurthy S., Rizvi I., Rao M., Herrell R., Zinser G., Valrance M., Aranda A., Moras D., Norman A., Welsh J., Byers S.W. (2006). The molecular basis of vitamin D receptor and beta-catenin crossregulation. Molecular Cell. 21:799–809.
- Shai, R., Shi T, Kremen TJ, Horvath S, Liau LM, Cloughesy TF, Mischel PS, Nelson SF. (2003). Gene expression profiling identifies molecular subtypes of gliomas. Oncogene. 22(31):4918-4923.
- Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D'Amico, M., Pestell, R., & Ben-Ze'ev, A. (1999). The cyclin D1 gene is a target of the β-catenin/LEF-1 pathway. Proceedings of the National Academy of Sciences, 96(10), 5522-5527.
- Simboli-Campbell, M., Gagnon, A., Franks, D. J., & Welsh, J. (1994). 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 translocates protein kinase C beta to nucleus and enhances plasma membrane association of protein kinase C alpha in renal epithelial cells. Journal of Biological Chemistry, 269(5), 3257-3264.
- Simboli-Campbell, M., Narvaez, C. J., VanWeelden, K., Tenniswood, M., & Welsh, J. (1997). Comparative effects of 1, 25 (OH) 2D3 and EB1089 on cell cycle kinetics and apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. Breast cancer research and treatment, 42(1), 31-41.
- Singh R.P., Dhanalakshmi S., Agarwal R. (2002). Phytochemicals as cell cycle modulators--a less toxic approach in halting human cancers. Cell Cycle. 1(3):156-161
- Sinishtaj, S., Jeon, H. B., Dolan, P., Kensler, T. W., & Posner, G. H. (2006). Highly antiproliferative, low-calcemic, side-chain amide and hydroxamate analogs of the hormone 1α, 25-dihydroxyvitamin D 3. Bioorganic & medicinal chemistry, 14(18), 6341-6348
- Smina, T. P., De, S., Devasagayam, T. P. A., Adhikari, S., & Janardhanan, K. K. (2011). *Ganoderma lucidum* total triterpenes prevent radiation-induced DNA damage and apoptosis in splenic lymphocytes in vitro. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 726(2), 188-194.
- Smina, T. P., Mathew, J., Janardhanan, K. K., & Devasagayam, T. P. A. (2011). Antioxidant activity and toxicity profile of total triterpenes isolated from *Ganoderma lucidum* (Fr.) P. Karst occurring in South India. Environmental toxicology and pharmacology, 32(3), 438-446. **(b).**
- Sminia, P., & Westerman, B. A. (2016). Blood-brain barrier crossing & breakthroughs in glioblastoma therapy. British journal of clinical pharmacology.
- Smith, B. D., Smith, G. L., Hurria, A., Hortobagyi, G. N., & Buchholz, T. A. (2009). Future of cancer incidence in the United States: burdens upon an aging, changing nation. Journal of Clinical Oncology, 27(17), 2758-2765.
- Sola, S., Aranha, M. M., Steer, C. J., & Rodrigues, C. M. (2007). Game and players: mitochondrial apoptosis and the therapeutic potential of ursodeoxycholic acid. Current issues in molecular biology, 9(2), 123.
- Somjen, D., Weisman, Y., Kohen, F., Gayer, B., Limor, R., Sharon, O., Jaccard, N., Knoll, E.,& Stern, N. (2005). 25-Hydroxyvitamin D3-1α-hydroxylase is expressed in human vascular smooth muscle cells and is upregulated by parathyroid hormone and estrogenic compounds. Circulation, 111(13), 1666-1671.
- Sotocinal, S. G., Sorge, R. E., Zaloum, A., Tuttle, A. H., Martin, L. J., Wieskopf, J. S., Mapplebeck, J. C. S., Wei, P., Zhan, S., Zhang, S., McDougall, J. J., King, O. D., & Mogil, J. S. (2011). The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. Molecular pain, 7(1), 1
- Speeckaert, M., Huang, G., Delanghe, J. R., & Taes, Y. E. (2006). Biological and clinical aspects of the vitamin D binding protein (Gc-globulin) and its polymorphism. Clinica chimica acta, 372(1), 33-42.
- Spina, C., Tangpricha V., Yao M., Zhou W., Wolfe M.M., Maehr H., Uskokovic M., Adorini L., Holick M.F. (2005). Colon cancer and solar ultraviolet B radiation and prevention and treatment of colon cancer in mice with vitamin D and its Gemini analogs. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 97(1-2):111-120.
- Stanley, G., Harvey, K., Slivova, V., Jiang, J., & Sliva, D. (2005). *Ganoderma lucidum* suppresses angiogenesis through the inhibition of secretion of VEGF and TGF-β1 from prostate cancer cells. Biochemical and biophysical research communications, 330(1), 46-52.
- Stegh, A. H., Chin, L., Louis, D. N., & DePinho, R. A. (2008). What drives intense apoptosis resistance and propensity for necrosis in glioblastoma? A role for Bcl2L12 as a multifunctional cell death regulator. Cell Cycle, 7(18), 2833-2839
- Stewart L.V., Weigel N.L. (2004). Vitamin D and prostate cancer. Experimental Biology and Medicine. 229:277–284.
- Stio, M., Martinesi, M., Bruni, S., Treves, C., Mathieu, C., Verstuyf, A., d'Albasio, G., Bagnoli, S., & Bonanomi, A. G. (2007). The Vitamin D analogue TX 527 blocks NF-κB activation in peripheral blood mononuclear cells of patients with Crohn's disease. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 103(1), 51-60.

- Stupp, R., Hegi, M. E., Neyns, B., Goldbrunner, R., Schlegel, U., Clement, P. M., Grabenbauer, G. G., Ochsenbein, A. F., Simon, M., Dietrich, P. Y., Pietsch, T., Hicking, C., Tonn, J. C., Diserens, A. C., Pica, A., Hermisson, M., Krueger, S., Picard, M., & Weller, M. (2010). Phase I/IIa study of cilengitide and temozolomide with concomitant radiotherapy followed by cilengitide and temozolomide maintenance therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma. Journal of clinical oncology, 28(16), 2712-2718.
- Suh, J., & Rabson, A. B. (2004). NF-κB activation in human prostate cancer: Important mediator or epiphenomenon?. Journal of cellular biochemistry, 91(1), 100-117.
- Sul, J. & Fine H.A. (2010).Malignant gliomas: new translational therapies. *Mount Sinai Journal of Medicine*. 77(6):655-66.
- Sun, W., & Califano, J. A. (2014). Sequencing the head and neck cancer genome: implications for therapy. Annals of the New York Academy of Sciences, 1333, 33.
- Sun, Z., Huang, K., Fu, X., Zhou, Z., Cui, Y., & Li, H. (2014). A chemically sulfated polysaccharide derived from *Ganoderma lucidum* induces mitochondrial-mediated apoptosis in human osteosarcoma MG63 cells. Tumor Biology, 35(10), 9919-9926.
- Sundaram, K., Sambandam, Y., Tsuruga, E., Wagner, C. L., & Reddy, S. V. (2014). 1α, 25-dihydroxyvitamin D3 modulates CYP2R1 gene expression in human oral squamous cell carcinoma tumor cells. Hormones and Cancer, 5(2), 90-97.
- Sung V., Feldman D. (2000). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 decreases human prostate cancer cell adhesion and migration. Molecular and Cellular Endocrinology. (1-2):133-143.
- Swami, S., Raghavachari, N., Muller, U. R., Bao, Y. P., & Feldman, D. (2003). Vitamin D growth inhibition of breast cancer cells: gene expression patterns assessed by cDNA microarray. Breast cancer research and treatment, 80(1), 49-62.
- Swann, S. L., Bergh, J. J., Farach-Carson, M. C., & Koh, J. T. (2002). Rational design of vitamin D3 analogues which selectively restore activity to a vitamin D receptor mutant associated with rickets. Organic letters, 4(22), 3863-3866.
- Tang, W., Liu, J. W., Zhao, W. M., Wei, D. Z., & Zhong, J. J. (2006). Ganoderic acid T from *Ganoderma lucidum* mycelia induces mitochondria mediated apoptosis in lung cancer cells. Life sciences, 80(3), 205-211.
- Tangpricha, V., Flanagan, J. N., Whitlatch, L. W., Tseng, C. C., Chen, T. C., Holt, P. R., Lipkin, M. S., & Holick, M. F. (2001). 25-Hydroxyvitamin D-1α-hydroxylase in normal and malignant colon tissue. The Lancet, 357(9269), 1673-1674.
- Tavera-Mendoza, L., Wang, T. T., Lallemant, B., Zhang, R., Nagai, Y., Bourdeau, V., Ramirez-Calderon, M., Desbarats, J., Mader, S., & White, J. H. (2006). Convergence of vitamin D and retinoic acid signalling at a common hormone response element. EMBO reports, 7(2), 180-185.
- Teekachunhatean, S., Sadja, S., Ampasavate, C., Chiranthanut, N., Rojanasthien, N., & Sangdee, C. (2012). Pharmacokinetics of ganoderic acids A and F after oral administration of Ling Zhi preparation in healthy male volunteers. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2012.
- Thiessen, B., Stewart, C., Tsao, M., Kamel-Reid, S., Schaiquevich, P., Mason, W., Easaw, J., Belanger, K., Forsyth, P., McIntosh, L., & Eisenhauer, E. (2010). A phase I/II trial of GW572016 (lapatinib) in recurrent glioblastoma multiforme: clinical outcomes, pharmacokinetics and molecular correlation. Cancer chemotherapy and pharmacology, 65(2), 353-361.
- Thyagarajan, A., Jiang, J., Hopf, A., Adamec, J., & Sliva, D. (2006). Inhibition of oxidative stress-induced invasiveness of cancer cells by *Ganoderma lucidum* is mediated through the suppression of interleukin-8 secretion.International journal of molecular medicine, 18(4), 657-664.
- Tirado, L. & Martín Granados, M. (2007). Epidemiología y Etiología del Cáncer de la Cabeza y el Cuello. Cancerología 2: 9-17.
- Toniato, E., Spinas, E., Saggini, A., Kritas, S. K., Caraffa, A., Antinolfi, P., Saggini, R., Pandolfi, R., & Conti, P. (2015). Immunomodulatory effects of vitamin D on skin inflammation. J Biol Regul Homeost Agents, 29, 563-567
- Trouillas, P., Honnorat, J., Bret, P., Jouvet, A., & Gerard, J. P. (2001). Redifferentiation therapy in brain tumors: long-lasting complete regression of glioblastomas and an anaplastic astrocytoma under long term 1-alpha-hydroxycholecalciferol. Journal of Neuro-oncology, 51(1), 57-66.
- Trump D.L., Deeb K.K., Johnson C.S. (2010). Vitamin D: considerations in the continued development as an agent for cancer prevention and therapy. *Cancer Journal*. 16:1-9.
- Trump, D. L., Hershberger, P. A., Bernardi, R. J., Ahmed, S., Muindi, J., Fakih, M., Yu, W. D., & Johnson, C. S. (2004). Anti-tumor activity of calcitriol: pre-clinical and clinical studies. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 89, 519-526.
- Uhm, J. H., Ballman, K. V., Wu, W., Giannini, C., Krauss, J. C., Buckner, J. C., James, C.D., Scheithauer, B. W., Behrens, R. J., Flynn, P. J., Schaefer, P. L., Dakhill, S. R., & Jaeckle, K. A. (2011). Phase II evaluation of gefitinib in patients with newly diagnosed Grade 4 astrocytoma:

Mayo/North Central Cancer Treatment Group Study N0074. International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics, 80(2), 347-353.

- Undabeitia, J., Torres-Bayona, S., Samprón, N., Arrázola, M., Bollar, A., Armendariz, M., Torres, P., Ruiz, I, Caballero, M. C., Egaña, L., Querejeta, A., Villanua, J., Pardo, E., Etxegoien, I., Liceaga, G., Urtasun, M., Michan, M., Emparanza, J. I., Aldaz, P., Matheu, A., & Úrculo, E., (2016). Costes indirectos asociados al glioblastoma. Experiencia en un centro. Neurología.
- Uranga, R. M., Mateos, M. V., Giusto, N. M., & Salvador, G. A. (2007). Activation of phosphoinositide-3 kinase/Akt pathway by FeSO4 in rat cerebral cortex synaptic endings. Journal of neuroscience research, 85(13), 2924-2932.
- van Schoor, N. M., & Lips, P. (2011). Worldwide vitamin D status. Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism, 25(4), 671-680.
- Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Berghe, T. V., & Kroemer, G. (2010). Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. Nature reviews Molecular cell biology, 11(10), 700-714
- Vandewalle, B., Hornez, L., Wattez, N., Revillion, F., & Lefebvre, J. (1995). Vitamin-D3 derivatives and breast-tumor cell growth: Effect on intracellular calcium and apoptosis. International journal of cancer, 61(6), 806-811.
- Vanlangenakker, N., Berghe, T. V., & Vandenabeele, P. (2012). Many stimuli pull the necrotic trigger, an overview. Cell Death & Differentiation, 19(1), 75-86
- VIDA 4.2.1, OpenEye Scientific Software SF, NM http://www.eyesopen.com.
- Visvader, J. E. (2011). Cells of origin in cancer. Nature, 469(7330), 314-322.
- Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1993). The multistep nature of cancer. Trends in genetics, 9(4), 138-141.
- Walsh J.E., Clark A.M., Day T.A., Gillespie M.B., Young M.R. (2010). Use of alpha,25-dihydroxyvitamin D3 treatment to stimulate immune infiltrationinto head and neck squamous cell carcinoma.Human Immunology. 71(7):659-665.
- Wang, H., Wang H., Zhang W., Huang H.J., Liao W.S., Fuller G.N. (2004). Analysis of the activation status of Akt, NFkappaB, and Stat3 in human diffuse gliomas. Laboratory Investigation. 84(8):941-951
- Wang, H., Xu, T., Jiang, Y., Xu, H., Yan, Y., Fu, D., & Chen, J. (2015). The challenges and the promise of molecular targeted therapy in malignant gliomas.Neoplasia, 17(3), 239-255.
- Wang, J. F., Zhang, J. J., & Chen, W. W. (1985). Study of the action of *Ganoderma lucidum* on scavenging hydroxyl radicals from plasma. Journal of traditional Chinese medicine= Chung i tsa chih ying wen pan/sponsored by All-China Association of Traditional Chinese Medicine, Academy of Traditional Chinese Medicine, 5(1), 55-60.
- Wang, J., Lian, H., Zhao, Y., Kauss, M. A., & Spindel, S. (2008). Vitamin D3 induces autophagy of human myeloid leukemia cells. Journal of Biological Chemistry, 283(37), 25596-25605.
- Wang, J., Wolf, R. M., Caldwell, J. W., Kollman, P. A., & Case, D. A. (2004). Development and testing of a general amber force field. Journal of computational chemistry, 25(9), 1157-1174.
- Wang, L., Ma, J., Manson, J. E., Buring, J. E., Gaziano, J. M., & Sesso, H. D. (2013). A prospective study of plasma vitamin D metabolites, vitamin D receptor gene polymorphisms, and risk of hypertension in men. European journal of nutrition, 52(7), 1771-1779.
- Wang, Q. M., Studzinski, G. P., Chen, F., Coffman, F. D., & Harrison, L. E. (2000). p53/56lyn antisense shifts the 1, 25-dihydroxyvitamin D3–induced G1/S block in HL60 cells to S phase. Journal of cellular physiology, 183(2), 238-246.
- Wang, S. Y., Hsu, M. L., Hsu, H. C., Lee, S. S., Shiao, M. S., & Ho, C. K. (1997). The anti- tumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes. International Journal of Cancer, 70(6), 699-705.
- Wang, T. T., Tavera-Mendoza, L. E., Laperriere, D., Libby, E., Burton MacLeod, N., Nagai, Y., Bourdeau, V., Konstorum, A., Lallemant, B., Zhang, R., Mader, S., & White, J. H. (2005). Large-scale in silico and microarray-based identification of direct 1, 25-dihydroxyvitamin D3 target genes. Molecular endocrinology, 19(11), 2685-2695.
- Ware, M.L., Berger MS, Binder DK. (2003). Molecular biology of glioma tumorigenesis. Histology and Histopathology. 18(1):207-216.
- Wei, Y. S., Wung, B. S., Lin, Y. C., & Hsieh, C. W. (2009). Isolating a cytoprotective compound from *Ganoderma tsugae*: effects on induction of Nrf-2-related genes in endothelial cells. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 73(8), 1757-1763..
- Weitsman, G. E., Koren, R., Zuck, E., Rotem, C., Liberman, U. A., & Ravid, A. (2005). Vitamin D sensitizes breast cancer cells to the action of H 2 O 2: mitochondria as a convergence point in the death pathway. Free Radical Biology and Medicine, 39(2), 266-278.
- Welsh J. (2007). Targets of vitamin D receptor signaling in the mammary gland. Journal of Bone Mineralization Research. 22(Suppl. 2):V86–90.

- Wen, P. Y., & Kesari, S. (2008). Malignant gliomas in adults. New England Journal of Medicine, 359(5), 492-507.
- Wen, P. Y., & Reardon, D. A. (2016). Neuro-oncology in 2015: Progress in glioma diagnosis, classification and treatment. Nature Reviews Neurology.
- Wen, P. Y., Yung, W. A., Lamborn, K. R., Dahia, P. L., Wang, Y., Peng, B., Abrey, L. E., Raizer, J., Cloughesy, T. F., Fink, K., Gilbert, M., Chang, S., Junck, L., Schiff, D., Lieberman, F., Fine, H. A., Mehta, M., Robins, H. I., DeAngelis, L. M., Groves, M. D., Puduvalli, V. K., Levin, V., Conrad, C., Maher, E. A., Aldape, K., Hayes, M., Letvak, L., Egorin, M. J., Capdeville, R., Kaplan, R., Murgo, A. J., Stiles C., & Prados, M. D. (2006). Phase I/II study of imatinib mesylate for recurrent malignant gliomas: North American Brain Tumor Consortium Study 99-08.Clinical Cancer Research, 12(16), 4899-4907.
- WHO, 2012 - http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/
- Wietrzyk, J., Milczarek, M., & Kutner, A. (2007). The effect of combined treatment on head and neck human cancer cell lines with novel analogs of calcitriol and cytostatics. Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics, 16(11), 517-525.
- Windberger U., Bartholovitsch A., Plasenzotti R., Korak K.J., Heinze G. (2003). Whole blood viscosity, plasma viscosity and erythrocyte aggregation in nine mammalian species: reference values and comparison of data. Experimental Physiology. 88(3):431-440.
- Witt, C. J., Gabel, S. P., Meisinger, J., Werra, G., Liu, S. W., & Young, M. R. I. (2000). Interrelationship between protein phosphatase-2A and cytoskeletal architecture during the endothelial cell response to soluble products produced by human head and neck cancer. Otolaryngology--Head and Neck Surgery,122(5), 721-727.
- Wu, G. S., Lu, J. J., Guo, J. J., Li, Y. B., Tan, W., Dang, Y. Y., Zhonga, Z. F., Xua, Z. T., Chen, X. P., &Wang, Y. T. (2012). Ganoderic acid DM, a natural triterpenoid, induces DNA damage, G1 cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells. Fitoterapia, 83(2), 408-414.
- Xie, S. P., James, S. Y., & Colston, K. W. (1997). Vitamin D derivatives inhibit the mitogenic effects of IGF-I on MCF-7 human breast cancer cells. Journal of endocrinology, 154(3), 495-504.
- Yamamoto, K., Anami, Y. and Itoh, T. (2014) Development of vitamin D analogs modulating the pocket structure of vitamin D receptor. Curr. Top. Med. Chem. 14, 2378-2387.
- Yan, M., Rerko, R. M., Platzer, P., Dawson, D., Willis, J., Tong, M., Lawrence, E., Lutterbaugh, J., Lu, S., Willson, J. K. V., Luo, G., Hensold, J., Tai, H. H., Wilson, K., & Markowitz, S. D. (2004). 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase, a COX-2 oncogene antagonist, is a TGF-β-induced suppressor of human gastrointestinal cancers.Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101(50), 17468-17473.
- Yang, E.S., Burnstein K.L.. (2003). Vitamin D inhibits G1 to S progression in LNCaP prostate cancer cells through p27Kip1 stabilization and Cdk2 mislocalization to the cytoplasm. Journal of Biologycal Chemistry. 278:46862–46868.
- Yue, Q. X., Cao, Z. W., Guan, S. H., Liu, X. H., Tao, L., Wu, W. Y., Li, Y. X., Yang, P. Y., Liu, X., &Guo, D. A. (2008). Proteomics characterization of the cytotoxicity mechanism of ganoderic acid D and computer-automated estimation of the possible drug target network. Molecular & Cellular Proteomics, 7(5), 949-961.
- Yuen, J. W. M., Gohel, M. D. I., & Ng, C. F. (2012). Synergistic cytotoxic effects of *Ganoderma lucidum* and bacillus calmette guérin on premalignant urothelial HUC-PC cells and its regulation on proinflammatory cytokine secretion. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2012.
- Yuen, J. W., & Gohel, M. D. I. (2005). Anticancer effects of *Ganoderma lucidum*: a review of scientific evidence. Nutrition and cancer, 53(1), 11-17.
- Yuen, J. W., Gohel, M. D. I., & Au, D. W. T. (2007). Telomerase-associated apoptotic events by mushroom *Ganoderma lucidum* on premalignant human urothelial cells. Nutrition and cancer, 60(1), 109-119.
- Yuen, J., Buswell, J. A. and Benzie, I. F. F. (2011). *Ganoderma lucidum* (Lingzhi or Reishi). Herbal Medicine. p 175 -199.
- Zhao, J. D., & Zhang, X. Q. (1994, October). Resources and taxonomy of Ling Zhi (*Ganoderma*) in China. In Proceedings of International Symposium *Ganoderma* Research,(October 24-26,). Beijing Medical University Beijing, China.
- Zhao, M., Rosenbaum, E., Carvalho, A. L., Koch, W., Jiang, W., Sidransky, D., & Califano, J. (2005). Feasibility of quantitative PCR-based saliva rinse screening of HPV for head and neck cancer. International journal of cancer,117(4), 605-610.
- Zhong, J. J., & Xiao, J. H. (2009). Secondary metabolites from higher fungi: discovery, bioactivity, and bioproduction. In Biotechnology in China I (pp. 79-150). Springer Berlin Heidelberg.

- Zhou, C., Lu, F., Cao, K., Xu, D. I., Goltzman, D., & Miao, D. (2008). Calcium-independent and 1, 25 (OH) 2D3-dependent regulation of the renin-angiotensin system in 1α-hydroxylase knockout mice. Kidney international, 74(2), 170-179.
- Zhou, X., Lin, J., Yin, Y., Zhao, J., Sun, X., & Tang, K. (2007). Ganodermataceae: natural products and their related pharmacological functions. The American journal of Chinese medicine, 35(04), 559-574.
- Zhu, J., & DeLuca, H. F. (2012). Vitamin D 25-hydroxylase–Four decades of searching, are we there yet?. Archives of biochemistry and biophysics, 523(1), 30-36.

PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS

“Publica o perece”

Publicaciones en proceso de escritura

El presente trabajo de tesis generó tres artículos que se encuentran, actualmente, en diferentes etapas de producción:

Diego J. Obiol, Andrea Martínez, María J. Ferronato, Zoila Gándara, Mario A. Quevedo, Alejandro López Romero, Generosa Gómez, Yagamare Fall, Alejandro C. Curino, María M. Facchinetti. "Design, synthesis and biological evaluation of a new oxolane analogue of vitamin D". (a enviarse próximamente).

Diego J. Obiol, María J. Ferronato, Maximiliano A. Bidegain, Alejandro, López Romero, María A. Cubitto, Alejandro C. Curino, María M. Facchinetti. **"**Potential Anticancer Effects of Triterpene Extracts Spores of *Ganoderma lucidum* on head and neck squamous carcinoma cell".

Diego J. Obiol, María J. Ferronato, María E. Fermento, Yagamare Fall, Mario A. Quevedo, Alejandro C. Curino, María M. Facchinetti. "Design, synthesis and analysis of the biological activity of a new amide analogue of calcitriol".

Libro

Obiol, D.J., Alonso, E.N., Balogh, G.A.. Maitake-Fracción D y sus efectos terapéuticos en cáncer de mama: Efecto de Maitake en cáncer de mama. 2012. Editorial académica española. ISBN: 978-3659053726

Publicaciones en revistas

Alonso, E.N.; Ferronato, M.J.; Gandini, N.A.; Fermento, M.E.; **Obiol, D.J**.; López Romero, A.; Arévalo, J.; Villegas, M.E.; Facchinetti, M.M.; Curino, A.C. Antitumoral effects of D-Fraction from Grifola frondosa (Maitake) mushroom in breast cancer. Nutrition and Cancer 2017, 69(1), 29-43.

Ferronato MJ, **Obiol DJ**, Fermento ME, Gandini NA, Alonso EN, Salomón DG, Vitale C, Mascaró E, Fall Y, Raimondi AR, Curino AC, Facchinetti MM. The alkynylphosphonate analogue of calcitriol EM1 has potent anti-metastatic effects in breast cancer. J Steroid Biochem Mol Biol. 2015 Nov;154:285-93. doi: 10.1016/j.jsbmb.2015.09.009. Epub 2015 Sep 11.

Gandini NA, Fermento ME, Salomón DG, **Obiol DJ**, Andrés NC, Zenklusen JC, Arevalo J, Blasco J, López Romero A, Facchinetti MM, Curino AC**.** Heme oxygenase-1 expression in human gliomas and its correlation with poor prognosis in patients with astrocytoma. Tumour Biol. 2014 Mar;35(3):2803-15.

Soares R1, Meireles M, Rocha A, Pirraco A, **Obiol D**, Alonso E, Joos G, Balogh G. Maitake (D fraction) mushroom extract induces apoptosis in breast cancer cells by BAK-1 gene activation. J Med Food. 2011 Jun;14(6):563-72. doi: 10.1089/jmf.2010.0095. Epub 2011 Apr 11.

Congresos y reuniones científicas

FERMENTO, M.E.; VILLEGAS, M.E.; GANDINI, N.A.; ALONSO, E.N.; **OBIOL, D.J.**; FERRONATO, M.J.; FACCHINETTI, M.M.; CURINO, A.C. El silenciamiento genético de p300 reduce la viabilidad y aumenta la migración e invasión celular de la línea de carcinoma mamario murino LM3. LX Reunión Científica Anual de la

Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC) la Sociedad Argentina de Fisiología (SAFIS). Lugar: Mar del Plata; Año: 2015.

ALONSO, E.N.; FERRONATO, M.J.; GANDINI, N.A.; FERMENTO, M.E.; **OBIOL, D.J**.; AREVALO, J.; FACCHINETTI, M.M.; CURINO, A.C. Efectos antitumorales de la Fracción D de Maitake (Grifola frondosa) en cáncer de mama. LX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC) la Sociedad Argentina de Fisiología (SAFIS). Lugar: Mar del Plata; Año: 2015.

FERRONATO, M.J.; ALONSO, E.N.; GANDINI, N.A.; **OBIOL, D.J**.; FERMENTO, M.E.; QUEVEDO, M.A.; ARÉVALO, J.; LÓPEZ ROMERO, A.; FALL, Y.; CURINO, A.C.; FACCHINETTI, M.M. EFECTOS ANTITUMORALES DEL ANÁLOGO DE CALCITRIOL UVB1 SOBRE EL CARCINOMA COLORECTAL. LX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC) la Sociedad Argentina de Fisiología (SAFIS). Lugar: Mar del Plata; Año: 2015.

GANDINI, NORBERTO ARIEL; ALONSO ELIANA NOELIA; FERRONATO MARÍA JULIA; FERMENTO MARÍA EUGENIA; **OBIOL DIEGO JAVIER**; FACCHINETTI MARÍA MARTA; CURINO ALEJANDRO CARLOS. LA ACTIVACION DE HEMOXIGENASA-1 (HO-1) SE ASOCIA CON UN FENOTIPO MENOS INVASIVO EN CANCER DE MAMA. LX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC) la Sociedad Argentina de Fisiología (SAFIS). Lugar: Mar del Plata; Año: 2015.

OBIOL DJ; FERRONATO MJ; SALOMÓN DG; ALONSO EN; GANDINI NA; FERMENTO ME; FALL Y; CURINO AC; FACCHINETTI MM. Estudio de los efectos antineoplásicos de nuevos análogos de calcitriol con modificaciones en la cadena lateral. V Congreso Interdisciplinario de la Salud de Bahía Blanca. Lugar: Bahía Blanca; Año: 2015.

CURINO AC; FERRONATO MJ; ALONSO EN; FERMENTO ME; **OBIOL DJ**; FACCHINETTI MM; GANDINI NA. HEME OXYGENASE-1 DECREASES THE INVASIVE PHENOTYPE IN BREAST CANCER. SISTAM 2015. Lugar: San Carlos de Bariloche; Año: 2015.

ALONSO EN; **OBIOL DJ**; FERRONATO MJ; FERMENTO ME; SALOMÓN DG; GANDINI NA; LÓPEZ ROMERO, A.; FACCHINETTI MM; CURINO AC. Efectos antitumorales de la fracción D del Maitake (Grifola Frondosa) en cáncer de mama. V Congreso Interdisciplinario de la Salud de Bahía Blanca. Lugar: Bahía Blanca; Año: 2015.

CURINO, A.C.; FERRONATO, M.J.; GANDINI, N.A.; **OBIOL, D. J**.; FERMENTO, M.E.; FACCHINETTI, M.M.; LÓPEZ ROMERO, A.; ALONSO, E.N. ANTITUMORAL EFFECTS OF GRIFOLA FRONDOSA (MAITAKE) D FRACTION IN BREAST CANCER. Sistam 2015. Lugar: San Carlos de Bariloche; Año: 2015.

FACCHINETTI. M.M.; ALONSO, E.N.; **OBIOL, D. J**.; GANDINI, N.A.; FERMENTO, M.E.; FALL, Y.; CURINO, A.C.; FERRONATO, M.J. ANTITUMORAL EFFECTS OF A NOVEL GEMINI VITAMIN D ANALOGUE. Sistam 2015. Lugar: San Carlos de Bariloche; Año: 2015.

CURINO, A.C.; FERRONATO, M.J.; ALONSO, E.N.; FERMENTO, M.E.; **OBIOL, D.J.**; FACCHINETTI, M.M.; GANDINI, N.A. HEME OXYGENASE-1 DECREASES THE INVASIVE FENOTYPE IN BREAST CANCER. Sistam 2015. Lugar: San Carlos de Bariloche; Año: 2015.

MARTÍNEZ, A. ; SANTALLA, H.; LOIS, M.; FERRONATO, M.J.; **OBIOL, D. J.**; GÓMEZ, G.; FALL, Y.; CURINO, A.C.; FACCHINETTI, M.M. DISEÑO, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE ANÁLOGOS DEL CALCITRIOL CON UN ANILLO OXOLANO EN SU CADENA LATERAL. LX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC) la Sociedad Argentina de Fisiología (SAFIS). Lugar: Mar del Plata; Año: 2015.

FERRONATO. M.J.; SALOMÓN. D.G.; **OBIOL. D.J.**; ALONSO. E.N.; FALL. Y.; FACCHINETTI. M.M.; CURINO. A.C. Novel Gemini Vitamin D Analogue: Antitumoral Effects on Cancer Cell Lines and Lack of Calcemic Activity in Mice. III Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas. Lugar: Córdoba; Año: 2014.

FERRONATO, MARÍA J; **OBIOL, DIEGO J**; BIDEGAIN, MAXIMILIANO A; GANDINI, NORBERTO A; ALONSO, ELIANA N; SALOMÓN, DÉBORA G; CUBITTO MARÍA A; CURVETTO, NÉSTOR R; CURINO, ALEJANDRO C; FACCHINETTI, MARÍA M. Efectos de *Ganoderma lucidum* sobre líneas celulares de carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello. IV Jornadas de Farmacia del Sudoeste Bonaerense. Lugar: Bahía Blanca; Año: 2014.

OBIOL DJ; FERRONATO MJ; SALOMÓN DG; ALONSO EN; GANDINI NA; FERMENTO ME; FALL Y; CURINO AC; FACCHINETTI MM. Estudio de los efectos antineoplásicos de nuevos análogos de calcitriol con modificaciones en la cadena lateral. IV Jornadas de Farmacia del Sudoeste Bonaerense. Lugar: Bahía Blanca; Año: 2014.

FERRONATO. M.J..; SALOMÓN. D.G.; **OBIOL. D.J**.; FERMENTO. M.E.; ALONSO. E.N.; GANDINI. N.A.; ARÉVALO. J.; FALL. Y.; CURINO. A.C.; FACCHINETTI. M.M. EFECTOS ANTITUMORALES Y ACTIVIDAD CALCÉMICA DE UN NUEVO ANÁLOGO DE LA VITAMINA D3. LIX REUNIÓN CIENTÍFICA ANUAL Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). Lugar: Mar del Plata; Año: 2014.

ALONSO. E.N.; **OBIOL, D.J.**; FERRONATO, M.J..; FERMENTO, M.E.; SALOMÓN, D.G.; GANDINI, N.A.; LÓPEZ ROMERO, A.; FACCHINETTI, M.M.; CURINO, A.C. EFECTOS ANTITUMORALES DE LA FRACCIÓN D DEL MAITAKE (GRIFOLA FRONDOSA) EN CÁNCER DE MAMA. LIX REUNIÓN CIENTÍFICA ANUAL Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). Lugar: Mar del Plata; Año: 2014.

OBIOL. D.J.; FERRONATO. M.J.; SALOMÓN. D.G.; ALONSO. E.N.; GANDINI. N.A.; FERMENTO. M.E.; FALL. Y.; CURINO. A.C.; FACCHINETTI. M.M. Estudio de los efectos antineoplásicos de nuevos análogos de calcitriol con modificaciones en la cadena lateral. LIX REUNIÓN CIENTÍFICA ANUAL Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). Lugar: Mar del Plata; Año: 2014.

FERRONATO, M.J.; **OBIOL, D.J.**; BIDEGAIN, M.A.; GANDINI, N.A.; ALONSO, E.N.; SALOMÓN, D.G.; CUBITTO, M.A.; CURVETTO, N.R.; CURINO, A.C.; FACCHINETTI. M.M. Efectos de *Ganoderma lucidum*

sobre líneas celulares de carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello LVIII Reunión científica anual de la sociedad argentina de investigación clínica (SAIC). Lugar: Mar del Plata; Año: 2013.

SALOMÓN, D.G.; FERRONATO, M.J.; FERMENTO, M.E.; ALONSO, E.N.; **OBIOL, D.J.**; MASCARÓ, E.; VITALE, C.; FALL,Y.; CURINO, A.C.; FACCHINETTI. M.M. ESTUDIOS PRECLÍNICOS DEL NUEVO ANÁLOGO DE CALCITRIOL C10. LVIII Reunión científica anual de la sociedad argentina de investigación clínica (SAIC). Lugar: Mar del Plata; Año: 2013.

GANDINI, N.A.; FERMENTO, M.E.; **OBIOL, D.J.**; LÓPEZ ROMERO, A.; FACCHINETTI. M.M.; CURINO, A.C. LA SOBREEXPRESIÓN GENÉTICA DE HEMOXIGENASA-1 SE CORRELACIONA CON UN ESTADO MENOS PROLIFERATIVO EN CÁNCER DE MAMA. LVIII Reunión científica anual de la sociedad argentina de investigación clínica (SAIC). Lugar: Mar del Plata; Año: 2013.

OBIOL. D.J.; ALONSO. E.N.; BALOGH, G.A. Role of b-glucans in the prevention of mammary tumorigenesis. II Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas. Lugar: Rosario; Año: 2012.

OBIOL, D.J.; ALONSO, E.N.; BALOGH, G.A. Could Maitake D-Fraction inhibits the malignant phenotype in breast cancer?.III Jornadas de Posgrado del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia. Lugar: Bahía Blanca; Año: 2012.

ALONSO, E.N.; **OBIOL, D.J.**; FERMENTO, M.E.; BALOGH, G.A. Rol de los B-glucanos en la prevención de la tumorigénesis mamaria en ratones. III Jornadas de Posgrado del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia. Lugar: Bahía Blanca; Año: 2012.

ALONSO, E.N.; **OBIOL, D.J.** ; BALOGH, G.A.. Rol de los glucanos en la prevención de la tumorigénesis mamaria. 4° Congreso interdisciplinario de Salud de Bahía Blanca-Salud como Politica de Estado. Lugar: Bahía Blanca; Año: 2012.

OBIOL, D.J.; ALONSO, E.N.; BALOGH, G.A. Rol de los β-glucanos en la prevención de la tumorigénesis mamaria. III Jornadas de Farmacia del Sudoeste Bonaerense. Lugar: Bahía Blanca; Año: 2012.

ALONSO. E.N.; **OBIOL. D.J.**; BALOGH, G.A..Could Maitake D-Fraction inhibits the malignant phenotype in breast cancer?. II Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas. Lugar: Rosario; Año: 2012.

MEIRELES, M. ; ROCHA, A.S.; **OBIOL, D.J**.; JOOS, G.; ALONSO, E.N.; SOARES, R.; BALOGH, G.A. Maitake mushroom extract induce apoptosis in breast cancer cells by BAK-1 gene activation. 101st ANNUAL MEETING FOR AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH. Lugar: Washington, DC, USA ; Año: 2010.

ALONSO, E.N.; OROZCO, M.; NIETO, A.; LE MOGLIE, M.G.; **OBIOL, D.J**.; JOOS, G.; FERRO, A.; GONZALEZ DONNA, M.L.; VINCENT, E.; BARUTTA, E.; MARTINEZ, D.; MARTINEZ, I.; MAEGLI, M.I.; KOWALYSZYN, R.; GINESTET, P.; SALVADORI, M.; PELLEGRINO, P. ; BALOGH, G.A. Primer estudio

molecular y análisis de polimorfismos en el gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama en Argentina.. XIV CONGRESO LATINOAMERICANO DE GENETICA. Lugar: Viña del Mar; Año: 2010.

MEIRELES, M. ; ROCHA, A.S.; **OBIOL, D.J**.; JOOS, G.; ALONSO, E.N.; SOARES, R.; BALOGH, G.A. Effect of Maitake mushroom extract in human breast cancer cells. I Jornada de Producción Científico Tecnológico. Lugar: CENTRO CIENTIFICO TECNOLOGICO-CONICET, BAHIA BLANCA, Año: 2009.

BALOGH, G.A.; ALONSO, E.N.; **OBIOL, D.J**.; JOOS, G.; FERRO, A.; FRIZZA, A.; VINCENT, ES.; BARUTTA, E.; MARTINEZ, D.; MARTINEZ, I.; MAEGLI, M.I.; VINCENT, ED. Estudio genético para determinar mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 en pacientes con cáncer de mama con o sin antecedentes familiares de cáncer. I Jornada de Producción Científico Tecnológico Lugar: CENTRO CIENTIFICO TECNOLOGICO-CONICET, BAHIA BLANCA, Año: 2009.